



Ecole Doctorale
Sciences de la vie et de la Santé ED414

Thèse présentée par :

Emmanuelle PINEAU

Soutenue le 20 septembre 2017

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Disciplines : Biochimie et Biologie moléculaire

**Formation des acides gras poly-hydroxylés et
incorporation dans la cutine
chez *Arabidopsis thaliana***

Jury

Directeur de Thèse : **Dr. Franck Pinot**, Chargé de recherche, CNRS
Rapporteurs : **Dr. Bénédicte Bakan**, Chargée de recherche, INRA
Prof. Alain Hehn, Professeur des Universités, INRA
Examineur : **Dr. Danièle Werck**, Directeur de recherche, CNRS

Invité : **Dr. Andrea Hemmerlin**, Chargée de recherche, CNRS



Ecole Doctorale
Sciences de la vie et de la Santé ED414

Thèse présentée par :

Emmanuelle PINEAU

Soutenue le 20 septembre 2017

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Disciplines : Biochimie et Biologie moléculaire

**Formation des acides gras poly-hydroxylés et
incorporation dans la cutine
chez *Arabidopsis thaliana***

Jury

Directeur de Thèse : **Dr. Franck Pinot**, Chargé de recherche, CNRS
Rapporteurs : **Dr. Bénédicte Bakan**, Chargée de recherche, INRA
Prof. Alain Hehn, Professeur des Universités, INRA
Examineur : **Dr. Danièle Werck**, Directeur de recherche, CNRS

Invité : **Dr. Andrea Hemmerlin**, Chargée de recherche, CNRS

Résumé

Les plantes sont des organismes sessiles qui ne peuvent fuir des conditions souvent défavorables et doivent par conséquent s'adapter à un environnement hostile pour survivre. La cutine partie intégrante de la cuticule qui joue un rôle de barrière pour la plante est un polymère lipidique constitué principalement d'acides gras en C16 et C18 hydroxylés et époxydés reliés entre eux par des liaisons ester mettant en jeu les fonctions carboxyl et ω -hydroxyl des acides gras. La cutine ne joue pas seulement un rôle de barrière physique mais joue un rôle de réservoir de molécules possédant des propriétés physiologiques fondamentales. Grâce à des approches biochimiques et génétiques, nos travaux ont permis de mettre en évidence AtEH1, une époxyde hydrolase responsable de la formation des diols incorporés dans la cutine d'*Arabidopsis thaliana*. Ces diols sont décrits dans la littérature comme intervenant dans les interactions plante-pathogène. Nous avons également montré que ces composés ainsi que d'autres dérivés d'acides gras sont perçus par la plante. Nous avons identifié et caractérisé CYP77B1, une époxygénase d'acide gras qui a un rôle potentiel à jouer dans la formation d'acides gras polyhydroxylés incorporés dans la cutine.

Plants are sessile organisms that are not able to escape from difficult environmental conditions and therefore have to adapt to multiple abiotic and biotic stress to survive. Cutin is a part of the cuticle which plays a major role as a barrier for the plant. It's a lipid polymer composed mainly by hydroxylated and epoxidized C16 and C18 fatty acids linked together by ester links involving the carboxyl and ω -hydroxyl functions of those fatty acids. Cutin plays also a role as a reservoir of molecules with fundamental physiological properties. With biochemical and genetic approaches, we characterized AtEH1, an epoxide hydrolase responsible for the formation of diols incorporated in *Arabidopsis thaliana* cutin. These diols are described as being involved in plant-pathogen interactions. We also showed that these compounds as well as others fatty acids derivatives are perceived by plants. We have also identified and characterized CYP77B1, an epoxidase that has a potential role in the formation of polyhydroxylated fatty acids incorporated in cutin.

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury, Dr Benedicte Bakan, Dr Danièle Werck, Dr Andréa Hemmerlin, Dr Alain Hehn d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je voudrais remercier particulièrement mon directeur de thèse, Dr Franck Pinot, d'avoir encadré mon travail pendant ces 3 années ainsi que depuis le master car sans lui je n'aurais pas pu obtenir ma bourse du ministère de la recherche.

Je remercie Hugues Renault et Nicolas Navrot pour leurs précieux conseils scientifiques sur mon projet de recherche et pour les publications.

Je souhaite également remercier la plateforme métabolomique de l'IBMP et tout particulièrement Julien Delecolle, pour sa formation sur la GC-MS/MS et sa grande disponibilité.

Merci à toute l'équipe des Cytochromes P450s et métabolismes associés, qui m'ont tous soutenue et aidée tout au long de ces trois dernières années et à l'équipe de Frédéric Beisson pour sa contribution à mon travail de thèse.

Je remercie particulièrement le Dr Pascaline Ullmann pour son oreille attentive et son aide précieuse pendant mon activité d'enseignement.

Un grand merci à mes amis Cédric, Laetitia, Chloé, Kevin, Julie, Bérengère, Christelle, Charlotte, Claire et Caro qui me soutiennent quotidiennement et ont dû me supporter tous les jours dans mes questionnements et dans mes activités à côté du laboratoire.

Un grand merci à ma Lucie, cela a été ma plus belle rencontre au laboratoire et je sais que cette amitié durera encore très longtemps ☺

Un grand merci à Adrien pour son écoute et tout ce qu'il m'a apporté au quotidien, merci pour ton soutien.

Et enfin je remercie mes parents qui m'ont soutenue, aidée et encouragée pendant toutes mes études.

Publications

Pineau, E., Xu, L., Renault, H., Trolet, A., Navrot, N., Ullmann, P., Légeret, B., Verdier, G., Beisson, F., and Pinot, F. (2017). *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (*AtEHI*) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers. *New Phytologist*.

Pineau, E., Renault, H., Navrot, N., Ullmann, P., Beisson, Pinot, F. (2017). CYP77B1 is involved in formation of epoxidized fatty acids incorporated in cutin. En préparation.

Renault, H., Alber, A., Horst, N.A., Basilio Lopes, A., Fich, E.A., Kriegshauser, L., Wiedemann, G., Ullmann, P., Herrgott, L., Erhardt, M., **Pineau, E.**, et al. (2017). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature Communications* 8, 14713.

Widemann, E., Grausem, B., Renault, H., **Pineau, E.**, Heinrich, C., Lugan, R., Ullmann, P., Miesch, L., Aubert, Y., Miesch, M., et al. (2015). Sequential oxidation of Jasmonoyl-Phenylalanine and Jasmonoyl-Isoleucine by multiple cytochrome P450 of the CYP94 family through newly identified aldehyde intermediates. *Phytochemistry* 117, 388–399.

Posters et Communications orales

Pineau, E., Pinot, F., (2015) “Effect of fatty acids treatment on *Arabidopsis thaliana*”. P4fifty conference, Bischoffsheim, France

Verdier, G., **Pineau, E.**, Légeret, B., Li-Beisson, Y., Pinot, F., (2015) “Metabolism of C18 epoxyacid cutin monomers”. 2nd International Symposium on Plant Apoplastic Diffusion Barriers, Nantes, France

Pineau, E., Pinot, F., (2015) “Effect of fatty acids treatment on *Arabidopsis thaliana*”. 2nd International Symposium on Plant Apoplastic Diffusion Barriers, Nantes, France

Pineau, E., (2017) “*Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (*AtEHI*) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers.” Méta - SP, Strasbourg, France.

Liste des Abréviations

A : Absorbance	GAPDH : Glycéraldehyde-3-phosphate déhydrogenase
AcLi : Acétate de Lithium	GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
ADN : Acide désoxyribonucléique	GFP : Green fluorescent protein
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	GPAT : Glycérol phosphate acyl transférase
AG : Acide gras	GUS : β -glucuronidase
Amu : Unité de masse atomique	HAD : Haloacide déhalogénase
ARN : Acide ribonucléique	HPLC : High pressure liquid chromatography
BSTFA : N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide	JA : Acide jasmonique
CCM : Chromatographie sur couche mince	kDa : Kilodalton
Col0 : Ecotype Colombia	KO : Knock out
CUS : Cutine synthase	KOH : Hydroxyde de potassium
DHP : Acide 10-16 dihydroxypalmitique	LACS : Long-chain acyl-CoA Synthetase
DO : Densité optique	LTP : Lipid transfer protein
DTT : Dithiothreitol	mCi : Millicurie
DMSO : Diméthylsulfoxyde	MS : Murashige et Skoog
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique	MSTFA : N-méthyl-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide
EGTA : Acide éthylène glycol tétraacétique	NaCl : Chlorure de sodium
EH : Epoxyde hydrolase	NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
mEH : Epoxyde hydrolase microsomale	dNTP : Désoxynucléotide triphosphate
sEH : Epoxyde hydrolase soluble	

ORF : Open-reading frame
P450 : Cytochrome P450
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PEG : Polyéthylène glycol
qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne
quantitative
pH : Potentiel hydrogène
PR : Pathogen-related protein
PVP : Polyvinyl pyrrolidone
PVDF : Polyvinylidene difluoride
RE : Réticulum endoplasmique
RFP : Red fluorescent protein
rpm : Rotation par minute
RT : Transcription réverse
SA : Acide saticylique
SDS : Dodécylsulfate de sodium
T-DNA : ADN de transfert
TE : Tris-EDTA
TIC : Total current intensity
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
V : Volt
X-Gluc : Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -
D-glucuronique

Liste des tableaux et figures

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

Figure 1.1 : Schéma représentant la structure de la cuticule et ses différentes couches (A)
Image de microscopie électronique de la surface d'une feuille d'*Arabidopsis thaliana* (B)

Figure 1.2 : Schéma représentant le polymère de cutine (Adapté de Kolattukudy, 1981),
en rouge les liaisons esters primaires et en jaune les liaisons esters secondaires

Figure 1.3 : Structure de la cutine en type réseau à gauche de la figure et en type
dendrimère à droite (Pollard *et al.*, 2008)

Figure 1.4 : Monomères d'acides gras les plus représentés dans la cutine

Tableau 1 : Les différents monomères retrouvés dans la cutine des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* adapté de Franke *et al.*, 2005

Figure 1.5 : Schéma de la perception des monomères d'acides gras libérés et perçus par
la plante (stress abiotiques) (Adapté de Fich *et al.*, 2016)

Figure 1.6 : Schéma simplifié de la biosynthèse de la cutine et de la polymérisation au
niveau de la cuticule

Figure 1.7 : Nomenclature des CYP450s basée sur leur pourcentage d'identité (adapté
de Werck-Reichhart *et al.*, 2000)

Figure 1.8 : Représentation schématisée de l'association du cytochrome P450 avec la
NADPH cytochrome P450 réductase sur la membrane du RE (adapté de Werck-
Reichhart *et al.*, 2000)

Figure 1.9 : Structure et séquences conservées des cytochrome P450s (d'après Werck-
Reichhart *et al.*, 2002)

Figure 1.10 : Formation et métabolisation de l'acide 10,16-dihydroxypalmitique dans les
fleurs chez *Arabidopsis thaliana* (Li-Beisson *et al.*, 2009)

Figure 1.11 : Voie menant de l'acide 18-hydroxyoléique à l'acide 9,10,18-
trihydroxystéarique d'après Croteau et Kolattukudy (1975)

Figure 1.12 : Schéma de la structure secondaire des α - β -hydrolases. Les α -hélices sont
représentées par des cylindres blancs et les feuilletts β par des flèches grises. On peut

observer la position de la triade catalytique très conservée (Nardini *et al.*, 1999)

Figure 1.13 : Mécanisme catalytique de l'hydrolyse d'époxyde ; Etape 1 de la réaction : Attaque nucléophile de l'époxyde par l'acide aspartique. Etape 2 de la réaction : Activation de la molécule d'eau par un résidu histidine et hydrolyse de la liaison ester entre l'enzyme et le produit et libération du diol

Figure 1.14 : Radiochromatogramme en HPLC des énantiomères de l'acide 9,10-époxytéarique produit par CYP77A4 (A), structure des énantiomères (B). (Sauveplane *et al.*, 2009)

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Tableau 2 : Lignées mutantes utilisées pour les analyses

Tableau 3 : Primers utilisés lors du géotypage des deux lignées de *CYP77B1* et *AtEH1*

Tableau 4 : Primers utilisés lors des RT-qPCR

Figure 2.1 : pDONR P4-P1R du système Gateway

Figure 2.2 : le vecteur pDONR207, « vecteur d'entrée » du système de clonage Gateway

Figure 2.3 : Structure du vecteur *pYeDP60* (9265 pb) pour l'expression dans la levure (Urban *et al.*, 1990)

Figure 2.4: Structure du vecteur *pGEM-T* pour le sous-clonage

Figure 2.5 : Séquence protéique de l'ancre de CYP73A92

Figure 2.6 : Gblock-77B1+overlap *pGEM-T* avec optimisation des codons

Tableau 5 : Le système Gibson utilisé pour la réaction de clonage

Tableau 6 : Noms et structures des composés utilisés

Figure 2.7 : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) de la plateforme métabolomique

Figure 2.8 : Résumé de la méthode de délipidation qui dure entre 8 et 10 jours (de la récolte des échantillons à l'analyse en GC-MS) (Jenkins *et al.*, 2015)

Figure 2.9 : Traitement de rosette d'*Arabidopsis thaliana* par spray

Chapitre 3 : Résultats :

Tableau 7 : Gènes co-régulés avec CYP77B1 (issu de la base de données CYPEDIA)

Figure 3.1: Représentation des différents stades floraux sur une hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* (Loupe binoculaire x10)

Figure 3.2 : Expression de *CYP77B1* dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* et dans différents stades floraux

Figure 3.3 : Expression de *CYP77B1* dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* dans différents stades floraux

Figure 3.4 : Expression de *CYP77B1* dans des fleurs ouvertes (Stade 4) d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure 3.5 : Expression du gène rapporteur *GUS* sous le contrôle du promoteur de *CYP77B1*

Figure 3.6 : Expression des gènes de la famille CYP77 chez les mutants des CYP77

Figure 3.7 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de C12 :0 en présence de microsomes de levures exprimant *CYP77B1* (A) ou *CYP94C1* (B) , en absence (Courbes vertes) ou en présence (Courbes bleues) de NADPH

Figure 3.8 : Analyse *in silico* des domaines transmembranaires de CYP77A4 (I), CYP77A6 (II) et CYP77B1 (III)

Figure 3.9 : Séquence protéique de l'ancre membranaire de CYP73A92

Figure 3.10 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de C12 :0 avec avec les microsomes exprimant *CYP77B1* modifié (A) avec NADPH (courbe bleue), sans NADPH (courbe verte), après l'incubation avec C18:1 (B) avec NADPH (courbe bleue) sans NADPH (courbe verte)

Figure 3.11 : Analyse en GC-MS des métabolites formés lors de l'incubation de l'acide laurique avec CYP77B1. L'incubation a lieu en présence (courbe noire) et en absence (courbe bleue) de NADPH. (A) (B) (C) Pic 1 et 2 obtenus sur la figure 3.12

Figure 3.12 : Formule chimique représentant (A) l'acide 11-hydroxylaurique (B) l'acide 10-hydroxylaurique (C) l'acide 9-hydroxylaurique dérivés avec leurs fragmentations en GC-MS

Figure 3.13: Analyse en GC-MS des métabolites formés lors de l'incubation de l'acide oléique avec CYP77B1. L'incubation a lieu en présence (courbe noire) et en absence (courbe bleue) de NADPH. (A) (B) (C) Pic 3 à 6 obtenus sur la figure 3.12

Figure 3.14 : Formule chimique représentant (A) l'acide 17-hydroxyoléique (B) l'acide 16- hydroxyoléique (C) l'acide 15- hydroxyoléique dérivatisés avec leurs fragmentations en GC-MS

Figure 3.15: Analyse en GC-MS des métabolites formés lors de l'incubation de l'acide oléique avec CYP77B1. L'incubation a lieu en présence (courbe noire) et en absence (courbe bleue) de NADPH. (A) (B) (C) Pic 3 à 6 obtenus sur la figure 3.12

Figure 3.16 : Formule chimique représentant (A) l'acide 17-hydroxyoléique (B) l'acide 16- hydroxyoléique (C) l'acide 15- hydroxyoléique dérivatisés avec leurs fragmentations en GC-MS

Figure 3.17 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de C18 :1 avec avec les microsomes exprimant *CYP77A4* modifié. L'incubation a lieu avec NADPH (courbe bleue), ou sans NADPH (courbe verte)

Tableau 8 : Gènes co-régulés avec le gène codant pour *CYP77A4* (issu de la base de données CYPEDIA)

Figure 3.18 : Alignement des séquences des acides aminés des séquences d'époxydes hydrolases d'*Arabidopsis thaliana* et autres organismes par CLUSTALW

Figure 3.19 : Localisation subcellulaire de AtEH1 chez *Arabidopsis thaliana*

Figure 3.20 : Etude de la localisation subcellulaire de AtEH1 d'*Arabidopsis thaliana* (AtEH1::GFP) par Western blot

Figure 3.21 : Radiochromatographie sur couche mince (TLC) des métabolites formés après l'incubation de l'acide 9,10 époxystéarique avec le cytosol de levures exprimant *AtEH1*

Figure 3.22 : Fragments obtenus lors de la fragmentation en GC-MS du dérivé de l'acide 9,10-dihydroxystéarique

Figure 3.23 : TIC obtenu après l'injection de AtEH1 avec ou sans acide 9,10-époxytéarique et analyse en GC-MS

Figure 3.24 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de l'acide 12,13-époxyoctadéc-9-énoïque avec le cytosol de levures exprimant *AtEH1*

Figure 3.25 : TIC (Total ion current intensity) obtenu après l'injection de AtEH1 avec et sans l'acide 12,13-époxyoctadéc-9-énoïque et analyse en GC-MS

Figure 3.26 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de l'acide palmitique avec les microsomes de levure exprimant *CYP94C1*

Figure 3.27 : Locus d'*AtEH1* et vérification des mutants. (a) Structure du gène *AtEH1* et sites d'intégration des T-DNA. (b) Analyse par RT-PCR de l'expression de *AtEH1* chez *Col0*, chez *Ateh1-1* et *Ateh1-2* ; Contrôle: *GAPC1* (*At3g04120*)

Figure 3.28 : Expression de *AtEH1* dans les organes d'*Arabidopsis thaliana*. L'expression de *AtEH1* a été étudiée par RT-qPCR et normalisée en utilisant les gènes de référence *EXP* (*At4g26410.1*) et *TIP41* (*At3g18780.2*)

Figure 3.29 : Expression relative de *AtEH1* dans les différents stades de développement de la graine chez *Arabidopsis thaliana* (D'après EFP Browser, données *in silico*)

Figure 3.30 : Composés époxydés et poly-hydroxylés issus du C18 :2

Figure 3.31 : Quantification relative de monomères de C18 époxydés et hydroxylés dans les graines et les feuilles de *Ateh1-1* et *Ateh1-1*

Figure 3.32 : Spectre MS/MS correspondant au 18-hydroxy-9,10 epoxy C18 :1

Figure 3.33 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de l'acide 9,10-époxytéarique avec les fractions solubles de levure exprimant *AtEH1* ou *AtEH1* mutée (*AtEH1)**

Figure 3.34 : Effet du stress osmotique sur la germination des graines. Les graines de *Col0* et des deux mutants *Ateh1-1* et *Ateh1-2* ont été semé sur milieu MS avec ou sans Mannitol 500mM

Figure 3.35 : Coloration aux sels de Tetrazolium (24h) de graines de *Col0* d'*Arabidopsis thaliana* et des mutants *Ateh1-1* et *Ateh1-2*

Figure 3.36: Perte hydrique au cours du temps après coupure des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* chez *Col0* par rapport aux deux mutants *Ateh1-1* et *Ateh1-2*

Figure 3.37 : Histoire évolutive de la famille des EHs. L'arbre a été réalisé en utilisant 132 séquences de 43 espèces. La souris, le rat et l'humain ont été utilisés comme groupe externe

Tableau 9 : Poids moléculaire et nombre d'acides aminés chez les différentes EHs d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 3.38 : Représentation de la position des 7 EHs sur les chromosomes

Tableau 10 : Identité de séquences entre les 7 EHs d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 3.39 : Expression des 7 EHs dans les fleurs et les feuilles au stade 8 semaines de plantes *Col0* et *Ateh1*

Figure 3.40 : Mesure de l'expression par RT-qPCR des 7 EHs suite à l'infection des feuilles par *Botrytis cinerea*

Figure 3.41 : Effet du traitement des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* par la cutinase de *Fusarium solanii* et mesure du niveau d'expression de plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes de défense de la plante

Figure 3.42 : Effet du traitement des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* avec des acides gras

Figure 3.43 : Expression de *PR1* lors des traitements de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* par deux énantiomères de diol à C18

Figure 3.44 : Expression de *PR1* lors des traitements de fleurs d'*Arabidopsis thaliana* par avec plusieurs formes d'acides gras libres

Figure 3.45 : Expression de *PR4* lors des traitements de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (A) ou de fleurs (B) avec plusieurs formes d'acides gras libres

Sommaire

CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	28
1.1 LA CUTICULE, BARRIERE PROTECTRICE DES PLANTES.....	28
1.1.1 COMPOSITION ET STRUCTURE	29
1.1.1.1 LA CUTINE	29
1.1.1.2 LA SUBERINE.....	32
1.1.2 ROLE BIOLOGIQUE DE LA CUTINE ET DE LA SUBERINE	33
1.1.3 BIOSYNTHESE DE LA CUTINE ET DE LA SUBERINE.....	36
1.1.3.1 HYDROXYLATION DES ACIDES GRAS PAR LES ENZYMES A CYTOCHROME P450.....	38
1.1.3.2 FORMATION DES ACIDES GRAS POLYHYDROXYLES	42
1.1.3.3 TRANSFERT DES ACIDES GRAS SUR LE GLYCEROL	44
1.1.3.4 TRANSPORT ET POLYMERISATION DES MONOMERES DE CUTINE :	44
1.2 LES EPOXYDES HYDROLASES	46
1.2.1 PROPRIETES DES EPOXYDES HYDROLASES.....	46
1.2.2 LES EHS ANIMALES.....	47
1.2.3 LES EHS CHEZ LES PLANTES	47
1.2.3.1 STEREOSELECTIVITE ET ENANTIOSELECTIVITE DES EHS DE PLANTES	49
1.2.3.2 REGULATION DES EHS DE PLANTES	50
1.2.3.3 ROLE DES EHS DANS LA DEFENSE DES PLANTES	51
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	55
2.1 MATERIEL VEGETAL.....	55
2.2 CONDITIONS DE CULTURE	55
2.2.1 CULTURE EN TERRE	55
2.2.2 STERILISATION DES GRAINES	56
2.2.3 CULTURE EN MILIEU SOLIDE	56

<u>2.3 GENOTYPAGE DE MUTANTS D'INSERTION</u>	<u>56</u>
2.3.1 EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE	56
2.3.2 PCR.....	57
<u>2.4 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR RT-QPCR.....</u>	<u>58</u>
2.4.1 MATERIEL VEGETAL	58
2.4.2 EXTRACTION D'ARN TOTAUX ET SYNTHÈSE D'ADNC.....	58
2.4.3 PCR QUANTITATIVE	58
<u>2.5 ETUDE DE L'EXPRESSION SPATIO-TEMPORELLE DE <i>CYP77B1</i> PAR LE GENE RAPPORTEUR <i>GUS</i>.....</u>	<u>61</u>
2.5.1 CONSTRUCTION D'UNE LIGNEE D'EXPRESSION PROMOTEUR-RAPPORTEUR <i>GUS</i>	61
2.5.2 SELECTION	62
2.5.3 COLORATION ET OBSERVATION.....	62
<u>2.6 ETUDE DE L'EXPRESSION SPATIO-TEMPORELLE DE <i>ATEH1</i></u>	<u>63</u>
2.6.1 CLONAGE DE <i>ATEH1</i> FUSIONNE A LA GFP.....	63
2.6.2. EXPRESSION TRANSITOIRE DANS LES FEUILLES DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	64
2.6.3 OBSERVATION PAR MICROSCOPIE CONFOCALE	65
2.6.4 EXTRACTION DES MICROSOMES DE FEUILLES DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	65
2.6.5 WESTERN BLOT	65
<u>2.7 MESURES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES</u>	<u>66</u>
2.7.1 CLONAGE DE LA SEQUENCE CODANTE DANS LE pYEDP60.....	66
2.7.2 MODIFICATION DE L'ANCRE DE <i>CYP77B1</i>	67
2.7.3 TRANSFORMATION D'UNE SOUCHE DE LEVURE WAT11	69
2.7.4 EXTRACTION DE MICROSOMES DE LEVURE	70
2.7.5 TESTS ENZYMATIQUES	70
2.7.6 MISE EN EVIDENCE DES PRODUITS FORMES LORS D'INCUBATIONS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	71
2.7.7 ANALYSE DES PRODUITS FORMES PAR GC-MS (CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE/SPECTROMETRIE DE MASSE)	72

<u>2.8 RECOLTE D'ECHANTILLONS POUR ANALYSE DU POLYMERE DE CUTINE</u>	<u>73</u>
<u>2.9 TRAITEMENTS DE FEUILLES D'ARABIDOPSIS THALIANA AVEC DES ACIDES GRAS LIBRES</u>	<u>74</u>
<u>2.20 TRAITEMENTS DE FEUILLES D'ARABIDOPSIS THALIANA AVEC DE LA CUTINASE DE FUSARIUM SOLANI</u>	<u>75</u>
<u>2.11 TEST DE PERMEABILITE</u>	<u>76</u>
2.11.1 COLORATION DU BLEU DE TOLUIDINE	76
2.11.2 COLORATION AUX SELS DE TETRAZOLIM	76
2.11.3 TEST DE PERTE HYDRIQUE	76
2.11.4 TEST DE STRESS SUR LA GERMINATION DES GRAINES	76
<u>CHAPITRE III : RESULTATS</u>	<u>79</u>
<u>PARTIE I : ETUDE DE CYP77B1</u>	<u>79</u>
<u>3.1 ETUDE IN SILICO D'UN GENE CANDIDAT CYP77B1</u>	<u>79</u>
<u>3.2 ETUDE DE LA LOCALISATION SPATIO-TEMPORELLE DE CYP77B1</u>	<u>80</u>
3.2.1 ETUDE DE L'EXPRESSION DE CYP77B1 EN FONCTION DE L'ORGANE DE LA PLANTE	80
3.2.2 ETUDE DE L'EXPRESSION DE CYP77B1 EN FONCTION DU STADE FLORAL	82
3.2.3 ETUDE DE L'EXPRESSION SPATIO-TEMPORELLE DE CYP77B1 PAR LE GENE RAPPORTEUR GUS	84
<u>3.3 ETUDE DE L'EXPRESSION DE CYP77B1 CHEZ CYP77A4 ET CYP77A6 ET EXPRESSION DE CYP77A4 ET CYP77A6 DANS UN MUTANT KNOCK-DOWN CYP77B1</u>	<u>85</u>
<u>3.4 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE IN VITRO DE CYP77B1</u>	<u>87</u>
3.4.1 ETUDE IN SILICO DES DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES DES P450S DE LA FAMILLE CYP77	88
3.4.2 MODIFICATION DU DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE DE CYP77B1	90
3.4.3 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE IN VITRO DE CYP77B1 MODIFIE	90

<u>3.5 IDENTIFICATION DES METABOLITES FORMES PAR CYP77B1</u>	<u>91</u>
3.5.1 HYDROXYLATION DANS LA CHAINE PAR CYP77B1.....	91
3.5.2 EPOXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE (C18 :2) PAR CYP77B1	98
<u>PARTIE II : ETUDE DE ATEH1.....</u>	<u>102</u>
<u>4.1 ETUDE <i>IN SILICO</i> D'UN GENE CANDIDAT <i>ATEH1</i>.....</u>	<u>102</u>
<u>4.2 ATEH1 EST UNE PROTEINE SOLUBLE LOCALISEE DANS LE CYTOSOL..</u>	<u>104</u>
4.2.1 EXPRESSION TRANSITOIRE DE <i>ATEH1</i> DANS LES FEUILLES DE <i>NICOTIANA</i> <i>BENTHAMIANA</i> ET OBSERVATION AU MICROSCOPE CONFOCAL	105
4.2.2 ETUDE DE LA LOCALISATION DE ATEH1 PAR WESTERN BLOT	107
<u>4.3 ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE ATEH1</u>	<u>108</u>
<u>4.4 ATEH1 EST IMPLIQUEE DANS LA SYNTHESE DE MONOMERES DE CUTINE</u> <u>.....</u>	<u>113</u>
<u>4.5 L'ACTIVITE DE ATEH1 EST DEPENDANTE DE L'ACIDE ASPARTIQUE EN</u> <u>POSITION 105</u>	<u>119</u>
<u>4.6 ETUDE DE LA PERMEABILITE DES MUTANTS <i>ATEH1-1</i> ET <i>ATEH1-2</i></u>	<u>120</u>
4.6.1 ROLE PHYSIOLOGIQUE DE ATEH1 DANS LA GRAINE.....	120
4.6.2 ETUDE DE LA PERMEABILITE DES FEUILLES DE <i>ATEH1-1</i> ET <i>ATEH1-2</i>	123
<u>4.7 MISE EN EVIDENCE D'AUTRES EPOXYDES HYDROLASES CHEZ</u> <u><i>ARABIDOPSIS THALIANA</i></u>	<u>124</u>
4.7.1 ETUDE PHYLOGENETIQUE DES EHS CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	124
4.7.2 ETUDE D'UN STRESS BIOTIQUE, L'INFECTION DE FEUILLES PAR <i>BOTRYTIS CINEREA</i> SUR L'EXPRESSION DES EHS CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	130
<u>PARTIE III : EFFET DES ACIDES GRAS LIBRES SUR L'EXPRESSION DE</u> <u>CERTAINS GENES IMPLIQUES DANS LA DEFENSE.....</u>	<u>132</u>
<u>5.1 TRAITEMENT DE ROSETTES AVEC LA CUTINASE DE <i>FUSARIUM SOLANII</i></u> <u>.....</u>	<u>132</u>

<u>5.2 TRAITEMENT DE ROSETTES D'ARABIDOPSIS THALIANA AVEC DES</u>	
<u>ACIDES GRAS LIBRES</u>	136
5.2.1 TRAITEMENT AVEC DES C16.....	136
5.2.2 TRAITEMENT AVEC DES C18.....	138
<u>CHAPITRE IV : DISCUSSION.....</u>	143
<u>PUBLICATIONS</u>	149
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	151

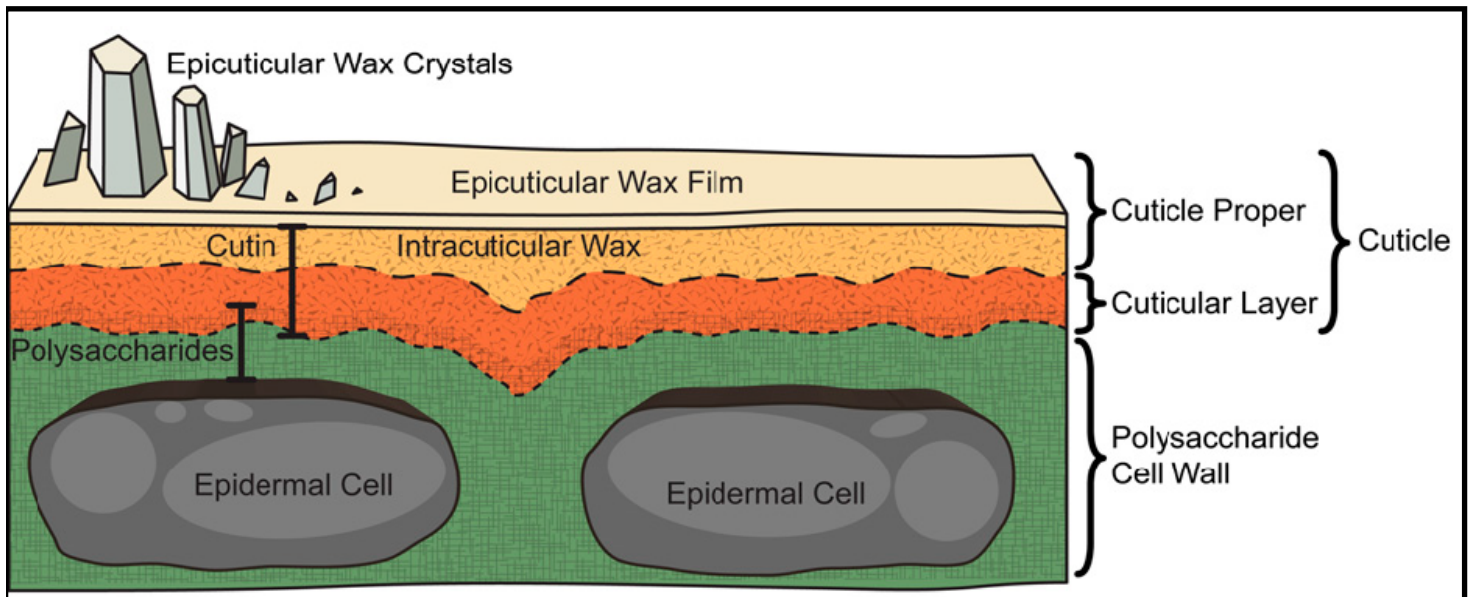
Chapitre I : Introduction
bibliographique

Chapitre I : Introduction bibliographique

1.1 La cuticule, barrière protectrice des plantes

Les plantes sont des organismes sessiles qui ne peuvent fuir des conditions défavorables et doivent par conséquent s'adapter à un environnement souvent hostile pour survivre. Chez les plantes vasculaires ainsi que chez certains bryophytes, les cellules épidermiques des parties aériennes sont recouvertes par la cuticule constituée des cires et de la cutine (**Figure 1.1A**) qui représentent une interface entre les parties aériennes de la plante et son environnement (Fernandez *et al.*, 2016). La cutine recouvre la surface externe de la paroi primaire des cellules épidermiques (**Figure 1.1 B**) et est un élément clé de la cuticule en tant que barrière physique (Sadler *et al.*, 2016). La subérine joue le même rôle que la cutine au niveau notamment des parties souterraines.

(A)



(B)

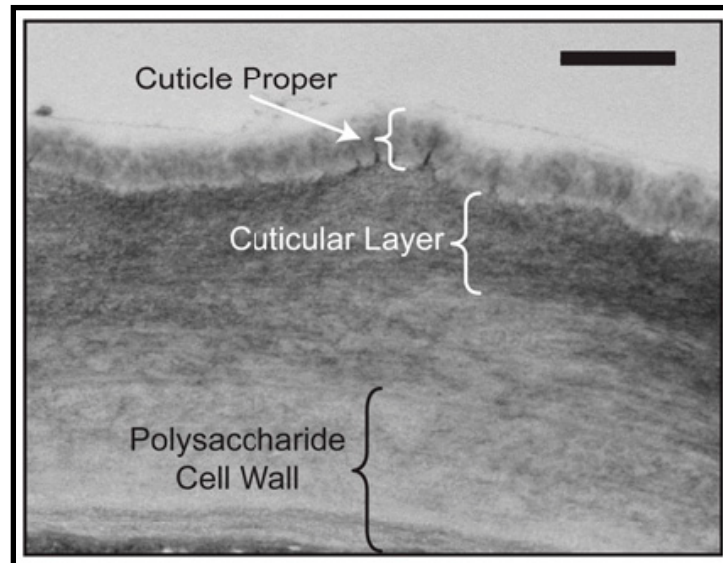


Figure 1.1 : Schéma représentant la structure de la cuticule et ses différentes couches (A) Image de microscopie électronique de la surface d'une feuille d'*Arabidopsis thaliana* (B). Echelle = 5mm (Yeats *et al.*, 2013)

1.1.1 Composition et structure

1.1.1.1 La cutine

La cutine, partie intégrante de la cuticule est un polymère lipidique constitué principalement d'acides gras en C16 et C18 hydroxylés et époxydés reliés entre eux par des liaisons esters mettant en jeu les groupements carboxyles et ω -hydroxyles des acides gras (Kollatukudy, 1980) (**Figure 1.2**). Un groupement ω -hydroxylé d'un monomère d'acide gras va réagir avec un groupement carboxyle pour former une liaison ester primaire. La formation de ces liaisons esters primaires joue un rôle clé dans la mise en place des longues chaînes linéaires d'acides gras et représente un événement important dans l'élongation du polymère de cutine.

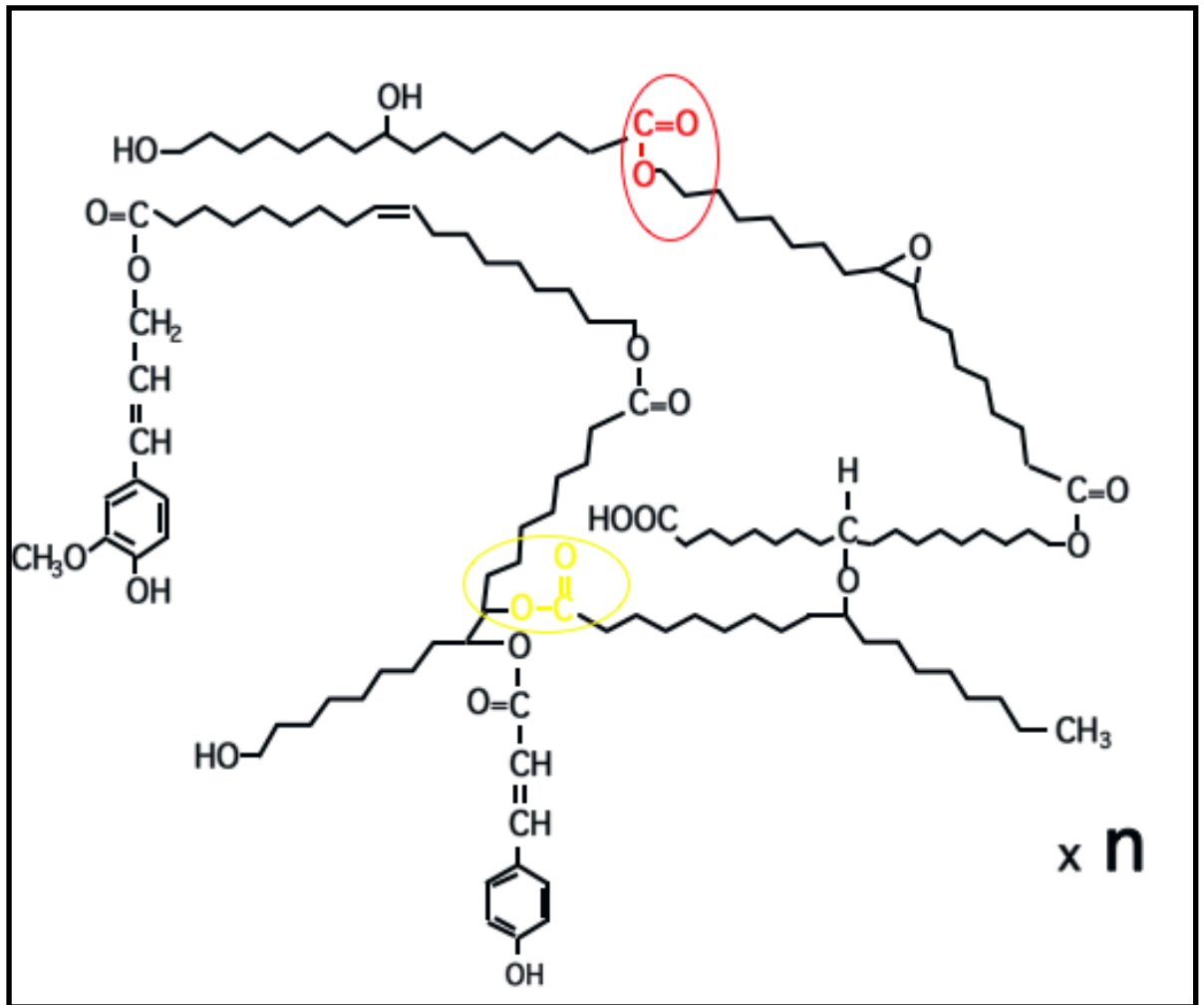


Figure 1.2 : Schéma représentant le polymère de cutine (Adapté de Kolattukudy, 1981), en rouge les liaisons esters primaires et en jaune les liaisons esters secondaires

Des études sur la structure de la cutine montrent qu'il existe également une réticulation entre ces chaînes linéaires d'acides gras (Pollard *et al.*, 2008, Beisson *et al.*, 2012, Fich *et al.*, 2016). Les groupements hydroxylés secondaires présents dans les monomères de C16 et C18 sont des éléments essentiels pour la formation de ces ramifications en formant des liaisons esters secondaires. La cutine peut être représentée comme une structure branchée de type dendrimère ou de type réseau (Figure 1.3) (Pollard *et al.*, 2008).

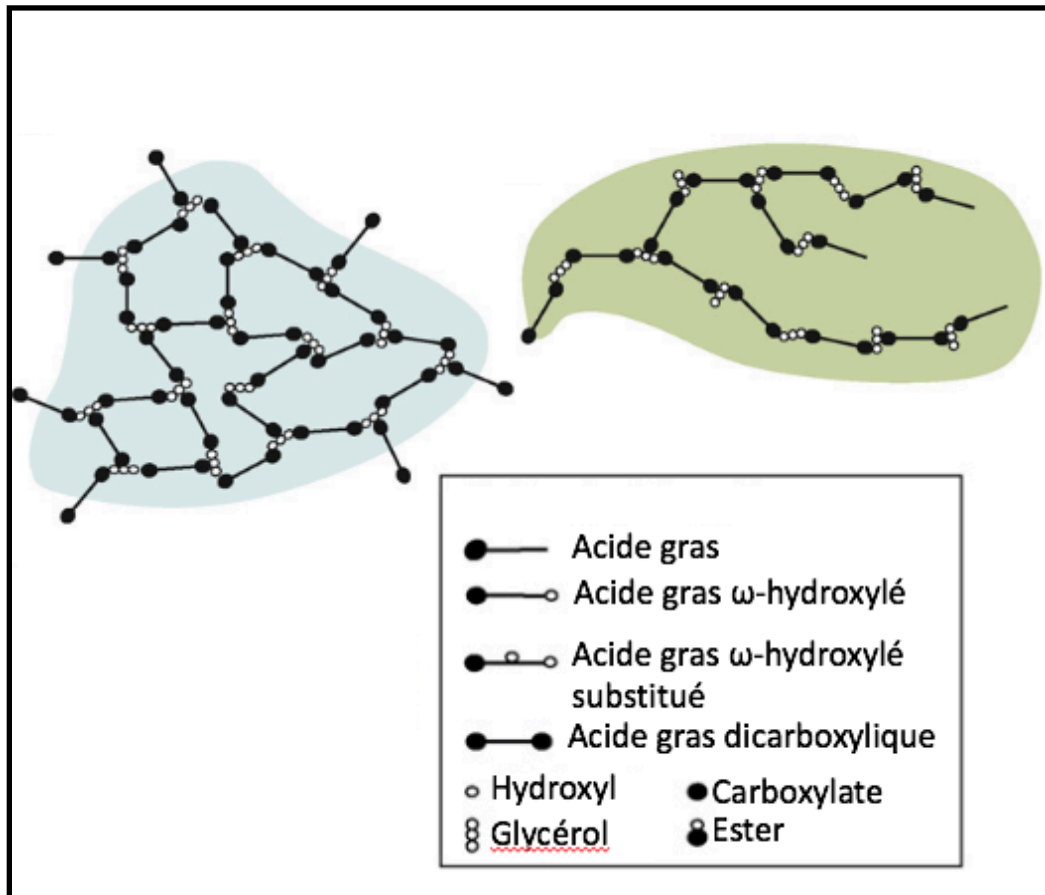


Figure 1.3 : Structure de la cutine en type réseau à gauche de la figure et en type dendrimère à droite (Pollard *et al.*, 2008)

L'architecture ainsi que la composition de la cutine varient en fonction de l'espèce, de l'organe mais aussi de l'ontogénèse (Jeffrey, 2006). L'épaisseur de la cutine peut varier jusqu'à 1000 fois en fonction de l'espèce, allant de 25 nm jusqu'à 25 μm (Li-Beisson 2011). Cependant, les acides gras les plus représentés dans les cutines sont les acides 18-hydroxy-9,10-époxy-stéarique et 9,10,18-trihydroxy-stéarique pour la famille des C18 et pour la famille des C16, l'acide 16-hydroxypalmitique et 10,16-dihydroxypalmitique (**Figure 1.4**). D'autres composés sont retrouvés de manière plus minoritaire (1-14% du poids total) comme le glycérol (Graca *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2016), ou des dérivés de l'acide cinnamique (Nawrath, 2002).

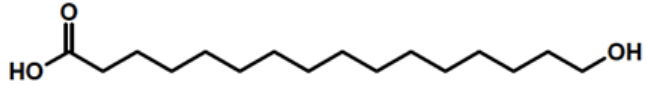
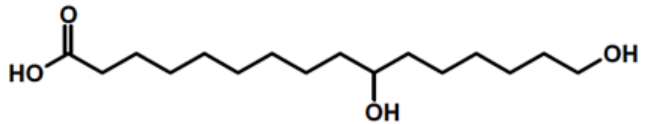
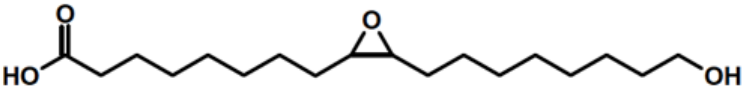
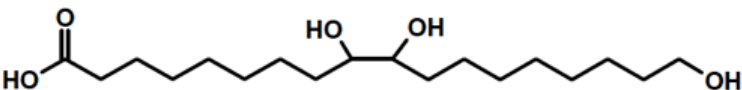
NOM	STRUCTURE
Acide 16-hydroxypalmitique	
Acide 10-16 dihydroxypalmitique	
Acide 18-hydroxy-9,10-époxystéarique	
Acide 9,10,18-trihydroxystéarique	

Figure 1.4 : Monomères d'acides gras les plus représentés dans la cutine

1.1.1.2 La Subérine

La subérine est généralement associée aux parties souterraines des plantes. Dans l'hypoderme et l'endoderme, les tissus d'étanchéité externes et internes des racines primaires, la subérine est déposée sous forme de lamelles à l'intérieur de la paroi cellulaire primaire proche de la membrane plasmique (Nawrath, 2002; Pollard *et al.*, 2008). La subérine est également présente dans les parties aériennes des plantes, comme par exemple dans la paroi cellulaire des tissus d'écorces, des cellules de gaine de graminées, des aiguilles de conifères et des graines (Kolattukudy, 2001; Bernards, 2002). Comme la cutine, la subérine est composée d'acides gras hydroxylés et dicarboxylés à 16 et 18 atomes de carbone, mais également d'acides gras plus longs à 20, 22 ou 24 carbones. Elle contient un pourcentage plus grand d'acides α - ω dicarboxyliques, plus d'acides hydroxycinnamiques et également plus de glycérol (14-26%). Cette combinaison d'acides α - ω dicarboxyliques en combinaison avec le glycérol lui donne une structure insoluble et plus rigide (Pollard *et al.*, 2008).

1.1.2 Rôle biologique de la cutine et de la subérine

La capacité de synthèse de la cutine et subérine a été acquise par les plantes au cours de la colonisation terrestre il y a 450 millions d'années environ (Kolattukuddy, 2001; Pollard *et al.*, 2008; Nawrath *et al.*, 2013; Dominguez *et al.*, 2015; Fich *et al.*, 2016). Leur caractère lipophile et leurs structures chimiques contribuent à protéger les plantes des nombreux stress environnementaux qui prévalent dans les écosystèmes terrestres. Nous pouvons citer les stress biotiques (champignons, pathogènes) et les stress abiotiques (agressions chimiques, UV, pertes hydriques) (Pollard *et al.*, 2008). De plus, cette structure empêche la fusion des organes car on a pu observer chez différents mutants d'*Arabidopsis* déficients en cutine, tel que le mutant *lacerata*, certaines malformations comme la fusion d'organes notamment au niveau des fleurs (Wellesen *et al.*, 2001).

La cutine ne joue pas seulement un rôle de barrière physique mais joue un rôle de réservoir de molécules possédant des propriétés physiologiques fondamentales. Cette hypothèse est corroborée par la présence, par exemple dans la cutine d'*Arabidopsis thaliana*, d'une cinquantaine de monomères différents (Franke *et al.*, 2005) (**Tableau 1**).

Monomère (taille de la chaîne)	% retrouvé dans les feuilles
<i>Acide gras saturé et insaturés</i>	<i>8.10</i>
Acide hexadécanoïque (C ₁₆)	1.32
Acide octadécanoïque (C ₁₈)	0.71
Acide eicosanoïque (C ₂₀)	0.51
Acide docosanoïque (C ₂₂)	1.71
Acide tetracosanoïque (C ₂₄)	2.56
Acide octadécenoïque (C _{18:1})	0.45
Acide octadécadiénoïque (C _{18:2})	0.82
<i>Alcools</i>	<i>1.57</i>
Hexadécanol (C ₁₆)	0.06
Octadécanol (C ₁₈)	0.42
Hexacosanol (C ₂₆)	0.37
Octacosanol (C ₂₈)	0.73
<i>ω-Hydroxyacides</i>	<i>7.01</i>
Acide 16-Hydroxy-hexadécanoïque (C ₁₆)	1.59

Acide 18-Hydroxy-octadecanoïque (C ₁₈)	0.42
Acide 18-Hydroxy-octadecénoïque (C _{18:1})	0.20
Acide 18-Hydroxy-octadécadiénoïque (C _{18:2})	2.36
Acide 18-Hydroxy-octadécatriénoïque (C _{18:3})	1.83
Acide 20-Hydroxy-eicosénoïque (C _{20:1})	0.60
<i>Acides α,ω-Dicarboxyliques</i>	40.93
Acide Hexadécane-1,16-dioïque (C ₁₆)	10.64
Acide Octadécane-1,18-dioïque (C ₁₈)	2.74
Acide Octadécène-1,18-dioïque (C _{18:1})	6.58
Acide Octadécadiène-1,18-dioïque (C _{18:2})	20.97
<i>2-Hydroxyacides</i>	13.93
Acide 2-Hydroxy-hexadécanoïque (C ₁₆)	0.23
Acide 2-Hydroxy-octadécanoïque (C ₁₈)	0.33
Acide 2-Hydroxy-eicosanoïque (C ₂₀)	1.43
Acide 2-Hydroxy-docosanoïque (C ₂₂)	1.50
Acide 2-Hydroxy-tricosanoïque (C ₂₃)	0.48
Acide 2-Hydroxy-tétracosanoïque (C ₂₄)	4.52
Acide 2-Hydroxy-pentacosanoïque (C ₂₅)	0.42
Acide 2-Hydroxy-hexacosanoïque (C ₂₆)	2.30
Acide 2-Hydroxy-octacosanoïque (C ₂₈)	1.47
Acide 2-Hydroxy-tétracosénoïque (C ₂₄ (1))	1.26
<i>"Mid-chain" hydroxyacides</i>	8.64
Acide 9(10)-Hydroxy-hexadécane-1,16-dioïque (C ₁₆)	1.43
Acide 9(10),16-Dihydroxy-hexadécanoïque (C ₁₆)	1.17
<i>Acides gras hydroxylés dans la chaîne non identifiés</i>	6.04
<i>Composés aliphatiques</i>	19.82
Total	100.0

Tableau 1 : Les différents monomères retrouvés dans la cuticule de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* adapté de Franke *et al.*, 2005

Différents travaux ont montré que les monomères de cutine ainsi que certains acides gras oxydés peuvent agir comme des signaux dans les interactions plantes-pathogènes et possèdent également des propriétés antimicrobiennes (Schweizer *et al.*, 1996a, ; Raffaele *et al.*, 2009). Prost *et al.*, (2005) ont démontré des activités antimicrobiennes des différents C18 oxydés, parmi eux de nombreux diols ayant des structures très semblables à celles retrouvées dans la cutine. La cutine peut être considérée comme un réservoir de molécules d'oxylipines ayant de nombreux effets biologiques (Reina-Pinto et Yephremov 2009). Sa dégradation par

les cutinases, enzymes hydrolytiques de pathogènes, est la première étape dans les processus d'infection (Carvahlo *et al.*, 1999). Cela aboutit à la libération de monomères de cutine qui représente un événement clé dans l'interaction plante-pathogène puisque les monomères libérés peuvent être perçus par les cellules de la plante comme des signaux endogènes de stress (Schweizer *et al.*, 1996a) et participer à la résistance de la plante (Schweizer *et al.*, 1996b) (**Figure 1.5**).

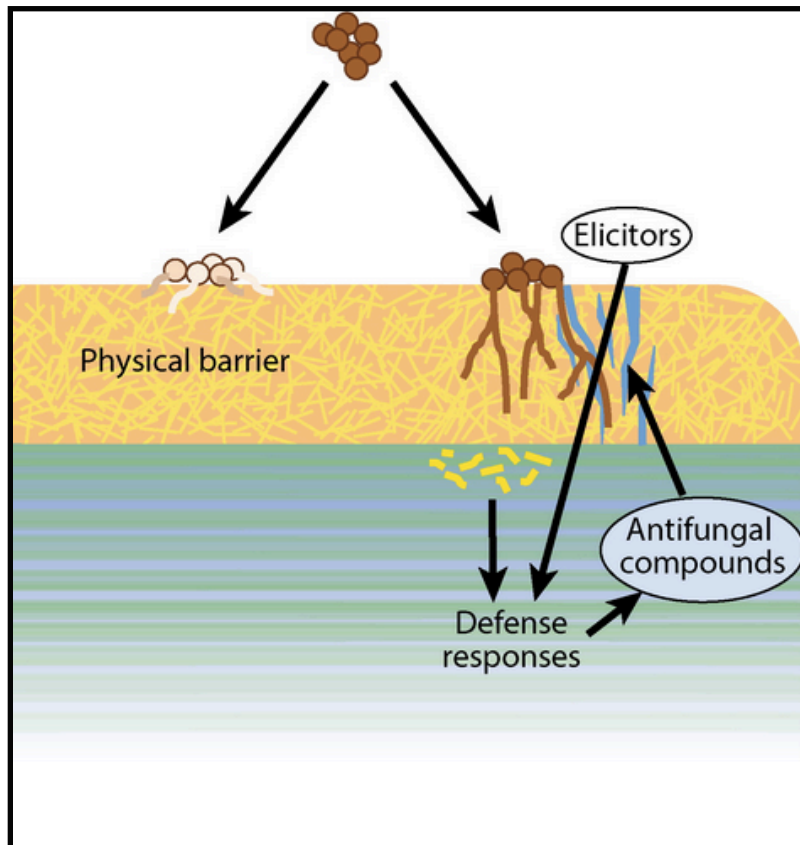


Figure 1.5 : Schéma de la libération des monomères d'acides gras et perception par la plante (stress abiotiques) (Adapté de Fich *et al.*, 2016). Les monomères d'acides gras agissent en tant qu'éliciteurs des réactions de défense pour produire des composés antifongiques.

Dans ces études, l'acide 18-hydroxy-9,10-époxy-stéarique (**Figure 1.4**), et le dérivé ω -hydroxylé de l'acide 9,10-dihydroxystéarique sont les plus efficaces parmi les composés testés. A de très faibles concentrations, ces composés induisent la production de peroxyde d'hydrogène ainsi que des réactions de défense (Kauss *et al.*, 1999). Bien qu'il soit difficile de déterminer la nature et la concentration des monomères de cutine pendant une infection,

l'hypothèse que ces monomères puissent être perçus par la plante a été testée chez l'orge ainsi que chez le riz avec des analogues synthétiques (Schweizer *et al.*, 1996a). Deux monomères de C18 ont été utilisés pour ces études. L'orge traité avec ces monomères de cutine devient résistant à l'infection par *Erysiphe graminis* et le riz plus résistant à l'infection par *Magnaporthe grisea* (Schweizer *et al.*, 1996b). Dans une autre étude, le traitement de culture de cellules de pommes de terre avec des monomères de cutine induit une alcalinisation du milieu, la production d'éthylène et induit l'expression de gènes de défense (PR) (Schweizer *et al.*, 1996a). Dans cette étude, le monomère testé le plus actif est l'acide hydroxypalmitique, un composant majeur de la subérine de pomme de terre.

Les monomères de cutine peuvent au contraire agir comme des signaux en faveur des pathogènes. Cette observation a été démontrée dans le cas de la formation de l'appressorium de *Magnaporthe grisea* et *Erysiphe graminis* qui est particulièrement induite par les monomères d'acides gras libérés par les cutinases (Francis *et al.*, 1996 ; Gilbert *et al.*, 1996). Les constituants des cires peuvent stimuler le développement des champignons pathogènes. Par exemple, les extraits de cires de l'avocat, incluant des terpénoides, induisent la germination et la formation de l'appressorium chez *Colletotrichum gloeosporioides*, un pathogène de l'avocat, alors que les extraits de cires d'autres plantes n'ont aucun effet (Podila *et al.*, 1993 ; Kolattukudy *et al.*, 1995). Plus récemment, l'utilisation de plantes transgéniques a permis de confirmer que certains monomères de cutine agissent en faveur des pathogènes. En effet, le mutant de la cuticule *lacs2* (*long-chain acyl-CoA Synthetase* ; Schnurr *et al.*, 2004), identique au mutant *bre1* (*Botrytis resistant* ; Bessire *et al.*, 2007), présente une cuticule plus fine que le WT et contient moins de monomères dicarboxyliques et pourtant ce mutant est plus résistant à *Botrytis cinerea*. Un autre mutant *pec1* (*permeable cuticle 1*) est knockout pour le gène codant pour le transporteur ABCG32, transporteur ABC localisé sur la membrane plasmique des cellules épidermiques qui permet le transport des précurseurs des composés de la cutine vers la cuticule, est également plus résistant à *Botrytis cinerea* (Bessire *et al.*, 2011). Dans ces études, les auteurs suggèrent que cette augmentation de la résistance malgré une cutine plus fine provient vraisemblablement de l'absence d'un ou plusieurs monomères de cutine qui normalement agissent en faveur du pathogène.

1.1.3 Biosynthèse de la cutine et de la subérine

La production de monomères de cutine est dérivée d'acides gras synthétisés dans les plastes puis transformés par une série d'enzymes principalement localisées dans le réticulum

endoplasmique. La synthèse de la cutine est localisée dans les cellules épidermiques et la polymérisation se fait au niveau de la cuticule alors que la subérine est synthétisée dans des cellules très spécifiques comme l'endoderme de la racine (Kolattukudy *et al.*, 1981). Bien que la synthèse de cutine et subérine se fasse à des endroits différents de la plante, leur biosynthèse comporte des points communs.

Après leur synthèse dans les plastes (**Figure 1.6**), les acides gras sont activés en esters d'acyl-CoA par des enzymes de type LACS (pour long chain acyl-CoA synthétase). Deux membres de cette famille d'enzyme, LACS1 et LACS2, jouent un rôle essentiel dans la formation de la cutine chez *Arabidopsis thaliana*. D'une part, les plantes ayant des mutations dans LACS1 présentent une diminution jusqu'à 40% des monomères de C16 dans la tige et les feuilles (Lü *et al.*, 2009) ce qui suggère son implication dans la biosynthèse de la cutine. D'autre part, le mutant d'insertion (T-DNA) *lacs2* présente une cuticule plus fine, une augmentation du lessivage de la chlorophylle et de plus petites feuilles, ce qui traduit une modification de la perméabilité cuticulaire (Weng *et al.*, 2010).

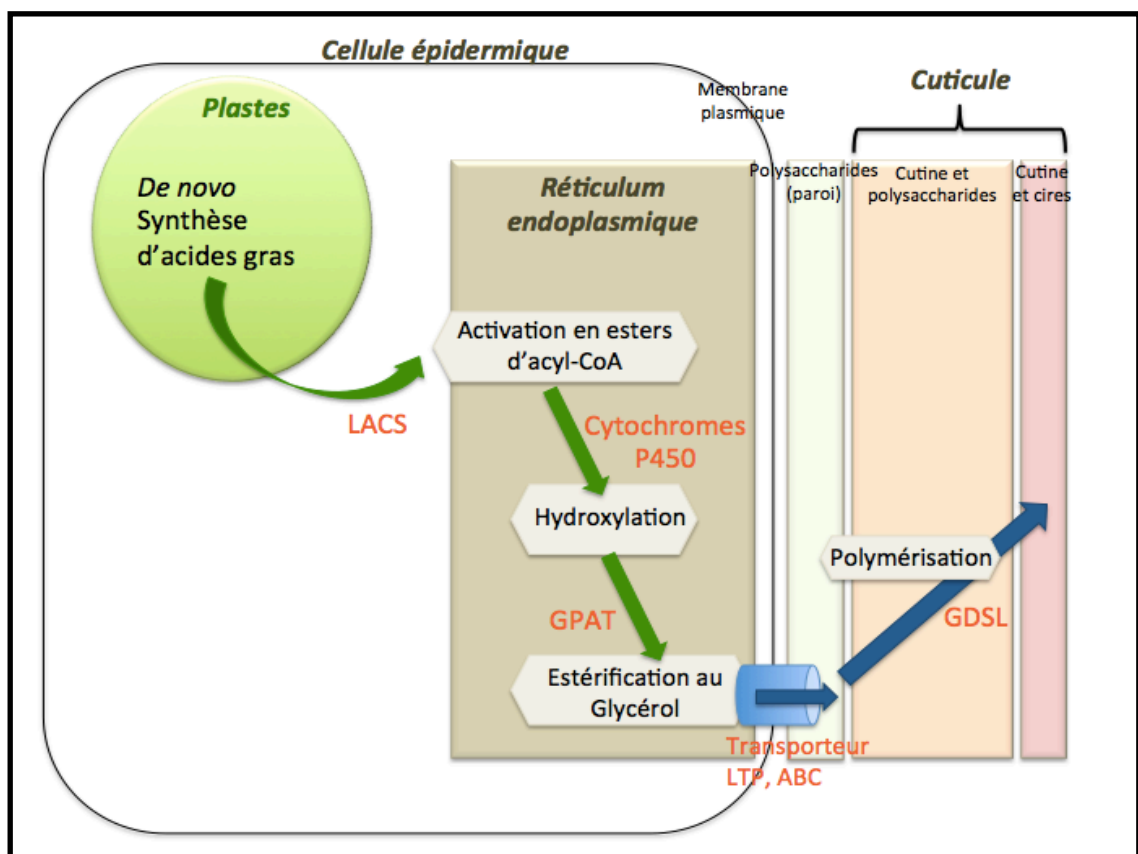


Figure 1.6 : Schéma simplifié de la biosynthèse de la cutine et de la polymérisation au niveau de la cuticule

1.1.3.1 Hydroxylation des acides gras par les enzymes à Cytochrome P450

La cutine et la subérine sont des polymères d'acides gras reliés entre eux par des liaisons esters primaires et secondaires impliquant respectivement des groupements hydroxyles primaires et secondaires. Leur analyse a révélé la prédominance de liaison esters primaires, ce qui confère aux ω -hydroxylases, responsables de la formation des hydroxylations primaires, un rôle majeur à jouer dans la mise en place de ces structures. En effet, l'introduction de la fonction hydroxyle terminale est l'étape clé qui va permettre la réaction de condensation pour la polymérisation de ces monomères (Kolattukudy *et al.*, 1981). Les ω -hydroxylases d'acides gras sont des cytochromes P450 qui forment la plus vaste famille de protéines enzymatiques chez les plantes, avec plus de 250 gènes chez *Arabidopsis thaliana* (Mizutani et Ohta, 2010) classés dans 47 familles (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/>) ainsi que de nombreuses sous-familles. Les P450s sont classés en famille (par exemple CYP77), et sous-familles (par exemple CYP77B1) en fonction de leur pourcentage d'identité (**Figure 1.7**). Des enzymes partageant 40% d'identité de séquence d'acides aminés font partie d'une même famille et à partir de 55% d'identité alors ils sont classés dans la même sous famille.

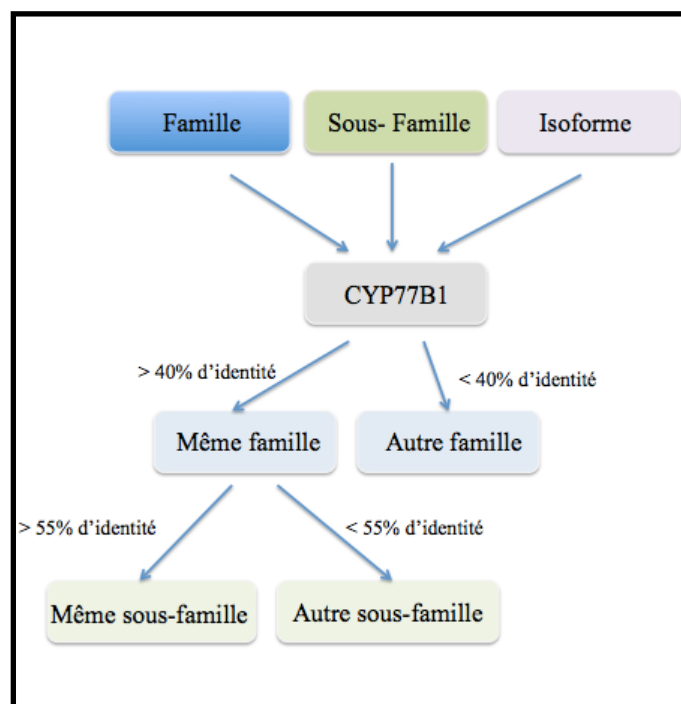


Figure 1.7 : Nomenclature des CYP450s basée sur leur pourcentage d'identité (adapté de Werck-Reichhart *et al.*, 2000). Les pourcentages d'identité de séquences permettent de déterminer les familles (40% d'identité) et sous familles (55% d'identité).

Les cytochromes P450s sont des hémoprotéines membranaires généralement localisées au niveau du réticulum endoplasmique. Leur nom vient du fait que ces enzymes absorbent préférentiellement la lumière à une longueur d'onde de 450 nm.

En présence d'oxygène moléculaire, du cofacteur NADPH+H⁺ et de l'enzyme NADPH cytochrome P450 réductase, les cytochromes P450 catalysent l'insertion d'un atome d'oxygène dans une molécule substrat (R) (**Figure 1.8**) :

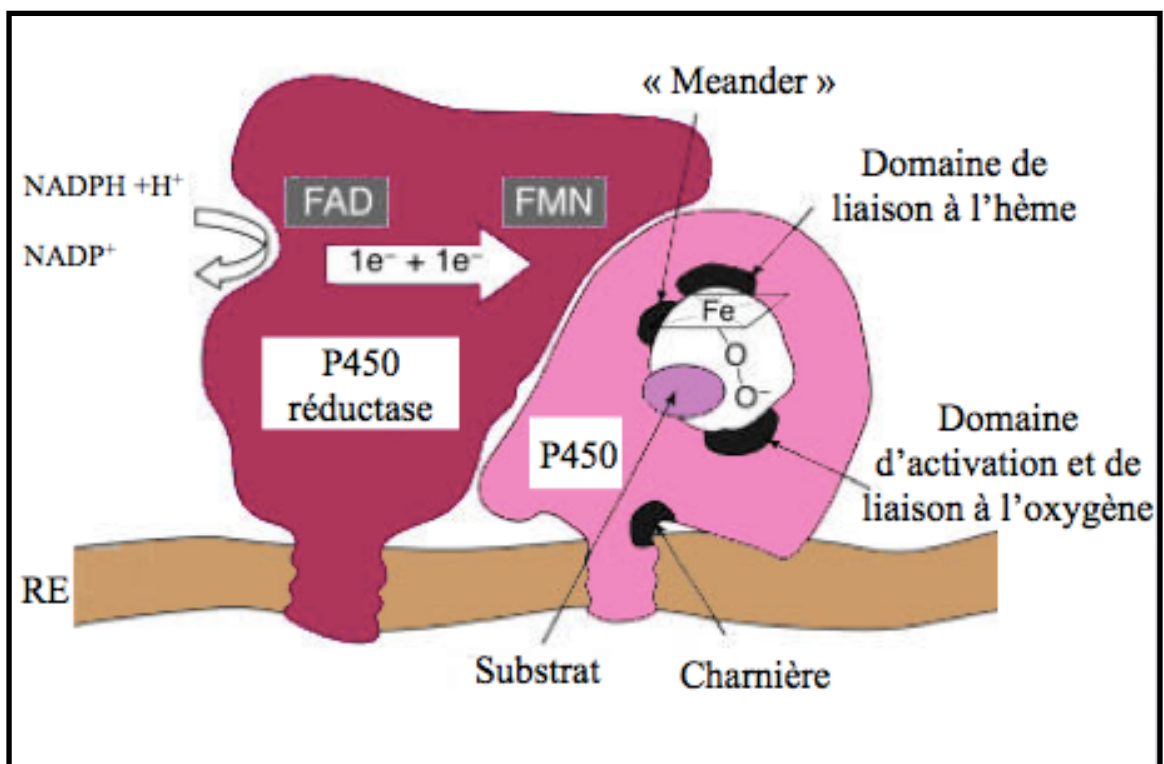


Figure 1.8 : Représentation schématisée de l'association du cytochrome P450 avec la NADPH cytochrome P450 réductase sur la membrane du réticulum endoplasmique (adapté de Werck-Reichhart *et al.*, 2000). Grâce au domaine de liaison à l'hème du cytochrome P450 qui intervient dans cette réaction d'oxydoréduction. La réductase permet la réduction du NADPH et libération d'un H⁺ nécessaire à la réaction.

Chez les plantes les cytochromes P450s ont 4 domaines caractéristiques incluant notamment une région charnière permettant l'ancrage en N-Terminal à la partie globulaire cytosolique (**Figure 1.10**). L'analyse de plusieurs séquences de P450s de plantes a montré que des peptides signaux pourraient permettre l'adressage aux plastes ou aux mitochondries. (Watson *et al.*, 2001). On retrouve également un domaine d'activation et de liaison à l'oxygène (A/G-G-X-E/D-T-T/S), une triade E-R-R qui assure la structure tridimensionnelle de la poche hydrophobe nécessaire au maintien de l'hème et une cystéine très conservée entourée d'autres acides aminés spécifiques qui permet la fixation de l'hème (F-X-X-G-X-R-X-C-X-G) (**Figure 1.9**).

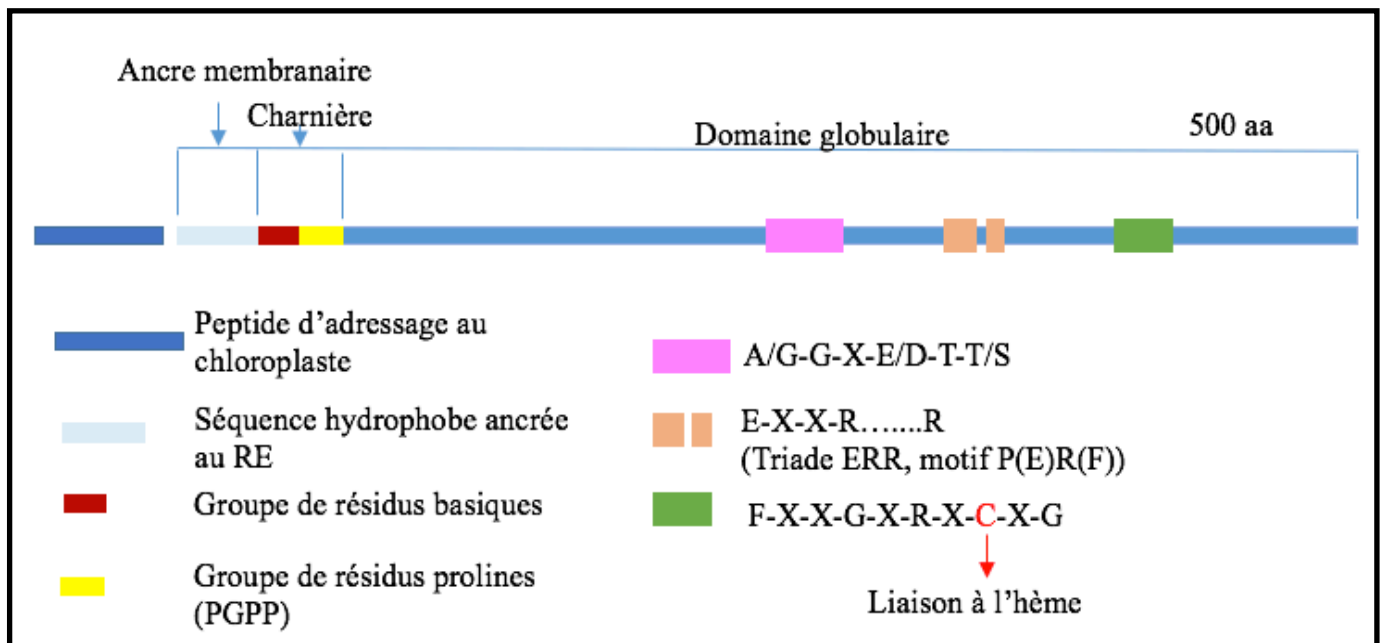


Figure 1.9 : Structure et séquences conservées des cytochrome P450s (d'après Werck-Reichhart *et al.*, 2002)

Les cytochromes P450s sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques chez la plante. On peut citer par exemple la voie des phénylpropanoïdes conduisant à la synthèse de lignine et sporopollénine (pollen) (Morant *et al.*, 2007) mais aussi dans la biosynthèse et le catabolisme d'hormones (Heitz *et al.*, 2012), la synthèse d'enveloppe protectrice comme la cutine et bien d'autres rôles chez la plante.

Le rôle clé d'hydroxylases d'acides gras de type P450, appartenant notamment aux familles des CYP86, dans la mise en place de ces structures a été clairement établi par des

approches biochimiques et génétiques (Pinot et Beisson, 2011). CYP86A1, exprimé dans le système hétérologue de levure, est capable d' ω -hydroxyler *in vitro* tous les acides gras (sauf le C18 :0) des C12 aux C18 avec plusieurs degrés d'insaturation et métabolise avec la meilleure efficacité l'acide palmitique (Benveniste *et al.*, 1998). Une approche de génétique inverse a permis de montrer le rôle de CYP86B1 dans la biosynthèse de la subérine au niveau de la racine et de la graine chez *Arabidopsis thaliana*. En effet, le mutant KO pour *CYP86B1*, contrairement au type sauvage, ne contient pas de dérivés ω -hydroxylés de C22 et C24 au niveau de la subérine racinaire et de l'enveloppe de la graine (Compagnon *et al.*, 2009). La même stratégie a permis de démontrer l'implication d'une seconde ω -hydroxylase, CYP86A1 (Höfer *et al.*, 2008) dans la biosynthèse de subérine dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*. En effet, chez le mutant, on peut observer une nette réduction des acides gras ω -hydroxylés possédant une chaîne aliphatique avec moins de 20 carbones.

Les fonctions hydroxyles primaires apportées par les ω -hydroxylases de type CYP86A1 ou 86A2 vont donc permettre la formation des liaisons esters primaires. La cutine et la subérine, dans leur architecture, possèdent également comme nous l'avons vu précédemment, des liaisons de type ester secondaire. Pour leur formation, ces liaisons nécessitent la présence d'hydroxyles secondaires, dont il a été démontré qu'elles peuvent être produites *in vitro* par des « in chain » hydroxylases (Salaun *et al.*, 1978, 1981). Cette étude a montré que l'acide laurique (substrat modèle) est hydroxylé sur les carbones 8,9 ou 10 dans les microsomes de tubercules de topinambour. Récemment, une « in-chain » hydroxylase, appartenant à la famille des CYP77 : CYP77A6 (Li-Beisson *et al.*, 2009) a été clonée chez *Arabidopsis thaliana* (Li Beisson *et al.*, 2009) puis exprimée de façon hétérologue dans la levure. Dans un premier temps, une approche biochimique a permis de montrer que cette enzyme est capable de produire *in vitro* l'acide 10,16-dihydroxypalmitique (DHP) (**Figure 1.10**), ceci lorsque l'acide palmitique a d'abord subi une ω -hydroxylation par CYP86A4. L'analyse du mutant Knock-out (KO) pour *CYP77A6* a confirmé la participation de CYP77A6 dans la biosynthèse de cutine. En effet, le DHP n'est pas présent dans la cutine de *cyp77a6* en particulier au niveau des pétales (Li-Beisson *et al.*, 2009).

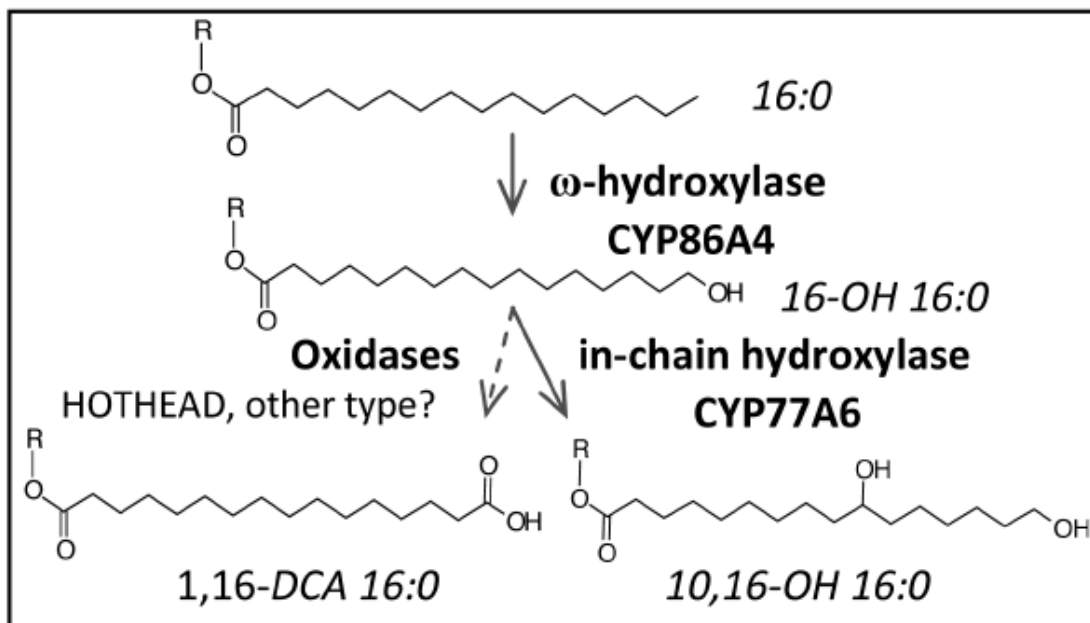


Figure 1.10 : Formation et métabolisation de l'acide 10,16-dihydroxypalmitique dans les fleurs chez *Arabidopsis thaliana* (Li-Beisson *et al.*, 2009)

1.1.3.2 Formation des acides gras polyhydroxylés

Les dérivés du C18 peuvent représenter jusqu'à 60% des monomères de la cutine dans certaines espèces (Holloway 1973). Ils portent fréquemment un groupe époxy ou diol vicinal sur la position C9 et C10. Ces diols vicinaux interviennent certainement dans la formation d'esters secondaires. Les enzymes responsables de la formation d'époxydes et de diols vicinaux dans le polymère de cutine n'ont pas été identifiées. Des travaux pionniers entrepris avec des extraits d'épinards et de pommes ont permis à Croteau et Kolattukudy (1975) de proposer une voie menant de l'acide 18-hydroxyléique à l'acide 9,10,18-trihydroxystéarique (**Figure 1.11**). Cette voie implique un cytochrome P450 capable d'époxyder des acides gras et une époxyde hydrolase (EH) responsable de l'hydrolyse des époxydes en diols vicinaux.

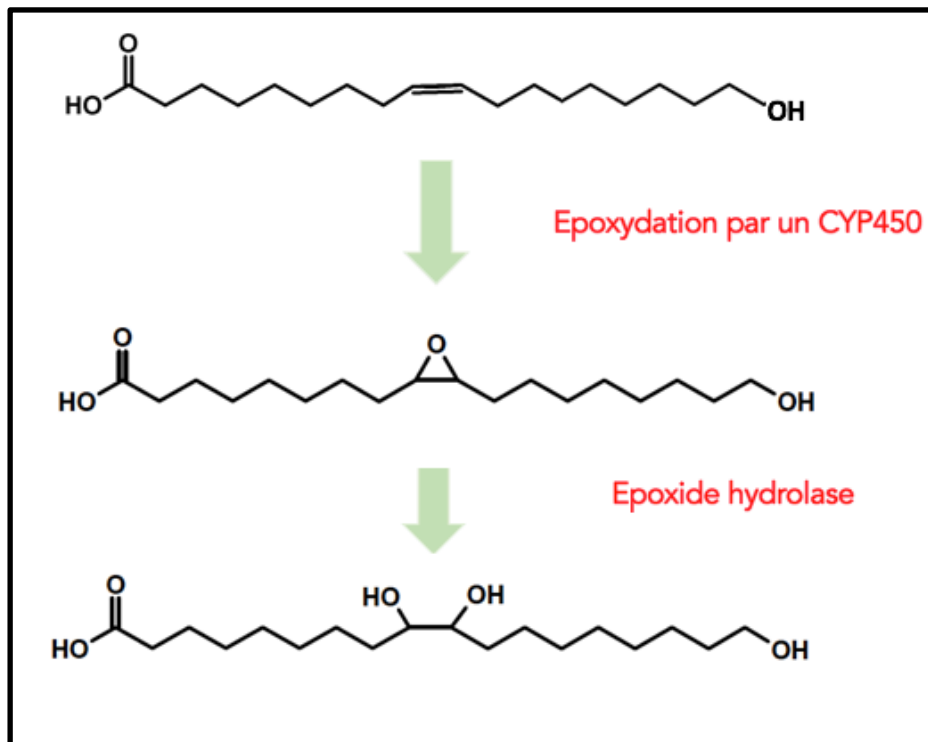


Figure 1.11 : Voie menant de l'acide 18-hydroxyoléique à l'acide 9,10,18-trihydroxystéarique d'après Croteau et Kolattukudy (1975)

Les informations sur les cytochromes P450 capables d'époxyder les acides gras insaturés sont peu nombreuses. Cependant, des études biochimiques précédemment réalisées au laboratoire sur des analogues insaturés de l'acide laurique (C12 :0) ont clairement démontré l'existence de cytochromes P450 capables d'époxyder une double liaison. Par exemple l'acide 11-dodécénoïque est converti en acide 11,12 époxylaurique par un CYP450 dans les microsomes de *Vicia sativa* (Weissbart *et al.*, 1992). L'époxydation d'analogues de l'acide laurique insaturé dans la chaîne a également été montrée avec des microsomes de tubercules de topinambour et de plantules de blé (Salaun *et al.*, 1992 ; Salaun *et al.*, 1993). Plus récemment, un cytochrome capable d'époxyder les acides gras insaturés a été décrit au laboratoire. CYP77A4 d'*Arabidopsis thaliana* a été cloné puis exprimé de manière hétérologue dans le système levure. Des incubations de microsomes de levures transformées en présence d'acides gras en C18 a permis de montrer que CYP77A4 est capable d'époxyder les acides gras insaturés comme les acides C18 :1, C18 :2 et C18 :3 (Sauveplane *et al.*, 2009). Ce P450 constitue un candidat potentiel pour une participation à la formation des acides gras polyhydroxylés (Sauveplane *et al.*, 2009). Des travaux non publiés du laboratoire confirment l'implication de CYP77A4 dans la biosynthèse de la cutine chez *Arabidopsis thaliana*.

Concernant les époxydes hydrolases de plantes qui convertissent les époxydes en diol, comme nous le verrons à la fin de ce chapitre, malgré une première description il y a plus de 40 ans (Croteau et Kolattukudy, 1975) puis leur clonage à partir de différentes plantes, une vingtaine d'années plus tard, aucun rôle physiologique n'a pu leur être attribué avant mon travail de thèse.

1.1.3.3 Transfert des acides gras sur le glycérol

Lors du processus de biosynthèse de cutine, les acides gras passent par un intermédiaire où ils sont liés au glycérol. Pour ceci, des glycérol-3-phosphate acyltransférases (GPATs) transportent l'acide gras sur le squelette glycérol (**Figure 1.6**). Contrairement à la majorité des enzymes de type GPATs qui sont spécifiques de la position sn-1, celles impliquées dans la biosynthèse de cutine transfèrent les acyls en sn-2 (Yang *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2012).

Une famille de 8 GPATs a été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* sur la base des motifs conservés d'acyltransférases et sur l'activité testée *in vitro* d'acyltransférases exprimées dans la levure (Zheng *et al.*, 2003). Il a été démontré qu'aucune d'entre elles ne participe à la formation de la membrane ou au stockage des lipides. La première mise en évidence du rôle des acyltransférases dans la formation des polyesters est l'implication de GPAT5 dans la formation de la subérine au niveau des racines et des graines (Beisson *et al.*, 2007). Trois autres GPATs (GPAT4/6/8) jouent un rôle essentiel dans la formation de la cutine dans les feuilles et les fleurs (Li *et al.*, 2007a). Ces trois protéines possèdent également une activité phosphatase. L'expression *in vitro* dans la levure a permis de montrer que GPAT2, 4, 5 et 8 catalysent l'acylation sur la position sn-2 du glycérol-3-phosphate (Yang *et al.*, 2010, 2012).

1.1.3.4 Transport et polymérisation des monomères de cutine

Les LTPs (protéines de transport de lipides) sont très souvent exprimées sur les sites de synthèse de la cutine et de la subérine. Ceci suggère qu'elles sont impliquées dans cette synthèse. De plus, la plupart des LTPs sont extracellulaires (Kolattukudy, 2001). Ces protéines sont donc de bons candidats pour le transport des constituants de la cutine.

Jusqu'à très récemment, le site et la nature des enzymes qui catalysent la réaction de polymérisation des précurseurs du polymère de cutine étaient inconnus. L'hypothèse que la

polymérisation soit extracellulaire est fortement suggérée par l'excrétion des monoacylglycérol sn-2 et des acides gras libres chez *Arabidopsis thaliana* comme c'est le cas chez les surexprimeurs de GPAT5 (Li *et al.*, 2007). De plus, la caractérisation de mutants chez la tomate pour CD1/GDSL1 ou CUS1, un membre de la famille des lipases (GDSL), qui comportent une cutine plus fine de 5-10% comparée au WT (Yeats *et al.*, 2013 ; Girard *et al.*, 2012 ; Phillippe *et al.*, 2016) montre que cette protéine est une cutine synthase. En effet, cette protéine est particulièrement abondante dans la cuticule de la tomate. Elle est capable de catalyser une réaction d'estérification primaire ou secondaire de groupement hydroxylés sur les acides 10-16 dihydroxypalmitique (Phillippe *et al.*, 2016).

1.2 Les Epoxydes Hydrolases

1.2.1 Propriétés des Epoxydes Hydrolases

Les époxydes hydrolases (EH) appartiennent à la famille des α - β -hydrolases (**Figure 1.12**). et convertissent les fonctions époxydes en diols vicinaux par addition d'une molécule d'eau (Morisseau et Hammock, 2005) (**Figure 1.11**).

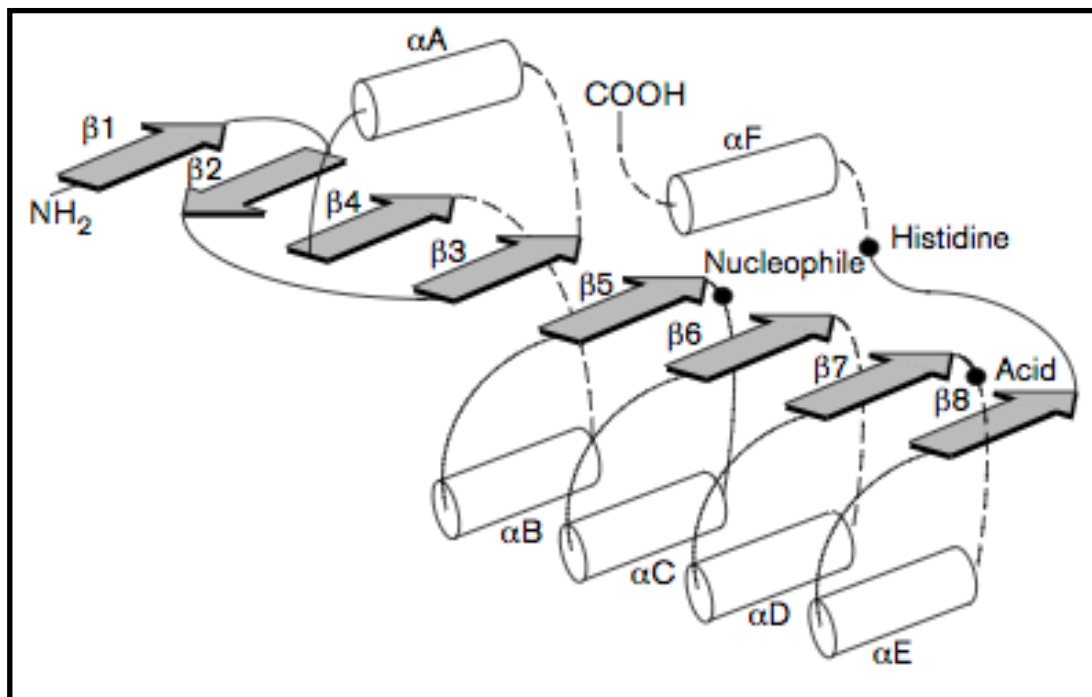


Figure 1.12 : Schéma de la structure secondaire des α - β -hydrolases. Les hélices α sont représentées par des cylindres blancs et les feuillets β par des flèches grises. On peut observer la position de la triade catalytique très conservée (Nardini *et al.*, 1999)

Elles sont présentes chez tous les organismes vivants, des microorganismes aux mammifères ainsi que chez les invertébrés et les plantes (Morisseau et Hammock, 2013). Chez les micro-organismes comme par exemple, *Rhodococcus erythropolis*, une EH essentielle pour le métabolisme et l'assimilation des sources de carbone a été caractérisée notamment dans la voie de dégradation du limonène (Van der Werf *et al.*, 1999). Chez les champignons les EHs participent à la synthèse des mycotoxines (Bradshaw et Zhang, 2006). Chez les invertébrés, la plupart des études ont porté sur les EH d'insectes et ont démontré leur rôle dans le métabolisme des xénobiotiques ainsi que dans le métabolisme des hormones et

des phéromones (Morisseau et Hammock, 2013). La majeure partie des travaux portant sur les EHs concernent les animaux tandis que la présence d'EH chez les plantes est beaucoup moins documentée.

1.2.2 Les EHs animales

Les EH ont été largement étudiées chez les mammifères où elles ont été mises en évidence dans la plupart des organes de toutes les espèces testées. Sur la base de la localisation subcellulaire et de la spécificité du substrat, cinq groupes d'enzymes distincts ont été définis: 1) EH microsomale, enzyme localisée au niveau du RE (mEH) (Morisseau et Hammock, 2013), 2) EH soluble ou cytosolique (sEH) (Morisseau et Hammock, 2013), 3) cholestérol EH (Silvente-Poirot et Poirot, 2012), 4) leucotriène A4 EH (Minami *et al.*, 1987) et 5) l'hepoxiline EH (Pace-Asciak et Lee, 1989). Parmi ces différentes enzymes, ce sont les mEHs et les sEHs qui ont été le mieux caractérisées. L'induction de la mEH hépatique chez le rat et la souris par une variété de composés chimiques suggère une implication dans le métabolisme xénobiotique (Morisseau et Hammock, 2005). Le large éventail de substrats métabolisés par l'enzyme cytosolique suggère également une fonction de détoxification (Wixtrom et Hammock, 1985), mais elle participe surtout au métabolisme des époxydes d'acides gras endogènes qui sont hydrolysés plus efficacement que de nombreux autres substrats (Morisseau, 2013).

Du point de vue évolutif, le gène codant pour les sEHs animales provient de la fusion de 2 gènes. En effet, les sEHs animales sont composées de deux régions. La région N-terminale est homologue aux haloacides déhalogénases (HAD1) bactériennes et la partie C-terminale est homologue aux sEHs de plantes, aux mEHs et à une haloalkane déhalogénase bactérienne (HLD1) (Beetham *et al.*, 1995). La comparaison des sEHs humaines avec toutes les autres sEHs présentes chez tous les organismes montre que le pourcentage entre ces enzymes varie de 30 à 92%. Ces données montrent clairement que toutes les sEHs sont homologues mais que les sEHs de plantes n'ont pas la partie N-Terminale retrouvée chez les sEHs animales.

1.2.3 Les EHs chez les plantes

Bien qu'une activité d'EH ait été décrite il y a plus de 40 ans dans un homogénat de l'épiderme de pomme (Croteau et Kolattukudy, 1975), peu d'informations sont disponibles

concernant ces enzymes chez les plantes. L'analyse des séquences des EH cytosoliques clonées à partir de la pomme de terre (Stapleton *et al.*, 1994), d'*Arabidopsis* (Kiyosue *et al.*, 1994) ainsi que la résolution de la structure cristallographique de l'EH de pomme de terre par diffraction de rayons X (Mowbray *et al.*, 2006) ont montré que ces enzymes comme celles des autres organismes appartiennent à la famille des α - β -hydrolases en particulier et contiennent une triade conservée d'acides aminés catalytiques nécessaires pour la réaction: Asp, Glu, His (Morisseau et Hammock, 2005 ; Beetham *et al.*, 1995) (**Figure 1.13**).

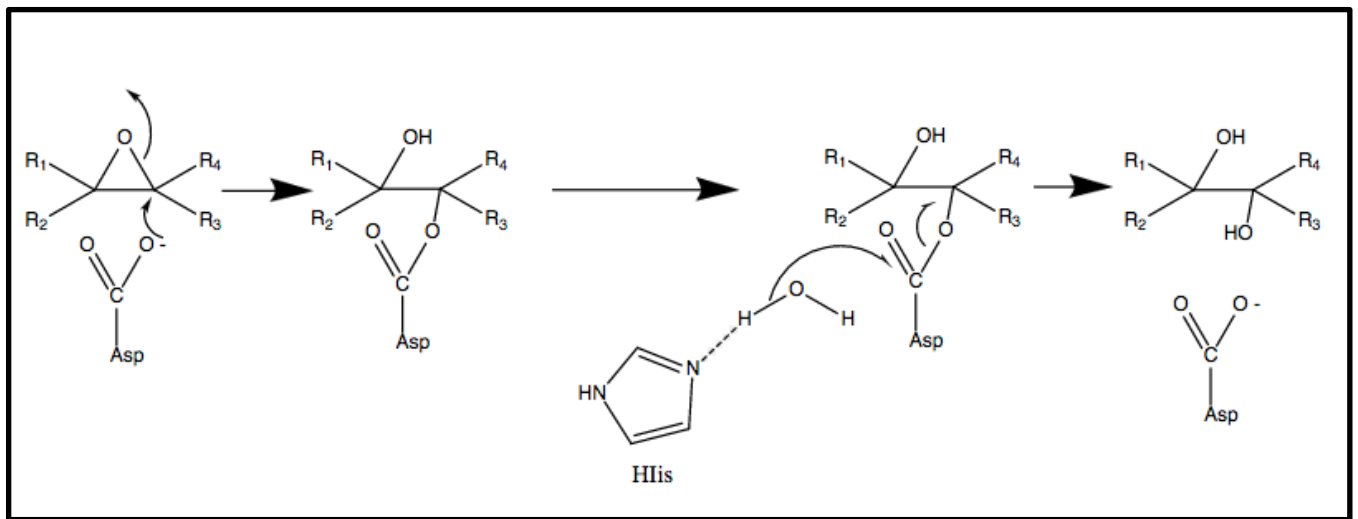


Figure 1.13 : Mécanisme catalytique de l'hydrolyse d'époxyde

Etape 1 de la réaction : Attaque nucléophile de l'époxyde par l'acide aspartique et formation d'un intermédiaire covalent. Etape 2 de la réaction : Activation de la molécule d'eau par un résidu histidine et hydrolyse de la liaison ester entre l'enzyme et le produit puis libération du diol

Les sEHs de plantes sont des α - β -hydrolases généralement de 35kDa qui peuvent être des protéines monomériques ou dimériques (Summerer *et al.*, 2002). A ce jour, des époxydes hydrolases ont été identifiées chez différentes plantes : le soja (*Glycine max*) (Arahira *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* (Kiyosue *et al.*, 1994), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Stapleton *et al.*, 1994), le tabac (*Nicotiana tabacum*) (Wijekoon *et al.*, 2011), le colza (*Brassica napus*) (Bellevik *et al.*, 2002), l'ananas (*Ananas comosus*) (Neuteboom *et al.*, 2002), l'euphorbe (*Euphorbia lagascae*) (Edqvist *et al.*, 2003), le riz (*Oriza sativa*) (Rice chromosome sequencing consortium, 2003), le citron (*Citrus jambhiri*)

(Gomi *et al.*, 2003). Les EHs de plantes ont été isolées dans les graines, les racines, les fruits, les feuilles (Newman *et al.*, 2005).

1.2.3.1 Stéréosélectivité et énantiosélectivité des EHs de plantes

Les plantes produisent différents acides gras époxydés impliqués dans les réactions de défense et la biosynthèse de cutine (Blée *et al.*, 2002 ; Howe *et al.*, 2002). Ces composés comprennent des époxydes qui dérivent de l'acide oléique et linoléique ainsi que d'autres acides gras hydroxylés, époxydés et on y trouve également des hépoxyilines. Des études de spécificité de substrat ont permis de montrer que certaines EHs de plantes sont stéréosélectives et énantiosélectives. Ainsi en utilisant comme modèle le stilbène oxide, Bellevik *et al.*, 2002 ont pu montrer que les EHs du colza (*Brassica napus*) préfèrent les formes trans (groupes se trouvant de part et d'autre de la double liaison carbone-carbone) aux formes cis (des groupes du même côté de la double liaison carbone-carbone). Les époxydes d'acides gras de plantes existent sous deux formes énantiomériques : par exemple l'époxyde qui provient de l'acide oléique peut être de configuration 9R,10S ou 9S,10R. La première EH clonée et caractérisée chez le soja a montré une forte énantiosélectivité pour l'acide 9R,10S-époxystéarique (Blee *et al.*, 2002).

Ce composé est probablement le substrat physiologique de cette EH car il est préférentiellement synthétisé par une enzyme de type peroxygénase chez cette plante (Blée *et al.*, 2002). La même énantiosélectivité a été observée avec l'EH microsomique de *Vicia sativa*, là encore la synthèse de l'acide 9,10-époxystéarique dans les microsomes de *Vicia sativa* se fait également en faveur de la forme 9R,10S. Il est intéressant de noter que la première époxydase cytochrome P450 dépendante décrite chez *Arabidopsis thaliana* produit également de manière préférentielle cet énantiomère 9R, 10S (Sauveplane *et al.*, 2009) (**Figure 1.14**). En revanche chez le blé, le maïs ou le riz, les EHs ne semblent pas très énantiosélectives (Summerer *et al.*, 2002).

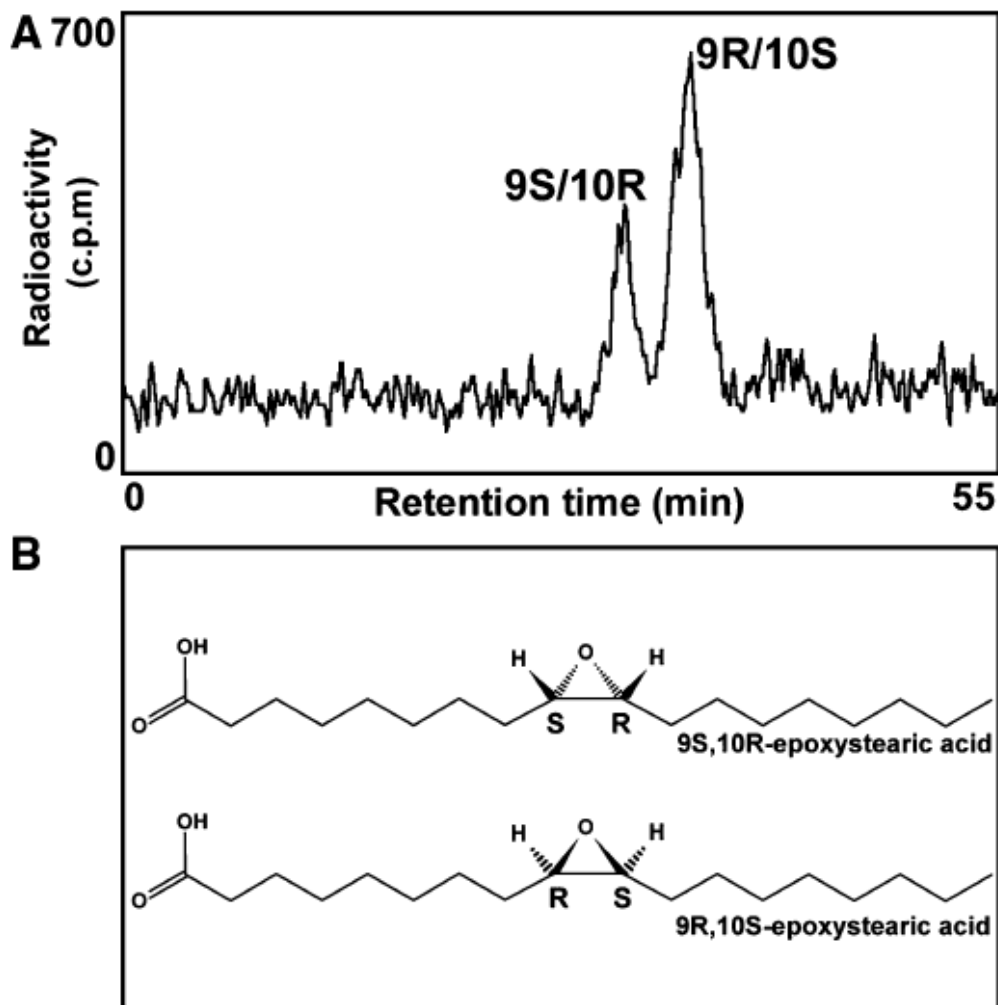


Figure 1.14 : Radiochrommatogramme en HPLC des énantiomères de l'acide 9,10-époxyatéarique produits par CYP77A4 (A), structures des énantiomères (B) (Sauveplane *et al.*, 2009)

1.2.3.2 Régulation des EHs de plantes

Les plantes contiennent des EHs qui sont exprimées constitutivement. Dans les feuilles de pomme de terre, la croissance et la différenciation du méristème sont associées à une augmentation de l'expression de EHs (Stapelton *et al.*, 1994). Plus récemment chez l'euphorbe (*Euphorbia lagascae*), une EH spécifique de la germination a été décrite (Edqvist *et al.*, 2002). Il existe également des isoformes inductibles (Kiyosue *et al.*, 1994). La transcription de ces enzymes inductibles peut être augmentée dans le milieu de culture par l'ajout d'hormones exogènes qui sont impliquées dans la germination, le développement, la croissance, la maturation des fruits et la défense des plantes (Kiyosue *et al.*, 1994 ; Stapelton

et al., 1994). On peut observer ces phénomènes en particulier en réponse aux hormones de croissance comme l'auxine et l'éthylène ou au méthyl-jasmonate, régulateur des réactions de défense (Kessler *et al.*, 2004).

Une EH induite au niveau transcriptionnel lors d'un épisode de sécheresse (Kiyosue *et al.*, 1994) a été décrite chez *Arabidopsis thaliana*. Chez le tabac, l'infection virale conduit à la synthèse de messagers codant pour une EH (Arahira *et al.*, 2000 ; Guo *et al.*, 1998). Dans une autre étude sur le citron, il a été démontré qu'une EH est induite par l'exposition à un pathogène fongique *Alternaria alternata* (Gomi *et al.*, 2003). Ces exemples montrent que les EHs sont impliquées dans les réponses au stress de la plante.

1.2.3.3 Rôle des EHs dans la défense des plantes

Les plantes sont des organismes sessiles qui ont dû mettre en place différentes stratégies en vue de se protéger contre les différents stress subis. Dans ce processus de mise en place de résistance, les acides gras polyhydroxylés comme l'acide gras 9,10,18-trihydroxystéarique sont des éléments essentiels. En effet, d'une part ce sont des constituants majeurs en C18 de la cutine, un des composants de la cuticule, la première barrière entre les plantes et le milieu extérieur. Cette cutine joue également un rôle de réservoir de composés intervenant dans les interactions plante-pathogène. Par exemple, certaines cutines sont très riches en époxydes d'acides gras (Holloway, 1973) et il est probable que lors de leur libération par les cutinases pendant les attaques fongiques, ils soient hydrolysés en diols par des EHs (Pinot *et al.*, 1999). De nombreux travaux ont montré les propriétés antimicrobiennes des diols d'acides gras. Une voie de biosynthèse de ces diols d'acides gras a été proposée il y a quelques années (**Figure 1.11**) (Kolattukudy, 1985). Elle met en jeu une enzyme de type P450 capable de produire une fonction époxyde nécessaire à la formation d'un diol. Elle met également en jeu une enzyme de type époxyde hydrolase qui convertit l'époxyde en diol. Cependant cette voie n'a jamais été démontrée.

Le but de mon travail de thèse était d'identifier des enzymes chez *Arabidopsis thaliana* impliquées dans la biosynthèse d'acides gras poly-hydroxylés en particulier dans le contexte de la mise en place de la cutine. Mon approche s'est basée dans un premier temps sur une étude transcriptomique basée sur l'analyse de banque de données publiques. Nous avons ensuite utilisé un système hétérologue de levure pour déterminer les capacités catalytiques des

protéines codées par les gènes candidats. Enfin, nous avons caractérisé des plantes d'*Arabidopsis thaliana* mutées pour le niveau d'expression de ces gènes candidats. L'étude de ces gènes s'est portée plus particulièrement sur la famille des CYP77 ainsi que la famille des epoxydes hydrolases chez *Arabidopsis thaliana*.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et Méthodes

2.1 Matériel Végétal

Tous les géotypes d'*Arabidopsis thaliana* qui ont été utilisés sont d'écotype *Col0* (Columbia). Le site TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/>) permet de connaître toutes les lignées mutantes disponibles pour chaque gène.

Les mutants d'insertion (**Tableau 2**) utilisés pour mes analyses sont :

Mutant	Gène	Collection
<i>cyp77b1-1</i>	AT1G11600	SALK_106298
<i>cyp77b1-2</i>	AT1G11600	SALK_106298C
<i>Ateh1-1</i>	AT3G05600	SALK_053239
<i>Ateh1-2</i>	AT3G05600	SAIL_549A04

Tableau 2 : Lignées mutantes utilisées pour les analyses

2.2 Conditions de culture

2.2.1 Culture en terre

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivées dans des pots en plastique de 7cm de diamètre avec du terreau (0408001 LAT-Terra Standard P, Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach, Allemagne) supplémenté d'engrais Osmocote 3-4 mois (Scotts International B.V. 4190 CA Geldermalsen, The Netherlands). L'engrais est ajouté dans le terreau en proportion 2kg/m³. Les plantes sont cultivées en logette avec une photopériode de 16h jour/8h nuit pendant 6/7 semaines (pour le stade rosette). La température des logettes de culture est de 21°C en période de lumière et de 18°C en période d'obscurité. Les logettes sont équipées soit de néons soit de LED pour l'éclairage.

2.2.2 Stérilisation des graines

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont placées dans un tube eppendorf de 1,5mL. On ajoute 1mL de solution de stérilisation (70% Ethanol ; 0,05% Triton X-100). Le tube est placé sur roue pour agitation pendant 5 min. On se place en conditions stériles pour enlever le maximum de solution de stérilisation avant d'ajouter 1mL d'éthanol 70% pour rincer les graines. Cette étape est répétée 3 fois. Les graines sont mises à décanter puis le dernier rinçage est fait avec 1mL d'éthanol 95-100%. Le maximum d'éthanol est retiré à la pipette avant son évaporation complète puis les graines sont semées sur milieu solide.

2.2.3 Culture en milieu solide

Le milieu solide utilisé pour cultiver les plantes *in vitro* est le milieu MS (Murashige et Skoog, M5519, Sigma-Aldrich) 4,4g/L, auquel on ajoute 5g/L de saccharose et 3g/L de bactoagar. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 à l'aide d'une solution de KOH 1M. Les graines sont semées en ligne à 0,5 cm de distance les unes des autres. Les boîtes sont placées 48h à 4°C afin de lever la dormance puis placées en logettes de culture (photopériode 16h d'éclairage et 8h d'obscurité).

2.3 Génotypage de mutants d'insertion

2.3.1 Extraction d'ADN génomique

Le matériel végétal (100mg de feuilles) est prélevé et congelé dans de l'azote liquide puis broyé avec des billes de verre dans un broyeur Precellys (2 x 60 sec, 30 sec de pause, 5500 rpm). Après addition de 400µl de tampon d'extraction (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM EDTA, 0,5% SDS), l'homogénat est centrifugé pendant 2 min à 12 000g. Le surnageant (300µL) est transféré dans un nouveau tube auquel on ajoute 300µl d'isopropanol et est mis à incuber pendant 2 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 12 000g et le surnageant est éliminé. Le culot est rincé avec 1ml d'éthanol 70% et repris dans 100µl d'eau. On utilise alors 1µl de l'extrait pour la PCR.

2.3.2 PCR

Pour une réaction de polymérisation en chaîne, le mélange réactionnel est constitué de 4µl de Buffer 5x GoTaq (Promega), 1µl de MgCl₂ (2mM), 0,5µl de dNTP (10mM), 0,1µl de DMSO, 1µl du couple d'amorces (Reverse-Forward) (0,5µM), 1µl d'ADN génomique, 0,1µl de Taq Polymérase, 13,3µl d'H₂O milliQ.

Les cycles de température sont : 95°C pendant 5 min, dénaturation 95°C pendant 1 min, hybridation des amorces 57°C pendant 1 min, élongation 72°C pendant 3 min, on effectue 35 cycles puis on termine la réaction à 72°C pendant 10 min. Les fragments amplifiés sont analysés sur gel d'agarose 1%. La migration est effectuée à 80V pendant 20 min.

Nom	Amorce	Séquence amplifiée
CYP77B1-R1	5' TCCATTTAAACGAATGGATCA 3'	Amplification de l'ORF complète de <i>CYP77B1</i>
CYP77B1-F1	5' GTGGCGCCGGTACTTTTC 3'	
CYP77B1-R2	5' TGATTACGTCGGTGAGATCC 3'	Amplification du fragment hybride T-DNA/ <i>CYP77B1</i>
LBb1.3	5' GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT 3'	
RT-EH-F	5' ATGCATGCACACAATCGCAACTA 3'	Amplification de l'ORF complète de <i>AtEH1</i> (Amplification du fragment hybride avec RT-EH-R/ LBb1.3)
RT-EH-R	5'CTAAAAGCTTTTGTGTTGTGCCGAAG CTT 3'	

Tableau 3 : Primers utilisés lors du génotypage des deux lignées de *CYP77B1* et *AtEH1*

2.4 Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

2.4.1 Matériel végétal

Les prélèvements ont été effectués sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* écotype *Colo* sauvages. Les plantes utilisées étaient âgées de 6 semaines. Pour les fleurs, nous avons choisi 5 stades floraux pour lesquels 50 mg ont été prélevés. Des fleurs ouvertes (50 fleurs) ont été disséquées afin de séparer les différents organes (sépalés, pétales, étamines et pistil) qui sont immédiatement congelés dans l'azote liquide lors du prélèvement pour éviter la dégradation des tissus. Différentes feuilles ont été également prélevées : des feuilles de rosette avant et après floraison, des feuilles de la hampe et des feuilles de rosette âgées de deux semaines. Les différents organes ont été récoltés, pesés et congelés immédiatement dans de l'azote liquide, puis stockés à -80 °C.

2.4.2 Extraction d'ARN totaux et synthèse d'ADNc

Les échantillons congelés sont broyés avec des billes en verre (broyeur Precellys, 5500 rpm, 2 x 30 sec avec 30 sec de pause) dans du Trizol (1ml). Après ajout de chloroforme (200µl) et centrifugation (12000g, 15 min, 4°C), la phase aqueuse obtenue contenant les ARN est extraite dans du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1; v/v/v). Après centrifugation (12000g, 10 min), de l'isopropanol (500µl) est ajouté au surnageant pour précipiter les ARN. Une centrifugation (12000g, 10 min) permet d'obtenir un culot d'ARN, lavé ensuite à l'éthanol 70%, séché puis repris dans de l'eau (50µl). La concentration et la pureté des ARN obtenus sont évaluées par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm. Une transcription inverse est ensuite effectuée sur 1µg des ARN extraits avec le kit ImPromII™ Reverse Transcription System (Promega) selon le protocole fourni.

2.4.3 PCR quantitative

ADNc à détecter	Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
<i>CYP77B1</i>	<i>At1g11600</i>	5' CGGAGTACGGATCTTTGTGG 3'	5' CGCGGTCACTAGCTCTGTC 3'
<i>CYP77A4</i>	<i>At5g04660</i>	5' GGATGGTTCAGGAGTTCGAG 3'	5' CGGCGAAATCAATCTCACTT 3'
<i>CYP77A6</i>	<i>At3g10570</i>	5' TTAACGGTGGTACGGATACGA 3'	5' ACAATCAGTTGCGCTATACCC 3'
<i>PR1</i>	<i>At2g14610</i>	5' CATACTCTGGTGGGCCTTAC3'	5' CGAGTCTCACTGACTTTCTCAA 3'
<i>PR4</i>	<i>At3g04720</i>	5' GCCATCTCATTGTTGACTACCAATT 3'	5' ATCAATGGCCGAAACAAGCA 3'
<i>JAR1</i>	<i>At3g16470</i>	5' GCAGCAACTAGCGCAGGAT 3'	5' TCAATGACTCTGTTCATGTGCGAA 3'
<i>PDF1.2a</i>	<i>At5g4420</i>	5' CACCCTTATCTTCGCTGCTCTT3'	5' TACTTGTGTGCTGGGAAGAC 3'
<i>VSP1</i>	<i>At5g24780</i>	5' GTTTGGATCTTTGACCTAGACGA 3'	5' CTCTAACCACGACCAGTACGC 3'
<i>CYP94C1</i>	<i>At2g27690</i>	5' GGCCCGGATTACGAAGAGTTT 3'	5' GGCCGGAATTACCTTCGTT 3'
<i>CYP94B3</i>	<i>At3g48520</i>	5' TGGCTTACACGAAGGCTTGTC 3'	5' AGTCCCACGAAACTGGAGGAT 3'
<i>AtEH1</i>	<i>At3g05600</i>	5' TCTCGATTTCTATGTCTCCAAATTC 3'	5' GCAGTGAGCTCCCAATTCAG3'

<i>AtEH2</i>	<i>At4g02340</i>	5'TCGGCGATGATTACTACATTTG 3'	5' AACTTGAGCAAAGTCCTCTTCG 3'
<i>AtEH3</i>	<i>At2g26740</i>	5' CGTCAGCAAGTTTGAAGAGAAA 3'	5' ACCCATGGACCCAACAACACT 3'
<i>AtEH4</i>	<i>At4g15960</i>	5' TTAACTACTACCGCAACATTGACC 3'	5' ACCGGTACACGGATCTTAGC 3'
<i>AtEH5</i>	<i>At2g26750</i>	5' CTTCGTCAGCAAGTTTAAAGAGAA 3'	5' CCATGGACCCAACAACACTCAT 3'
<i>AtEH6</i>	<i>At4g15955</i>	5' ACTACCGAAATATGGACCGAAC 3'	5' GGAACCTTCACTTTAGCGTTTGA 3'
<i>AtEH7</i>	<i>At3g51000</i>	5' CGATCACTACGGCACTACTCAG 3'	5' CCTATGATTGCTCCCCAGTC
<i>EXP</i>	<i>At4g26410</i>	5' GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC 3'	5'GGTCCGACATACCCATGATCC 3'
<i>GAPDH</i>	<i>At1g13440</i>	5'TTGGTGACAACAGGTCAAGCA 3'	5'AAACTTGTCGCTCAATGCAATC 3'

Tableau 4: Primers utilisés lors des RT-qPCR

Le milieu de réaction de PCR quantitative en temps réel est composé de 1µl d'ADNc (provenant de la transcription inverse effectuée avec 1µg d'ARN dans 20µl, dilué 5 fois avec de l'eau après réaction), 5µl de SYBR Green, 2µl d'eau et 2µl du couple d'amorces (2,5µM). Les amorces sont déposées manuellement en plaque de 384 puits, puis le reste du mélange réactionnel est ajouté pour chaque ADNc. L'instrument de PCR quantitative en temps réel à haut débit (Light Cycler 480, Roche) est utilisé pour amplifier les ADNc avec le programme suivant : dénaturation (95°C, 5 min), PCR (45 cycles : 95°C 10 s, 60°C 15 s, 72°C 15 s). Des amorces spécifiques à chaque gène ont été utilisées pour détecter par qPCR les ADNc obtenus. Les amorces sont dessinées avec le logiciel Universal ProbeLibrary (UPL) Roche

(<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html>).

Les gènes *EXP* et *GAPDH* sont utilisés comme références. Les niveaux de transcrits ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) des gènes cibles sont normalisés par rapport à ceux des deux gènes de référence pour chaque échantillon. Toutes les réactions sont réalisées trois fois (réplicats techniques), une moyenne des taux d'induction des réplicats techniques est calculée.

2.5 Étude de l'expression spatio-temporelle de *CYP77B1* par le gène rapporteur *GUS*

2.5.1 Construction d'une lignée d'expression promoteur-rapporteur *GUS*

Un fragment du promoteur de 2000 bp en amont du codon start de *CYP77B1* a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique d'une plante d'*Arabidopsis* écotype *Col0* en utilisant les primers compatibles pour le système Gateway :

HR535- R	5'GGGG <u>GACA</u> ACTTTGTATAGAAAAGTTGGTATATACTTTACCTTCTTCCAGTAAAA3'
HR536- L	5'GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGTGTTTATTATTATTGAAGAGAGAAAGA3'

(Les séquences AttB4 et AttB1R sont respectivement soulignées)

Le fragment PCR a été cloné dans le plasmide pDONRP4-P1R (**Figure 2.1**) par réaction BP clonase (Life Technologies) pour générer le vecteur d'entrée pHR348.

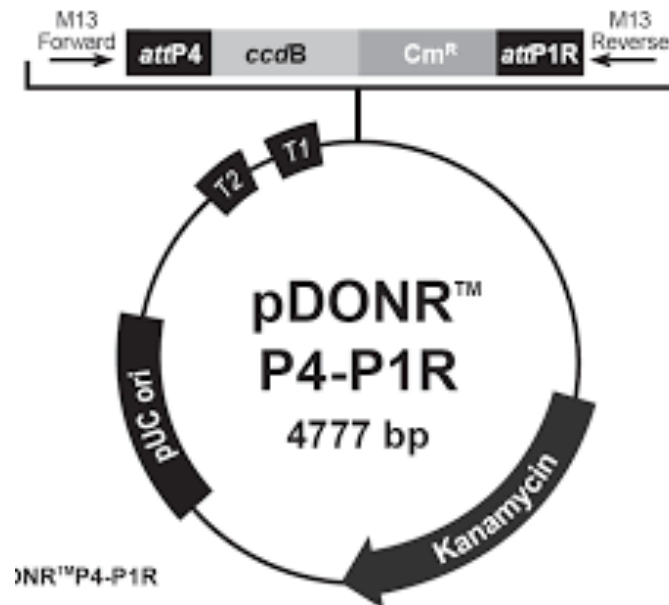


Figure 2.1 : pDONR P4-P1R du système Gateway

Tous les vecteurs d'entrée ont été vérifiés par séquençage. Afin de réaliser la fusion du promoteur de *CYP77B1* avec le gène *GUS*, le vecteur d'entrée pHR348 et le vecteur d'entrée pEN-L1-S-L2 contenant l'ORF du gène *GUS* (Karimi *et al.*, 2002) ont été recombinaisonnés avec le vecteur de destination pHbm42GW7 par réaction LR clonase (Life technologies) pour générer le vecteur d'expression pHR352.

Le vecteur d'expression a été introduit dans la souche C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* par électroporation. Des plantes d'*Arabidopsis thaliana Col0* ont été transformées par la méthode du Floral Dip (Clough et Bent, 1998).

La même technique de clonage a été utilisée pour réaliser les lignées *35S:CYP77B1*.

2.5.2 Sélection

Les plantes sont sélectionnées sur boîtes MS 1/2, 2% Saccharose, 50mg/L Kanamycine. Après 2 semaines de culture *in vitro*, les plantes résistantes sont repiquées en pots.

2.5.3 Coloration et observation

Des hampes florales sont coupées afin de réaliser les colorations. Le matériel végétal est ensuite placé dans un tampon phosphate 50mM pH 7 contenant 0,5mM de Ferrocyanide, 0,5 mM de Ferricyanide, 0,1% de Triton X-100 et 0,5 mg/ml de X-Gluc. L'échantillon est

placé dans une cloche pour faire une infiltration sous vide des tissus pendant 3 minutes. L'échantillon reste dans la solution toute la nuit à 37°C. Cette réaction est stoppée en remplaçant la solution contenant le X-Gluc par de l'éthanol 75%. On réalise 3 rinçages successifs à l'eau distillée. Les photographies ont été prises avec une loupe binoculaire LEICA (objectif 0,5x, exposition automatique, saturation maximum, gain 2,5x).

2.6 Étude de l'expression spatio-temporelle de *AtEH1*

2.6.1 Clonage de *AtEH1* fusionné à la GFP

Le gène codant pour *AtEH1* a été introduit dans le vecteur pDONR207 (Invitrogen) (**Figure 2.2**) en utilisant les primers suivants par BP clonase (Thermo FisherScientific) :

attB1- EH1	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGTGGACACTAGCTTAAC 3'
attB2- EH1	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAATAAAAGATAAATACACTCACA 3'

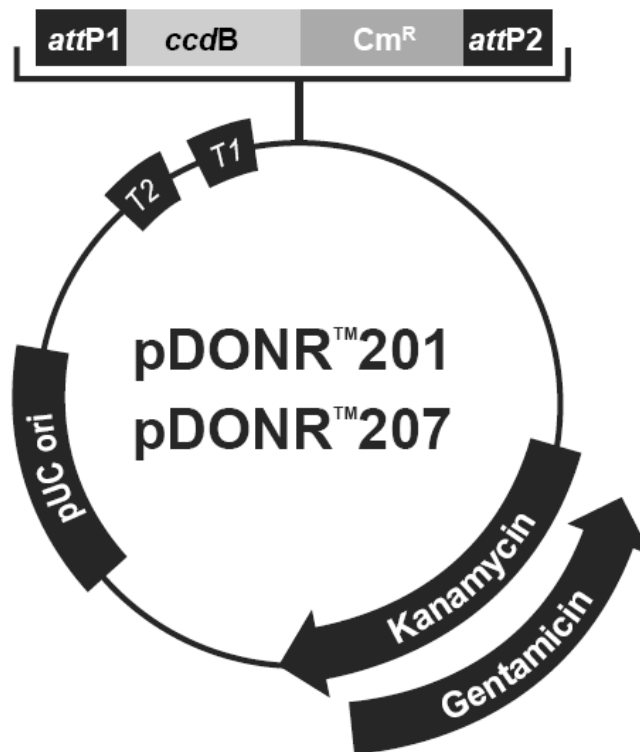


Figure 2.2 : le vecteur pDONR207, « vecteur d’entrée » du système de clonage Gateway

Le vecteur d’entrée obtenu a été utilisé pour cloner la séquence codante de AtEH1 dans les vecteurs pB7WGF2 et pK7WGF3 en utilisant le système gateway LR clonase (Thermo Fisher Scientific). Les vecteurs d’expression obtenus ont été utilisés pour transformer la souche LB44014 d’*Agrobacterium tumefaciens*.

2.6.2. Expression transitoire dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*

Pour l’expression transitoire de la protéine fusionnée à la GFP, les deux vecteurs obtenus ont été introduits dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* de 4 semaines par agro-infiltration. Des disques foliaires ont été prélevés 4 jours post-infiltration pour une observation au microscope confocal. Une construction précédemment utilisée au laboratoire servant de contrôle de localisation du RE a été utilisée pour cette expérience. Ce vecteur contenant le marqueur mRFP1-RE (Bassard *et al.*, 2012b) est introduit en mélange avec le suppresseur de silencing P19 du virus de la tomate (Bushy Stunt Virus, TBSV) (Shamloul *et al.*, 2014).

2.6.3 Observation par microscopie confocale

Les observations ont été réalisées par microscopie confocale (Zeiss LSM780). L'objectif utilisé est un objectif d'immersion à huile : Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M2. Pour l'observation des cellules épidermique de *Nicotiana benthamiana*, l'EGFP et la mRFP1 ont été séquentiellement observées en utilisant le spectre d'excitation 488/495-555 nm et 561/565-615 nm, respectivement.

2.6.4 Extraction des microsomes de feuilles de *Nicotiana benthamiana*

Les feuilles (2g) sont broyées dans 6mL de tampon Tris pH8 100mM, 250mM Saccharose, 10mM EGTA, 10mM d'acide ascorbique, 2mM de DTT, 1%PVP. L'échantillon est homogénéisé avec un piston puis placé sur une roue pour agitation pendant 15 min à 4°C. Le broyat est filtré avec du tissu miracloth avant d'être centrifugé à 10 000g pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer le reste des débris. Le surnageant obtenu correspond à la fraction totale (« input fraction ») et contient les protéines non membranaires. On garde 100µl pour le Western blot auquel on ajoute 37µl de Laemly (x4). Le surnageant est ensuite centrifugé pendant 1h à 100 000g. Ceci permet de purifier les microsomes repris dans 250µl of Laemly (x1) et le surnageant obtenu est enrichi en protéines cytosoliques. Les échantillons sont conservés pour le western :

-100µl de cytosol auquel on ajoute 37µl de Laemly (x4)

-Microsomes repris dans 250µl of Laemly (x1)

Une fois dans le Laemly, les échantillons sont placés 10 min à 60°C sur un bloc chauffant pour dénaturer les protéines avant de réaliser le Western Blot.

2.6.5 Western Blot

Les protéines sont séparées en utilisant un gel d'électrophorèse 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide (SDS-PAGE) puis transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidene difluoride). La membrane est bloquée dans une solution contenant 5% de lait pendant 2h à température ambiante pour éviter les fixations aspécifiques, puis incubée avec des anticorps anti-GFP JL8 (1 : 10 000; Clontech, Mountain View, EU), anti-RFP 6G6 (1 :

5000 ; ChromoTek, Allemagne) ou anti-UGPase (1 : 10 000 ; Agrisera, Suisse) pendant 2h et enfin avec un anticorps secondaire de chèvre conjugué à la HRP (HorseRadish Peroxidase) (1 : 10 000 ; IBMP, Strasbourg, France) pendant 1h avant la révélation par luminescence.

2.7 Mesures d'activités enzymatiques

2.7.1 Clonage de la séquence codante dans le vecteur pYeDP60

Les séquences codantes de *CYP77B1* et *CYP94C1* et clonées dans le plasmide pYeDP60 (**Figure 2.3**) étaient disponibles à mon arrivée au laboratoire.

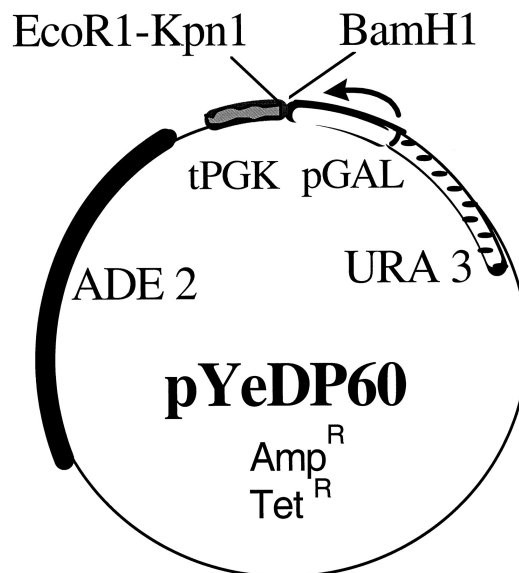


Figure 2.3 : Structure du vecteur *pYeDP60* (9265 pb) pour l'expression dans la levure (Urban *et al.*, 1990)

Pour le clonage de la séquence du gène *AtEHI*, le vecteur pGEM-T (**Figure 2.4**) est utilisé pour le sous clonage puis une digestion est réalisée avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *KpnI* et la séquence est clonée dans le pYeDP60 (**Figure 2.3**).

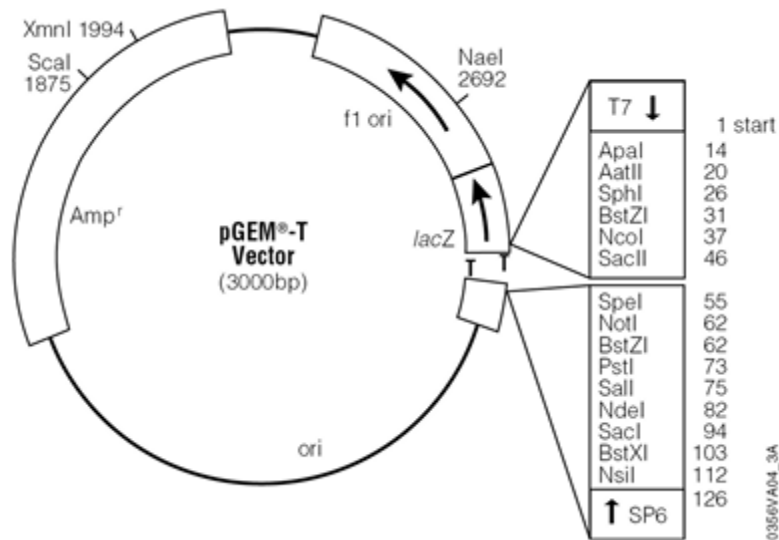


Figure 2.4: Structure du vecteur *pGEM-T* pour le sous-clonage

Les primers suivants sont utilisés pour l'amplification de *AtEH1* :

AtEH1-F	ggatcctggaaggaatcgatcatag
AtEH1-R	ggtaccctaaaagctttgtgtgtgc

*site BamHI, KpnI

Pour la mutagenèse de la séquence de *AtEH1*, le vecteur *pGEMT-AtEH1* est amplifié avec les primers suivant afin de modifier un codon :

AtEH1-mArg-R	atggctccccaacgatgaccgaccagaaacaccttc
AtEH1-mArg-F	gaaggtgtttctggtcggatcatcgtggggagccat

Cette technique permet de changer un ou plusieurs codons, le design des primers est réalisé grâce au logiciel en ligne de « Quick change Primer Design online tool » qui permet de choisir précisément le codon que l'on veut changer.

2.7.2 Modification de l'ancre de CYP77B1

Le domaine transmembranaire de CYP77B1 a été modifié avec l'ancre de CYP73A92 de

Brachypodium distachyon (Bradi2g53470) (**Figure 2.5**). Tout le domaine transmembranaire de CYP77B1 est donc remplacé par le domaine de CYP73A92 représenté ci-dessous. De plus, 300 nucléotides en 5' à la suite du domaine transmembranaire ont été recodés sur la séquence de CYP77B1 afin d'optimiser l'expression dans la levure.

MDFLFVEKLLVGLLASALVAIAVSKIRGRKCLKLPPGP

Figure 2.5 : Séquence protéique de l'ancre de CYP73A92

La séquence de CYP77B1 est ajoutée à partir du PPGP. Les 300 nucléotides sont recodés pour optimiser l'expression dans la levure grâce au site : <http://www.encorbio.com/protocols/Codon.htm>

La première partie de la séquence est synthétisée grâce à IDT (<https://eu.idtdna.com/pages/products/genes/gblocks-gene-fragments>) (**Figure 2.6**) qui correspond à l'ancre de CYP73A92 suivie des 300 premiers nucléotides de *CYP77B1*.

<p>GCCCTATAGTGAGTCGTATTAC CCCCGGCatggatgtattactggaaaaggcgtgtaggtttattcgtgctgctgtcttagctattgcagtagcaaaactgacaggtaaaagatttagacttaaaggttgccattggttggaatttgtgcaagttatttcca aagaagacatttcgtttcttgatgagagatttgagaaaaaatatggtccaatttcactatgcaaatgggtcaaagaactatgattattactgatgaaaaattgattcatgaagctttggttcaaagaggtccaactttcgcttctagaccaccagatttccaattagattgatgttctctgttggtaaatgtgctattaattctgctgaatatggttctttgtggagaactttgagaagaaatttcgttactgaattggttactgctccaagagta aacaatgttcttgattagatct</p>
<p>*site SmaI</p>

Figure 2.6 : Gblock-77B1+overlap pGEM-T avec optimisation des codons

Puis on amplifie par PCR avec les primers ci-dessous la seconde partie de la séquence de CYP77B1.

<p>PCR_77B1_F : taaacaatgttcttgattagatctGGCTATGCAGAATCATATG</p>
<p>PCR_77B1_R : caagctatttagtgacactataga GGTACCTTAGGTCCTTGACCTGATTTG</p>
<p>*site KpnI</p>

Les deux parties du gène sont liées en utilisant le système Gibson (**Tableau 5**) qui permet d'assembler plusieurs fragments d'ADN par la réaction suivante :

	Ci (ng/ μ L)	Taille fragment en pb	Pmoles nécessaires pour le Gibson	ng pour la réaction Gibson	μ L pour la réaction (V : 10 μ L _{final})
Fragment 1 PCR 77B1	197	100	0,09	55,62	0,3
Fragment 2 G- Block 73A92- 77B1	25	500	0,09	27,81	1
Plasmide pGemT	21,3	3000	0,03	55,62	2,2
Gibson assembly mix					5
H₂O					1,5

Tableau 5 : Le système Gibson utilisé pour la réaction de clonage

2.7.3 Transformation d'une souche de levure WAT11

Une souche de levure de *Saccharomyces cerevisiae* WAT11, optimisée pour la production de P450s fonctionnels a été transformée avec les deux constructions respectivement. Pour cela, une ou plusieurs colonies sont utilisées pour ensemercer 50 ml de YPGA liquide (10g Bactopeptone, 10g d'extrait de levure, 20g de glucose, et 200mg d'adénine pour 1L de milieu) à 30°C-160rpm pendant 10 h. Ensuite la DO_{600nm} est mesurée et la culture est diluée pour obtenir 50ml avec une DO_{600nm} = 0,2 et la culture est alors remise à 30°C pendant 5 heures. Après centrifugation des cultures (5500g, 10 min, 4°C), les culots sont repris dans 1,5 ml d'H₂O stérile pour 10ml de culture de départ. Les aliquots sont à nouveau centrifugés pendant 10s et les culots sont repris dans 1,5ml d'AcLi/TE x1, et l'opération est renouvelée pour reprendre les culots dans un volume final de 50 μ l d'AcLi/TE x1. L'ADN de sperme de saumon (100 μ g préalablement dénaturé pendant 20min à 100°C) et le plasmide pYeDP60-gène (1 μ g) sont ajoutés aux levures. L'incubation se fait dans 500 μ L de PEG40%, d'abord sur un agitateur pendant 30min à 37°C puis pendant 15min au bain marie à 42°C. Une centrifugation permet ensuite d'obtenir un culot de levures transformées qui sont reprises dans 500 μ l d'H₂O stérile avant d'être étalées (100 μ L) sur boîte SGI (1g de Bactopeptone, 7g

d'extrait de levure, 20g de glucose, 20mg de tryptophane pour 1L de milieu de culture).

2.7.4 Extraction de microsomes de levure

La séquence codante du gène est sous contrôle d'un promoteur inductible au galactose et réprimé en présence de glucose. Afin d'exprimer la protéine, un volume de 30ml de milieu SGI liquide (bactocasamino acids 1 g/l, yeast nitrogen base 7g/l, glucose 20g/l, tryptophane 20mg/l) estensemencé avec une colonie de levure transformée. La préculture est réalisée à 30°C, sous agitation (160rpm) pendant 18 h. Lorsque l'absorbance (A_{600}) est d'environ 1 unité de DO, 5ml de cette pré-culture sont utilisés pour ensemencer 200ml de milieu YPGE liquide (bactopeptone 10g/l, extrait de levure 10g/l, glucose 5g/l, 3% éthanol). Après 30h de culture (30°C, 160rpm), 10 mL de galactose (20g/l) sont ajoutés au milieu ce qui permet d'induire l'expression du P450 et de la NADPH cytochrome P450 réductase. Après 17 h de culture (30°C, 160 rpm), les levures sont récoltées par centrifugation (7500g, 10 min, 4°C), puis les cellules sont reprises dans 3 ml de tampon TES (Tris-HCl 50mM pH7,5 ; EDTA 1mM ; Sorbitol 600mM).

Elles sont ensuite broyées manuellement à l'aide de billes de verre de 0,2-0,6 mm de diamètre. Le broyat, repris dans 60ml de tampon TES, est soumis à une première centrifugation (10 000g, 10min, 4°C). Le surnageant est ensuite centrifugé à haute vitesse (100 000g, 1h, 4°C). Le culot de microsomes obtenu est repris dans 3ml de tampon TEG (Tris-HCl 50mM pH 7,5 ; EDTA 1mM ; glycérol 30%), aliquoté et stocké à -30°C jusqu'aux tests d'activité enzymatique.

2.7.5 Tests enzymatiques

Les acides gras substrats commerciaux (PerkinElmer Life Science) sont radiomarqués au ^{14}C au niveau du groupement carboxyle (45mCi/mol). Les différents substrats testés (C12:0, C14:0, C16:0, C18:1 et C18:2) (**Tableau 6**) sont conservés dans l'éthanol qui est évaporé sous flux d'argon avant incubation. On incube alors les protéines microsomales (0,4mg) dans un volume final de 200 μ l de tampon phosphate de sodium (20mM, pH 7,4) en présence de NADPH qui va servir à initier la réaction enzymatique. L'incubation se déroule à 27°C pendant 20min sous agitation. La concentration finale en substrat est de 100 μ M. Pour chaque incubation un contrôle sans NADPH est réalisé et la réaction est stoppée par transfert de la réaction dans la glace.

Dans le cas des EHS qui n'ont pas besoin de cofacteurs, c'est la fraction cytosolique qui

est incubée (0,4mg de protéines).

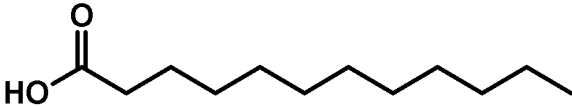
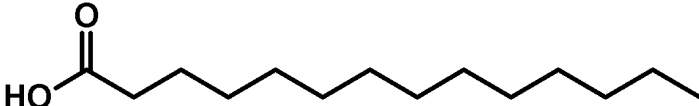
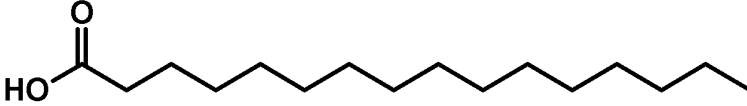
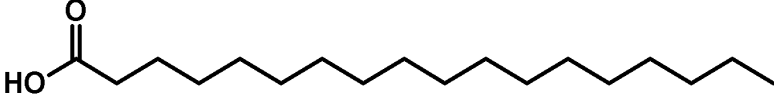
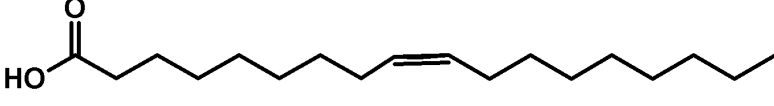
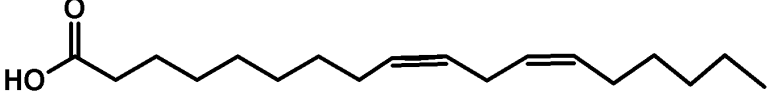
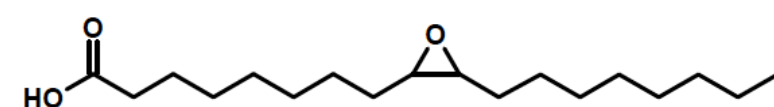
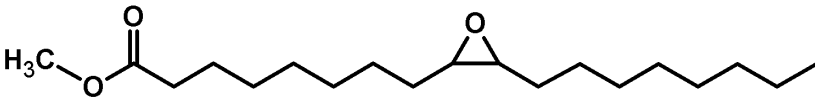
NOM	STRUCTURE
C12 :0 Acide dodécanoïque (acide laurique)	
C14 :0 Acide tétradécanoïque (acide myristique)	
C16 :0 Acide hexadécanoïque (acide palmitique)	
C18 :0 Acide octadécanoïque (acide stéarique)	
C18 :1 Acide oléique	
C18 :2 Acide linoléique	
C18 :1 époxydé Acide 9 :10 époxystéarique	
Ester méthylique de l'acide 9 :10 époxystéarique.	

Tableau 6 : Noms et structures des composés utilisés

2.7.6 Mise en évidence des produits formés lors d'incubations par chromatographie sur couche mince

Afin de séparer les acides gras d'éventuels métabolites formés, les milieux d'incubation sont déposés directement sur plaque de silice de 0,25mm d'épaisseur (20cm x 20

cm, Merck), développée dans un mélange de solvants composé de diéthyl éther, d'éther de pétrole et d'acide formique (50:50:1; v/v/v). L'utilisation de substrats radiomarqués permet de détecter la présence d'éventuels produits formés sur les plaques à l'aide d'un scanner de radioactivité (Rita Star, Raytest).

Les analyses de métabolites formés sont faites par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

2.7.7 Analyse des produits formés par GC-MS (Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse)



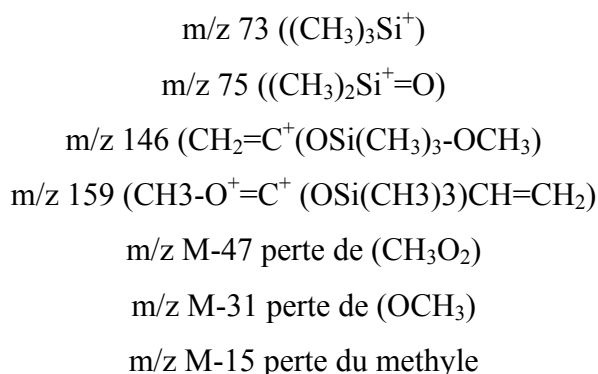
Figure 2.7 : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) de la plateforme métabolomique

Les zones correspondant aux métabolites radioactifs polaires à analyser sont grattées avec une lame de scalpel pour récupérer la silice, puis les métabolites sont élués avec de l'éther ou avec un mélange d'éther/hexane (50 :50, v/v). Après purification, les métabolites formés durant les différentes incubations sont dérivés pour l'analyse en GC-MS. Les groupements carboxyles sont méthylés avec du diazométhane. Puis les groupements hydroxyles libres sont triméthylsilylés par MSTFA (N-Méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide) pour permettre leur caractérisation en spectrométrie de masse.

Les produits dérivés sont injectés dans la colonne capillaire (30m x 250 μ m x 0,25 μ m) HP-5MS (5% Phényl Méthyl Siloxane) de l'appareil de Chromatographie en Phase Gazeuse. Ils sont volatilisés par une augmentation de la température et sous flux d'hélium (1,3mL/min).

Selon les métabolites analysés et la séparation désirée, différents programmes de températures sont utilisés : de 60°C à 310°C à raison de 4°C/min ou de 180°C à 270°C à raison de 2°C/min puis de de 270°C à 310°C à raison de 6°C/min ou encore de 160°C à 310°C à raison de 4°C/min. La sortie de la colonne du chromatographe est reliée à un spectromètre de masse 5973 Network réglé pour un impact de 70eV.

Les spectres de masse caractéristiques des esters méthyliques des triméthylsilyléthers d'acides gras hydroxylés (Eglinton *et al.* 1969, Bjorkhem et Danielsson 1970, McCloskey 1970) présentent des ions de fragmentations communs :



Avec M, la masse du dérivé méthylé et triméthylsilylé de l'acide gras. En plus des ions communs aux acides gras hydroxylés, des ions de fragmentation caractéristiques de chaque composé sont obtenus. Ces ions proviennent de la rupture de la molécule de part et d'autre d'un époxyde ou d'une fonction hydroxyle triméthylsilylée.

2.8 Récolte d'échantillons pour analyse du polymère de cutine

Les échantillons de plantes (feuilles ou organes floraux) sont récoltés et congelés immédiatement dans de l'azote liquide, puis stockés à -80°C. Avant leur analyse, on ajoute 1mL d'isopropanol et on place les échantillons 10 min sur un bloc chauffant à 80°C. Les échantillons sont ensuite déshydratés à l'aide d'une cloche à vide avant d'être envoyés au CEA de Cadarache pour analyse après délipidation (**Figure 2.8**).

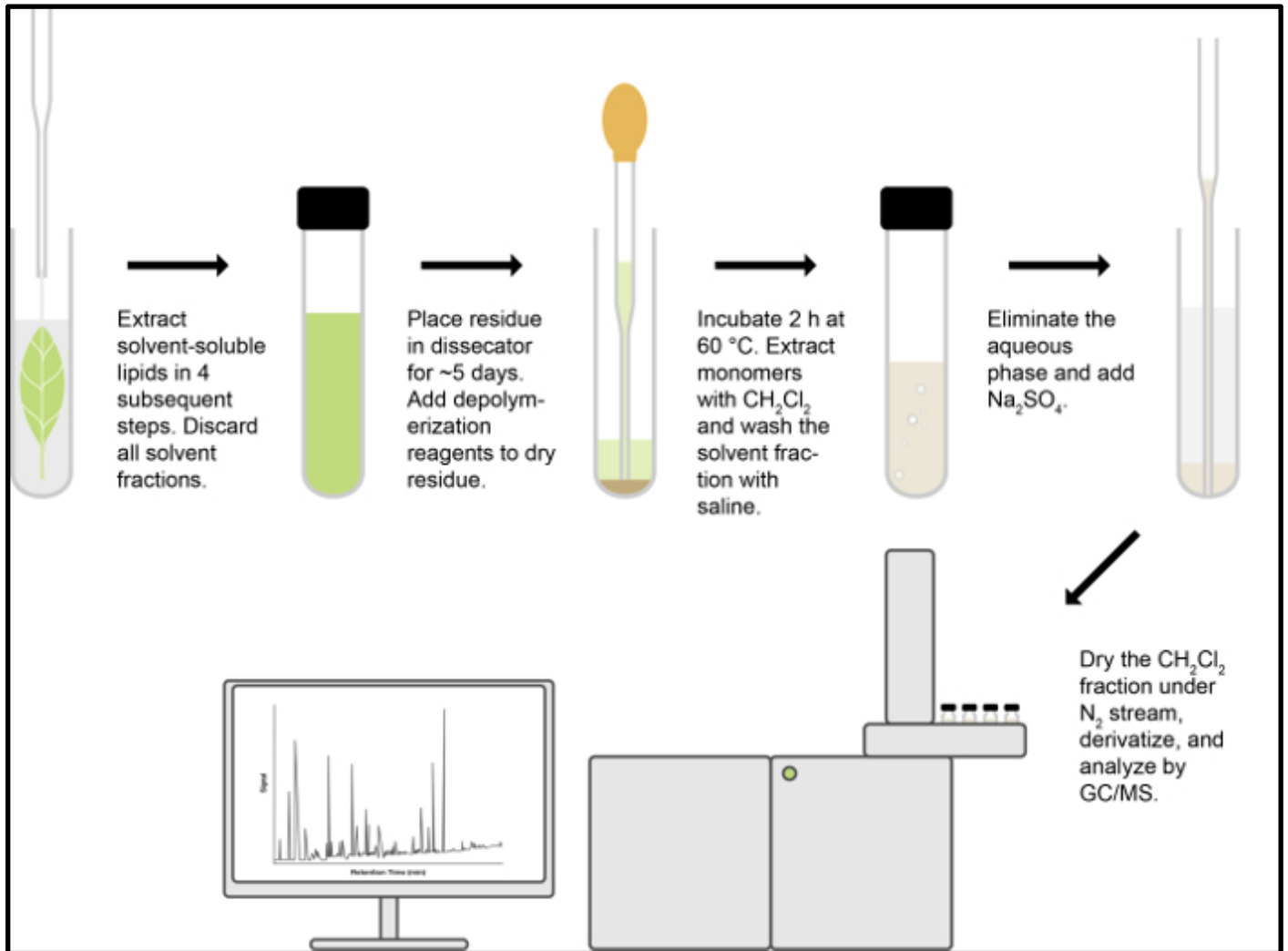


Figure 2.8 : Résumé de la méthode de délipidation qui dure entre 8 et 10 jours (de la récolte des échantillons à l'analyse en GC-MS) (Jenkins *et al.*, 2015)

2.9 Traitements de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* avec des acides gras libres

Lors d'attaque de champignons ou d'herbivores, la feuille va libérer des acides gras suite à la modification de l'intégrité de sa cutine. Ce stress chimique permet de stimuler des réponses transcriptionnelles et des voies de défense chez la plante. Pour mimer ces attaques, des plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 7 à 8 semaines sont traitées à l'aide d'un pinceau ou un spray

(Figure 2.9) avec des acides gras à 10mM en solution dans de la paraffine. Nous traitons 6 feuilles par plante. Les feuilles traitées sont ensuite récoltées et immédiatement congelées dans l'azote liquide à différents temps après traitement (30 min, 1h, 2h, 8h, 12h et 24h). Les échantillons congelés sont conservés à -80°C jusqu'à extraction des ARNs.



Figure 2.9 : Traitement de rosette d'*Arabidopsis thaliana* par spray

2.10 Traitements de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* avec de la cutinase de *Fusarium solani*

La cutinase de *Fusarium solani* recombinante produite chez *Pichia pastoris* a été fournie par le Dr Frédéric Carrière de l'UMR 7282 CNRS-Aix-Marseille, Institut de Microbiologie de la Méditerranée. Son activité spécifique est de 3800U/mg (Dosage au pHStat ; 14,5 mL tampon lipase pancréatique + 500µL TCA, 0,25mM NaTDC, pH8/37°C). Cet échantillon est obtenu après accrochage en batch sur gel S-Sépharose directement à partir du milieu de culture, puis lavage du gel et décrochage avec solution NaCl. La poudre contient principalement de la cutinase comme protéine, le reste étant constitué de sels et probablement quelques traces de peptides du milieu. La solution de cutinase a été appliquée à une concentration de 5mg/mL dans un tampon NaCl 150mM. J'ai ensuite récolté les feuilles à 5 temps après traitement (1h, 6h, 12h, 24h et 48h). Ce traitement a également été combiné avec

le test de blessure pour lequel on applique 3 à 4 pincements perpendiculaires à la nervure centrale à l'aide d'une pince hémostatique. Ceci permet de stimuler de manière synchrone des réponses similaires à celle induite par une attaque d'insecte.

2.11 Test de Perméabilité

2.11.1 Coloration du Bleu de Toluidine

Les plantes sont placées pendant 3h à température ambiante dans une solution de bleu de Toluidine 0,05% (poids/volume). Après avoir été rincées avec de l'eau distillée, les plantes sont observées avec un microscope (Motic SMZ-168 Series; Motic, Chine).

2.11.2 Coloration aux sels de Tetrazolim

On incube des graines pendant 4 à 48 heures dans une solution aqueuse contenant 1% de Tetrazolium Red (w/v) (Debeaujon *et al.*, 2000 ; Beisson *et al.*, 2007). Les graines sont ensuite observées à la loupe Binoculaire (Motic SMZ-168 Series).

2.11.3 Test de perte hydrique

On utilise des rosettes ayant 32-35 jours. Pour chaque analyse, on coupe 3 à 4 feuilles que l'on dépose sur la face supérieure à température ambiante. Les feuilles sont ensuite pesées pour mesurer la perte en eau 60, 120 et 180 minutes après coupure (Jakobson *et al.*, 2016).

2.11.4 Test de stress sur la germination des graines

Pour évaluer l'effet du stress osmotique sur les graines, des graines sont semées sur du milieu MS avec 1% de saccharose, 1% d'agar avec du Mannitol (400, 500 ou 600mM). Trois répétitions techniques de 100 graines sont réalisées pour mesurer le pourcentage de germination. Les graines ont été stérilisées puis déposées sur les boîtes qui sont placées pendant 48h à 4°C à l'obscurité pour stratification. Enfin, elles ont été placées à 21-23°C, 16h de lumière par jour, humidité de 70%. L'observation des graines est réalisée avec une loupe binoculaire (Motic SMZ-168 Series) toutes les 12h pendant 5 jours.

Chapitre III : Résultats

Chapitre III : Résultats

Partie I : Etude de CYP77B1

3.1 Etude *in silico* d'un gène candidat *CYP77B1*

Récemment chez *Arabidopsis thaliana*, 2 membres de la famille des CYP77, CYP77A4 (Sauveplane *et al.*, 2009) et CYP77A6 (Li-Beisson *et al.*, 2009) ont été caractérisés dans mon laboratoire de thèse. Comme indiqué auparavant, CYP77A6 est impliqué dans la formation de la cutine au niveau des pétales en produisant les monomères hydroxylés en C16 (Li-Beisson *et al.*, 2009). Le rôle de CYP77A4 est en cours d'investigation et il a été démontré que cette enzyme est capable d'époxyder *in vitro*, les acides gras insaturés (Sauveplane *et al.*, 2009). Plus récemment sur la base d'homologies de séquences, deux clones d'ADNc de nouveaux cytochromes P450, CYP77A19 et CYP77A20, ont été isolés à partir de tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Grausem *et al.*, 2014). Ces deux P450s sont capables d'hydroxyler les acides gras. De plus, CYP77A19 est capable de produire, *in vitro*, des époxydes d'acides gras insaturés.

Afin d'identifier d'autres cytochromes P450s capables d'époxyder les acides gras et qui sont impliqués dans la synthèse de la cutine, nous avons utilisé des données accessibles *in silico* du transcriptome afin d'identifier des gènes de P450s co-exprimés avec des gènes d'enzymes impliqués dans la synthèse de la cutine. Nous avons utilisé la plateforme CYPEDIA (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr/CYPedia>; Ehlting *et al.*, 2008). Cette approche nous a permis d'identifier un gène *At1G11600* (*CYP77B1*) d'*Arabidopsis thaliana*, qui est co-exprimé avec des gènes codant pour des désaturases qui sont impliqués dans la formation des insaturations dans les acides gras nécessaires pour la formation d'époxydes. Ce gène est également co-exprimé avec le gène d'une époxyde hydrolase potentielle (**Tableau 7**). En nous basant sur ces résultats, nous avons décidé de focaliser mon travail de recherche sur CYP77B1. Son appartenance à la famille des CYP77, dont plusieurs membres ont été décrits comme capables d'époxyder ou hydroxyler les acides gras, suggère que CYP77B1 pourrait avoir des capacités catalytiques voisines ou identiques.

Locus	r-value	Name	Description
At1g11600	1	CYP77B1	Cytochrome P450 family protein
At1g06350	0,739		Fatty acid desaturase family protein, similar to delta 9 acyl-lipid desaturase (ADS1) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
At5g47500	0,736		Pectinesterase family protein
At5g23940	0,730		Transferase family protein, similar to anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase, <i>Dianthus caryophyllus</i>
At1g06100	0,715		Fatty acid desaturase family protein, similar to delta 9 acyl-lipid desaturase (ADS1) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
At1g06120	0,715		Fatty acid desaturase family protein, similar to delta 9 acyl-lipid desaturase (ADS1) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
At4g22490	0,709		Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At5g19290	0,703		Esterase/lipase/thioesterase family protein, low similarity to monoglyceride lipase (<i>Homo sapiens</i>)
At3g05600	0,691		Similar to epoxide hydrolase (<i>Glycine max</i>)

Tableau 7 : Gènes co-régulés avec *CYP77B1* (issu de la base de données CYPEDIA)

3.2 Etude de la localisation spatio-temporelle de *CYP77B1*

3.2.1 Etude de l'expression de *CYP77B1* en fonction de l'organe de la plante

Des données *in silico* basées sur des analyses transcriptomiques (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/>) indiquent que *CYP77B1* est fortement exprimé au niveau de la fleur. Nous avons donc réalisé une étude comparative de l'expression de *CYP77B1* dans tous les organes de la plante en nous intéressant plus particulièrement aux fleurs à différents stades de développement (**Figure 3.1**). Les expériences ont été réalisées sur 50 fleurs collectées, et cette expérience a été répétée 3 fois (réplicats biologiques). De plus, lors de la qPCR, 3 réplicats techniques ont également été réalisés.

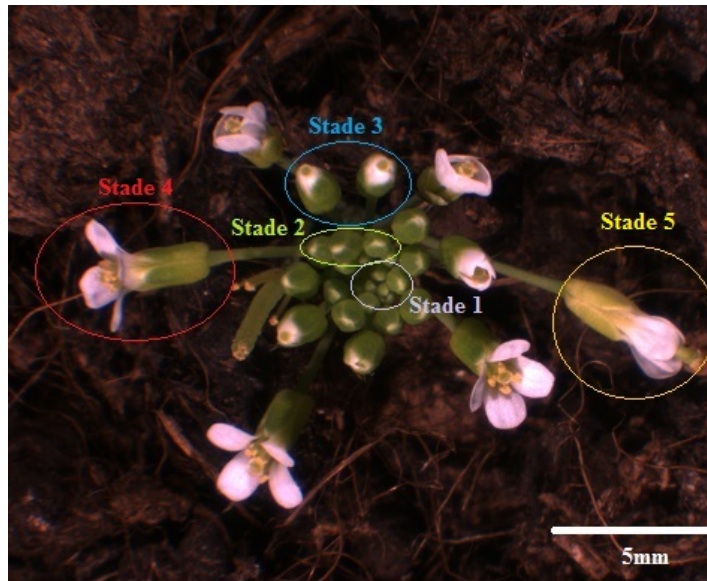


Figure 3.1 : Représentation des différents stades floraux sur une hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* (Loupe Binoculaire x10)

Nous avons pu confirmer que le niveau de transcrits de *CYP77B1* est plus important dans les fleurs (**Figure 3.2**) que dans les autres organes comme les feuilles de la hampe ou de la rosette avant floraison où l'expression de *CYP77B1* est quasiment nulle. On retrouve un faible niveau de transcrits également au niveau de l'apex et dans le pollen (**Figure 3.2**).

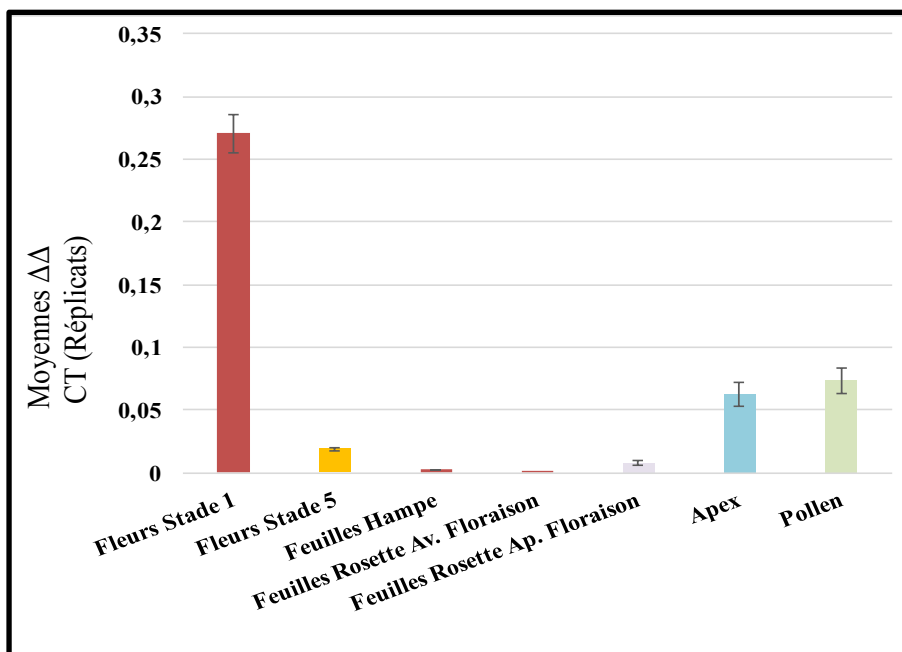


Figure 3.2 : Expression de *CYP77B1* dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* et à différents stades floraux. Son niveau d'expression a été mesuré par RT-qPCR ; Niveau relatif de transcrits de *CYP77B1* dans les différents organes chez *Col0*.

L'analyse des différents stades floraux montre que l'expression de *CYP77B1* diminue au cours du développement de la fleur (**Figure 3.3**). En effet, dans les fleurs aux stades 1 et 2 (bourgeons centraux), le niveau de transcrits est 3 fois plus important que dans les fleurs au stade 4 et 5.

3.2.2 Etude de l'expression de *CYP77B1* en fonction du stade floral

Nous nous sommes intéressés ensuite plus particulièrement à l'expression de *CYP77B1* dans les différents stades floraux. L'expression de *CYP77B1* est plus importante dans les premiers stades de développement (Stade 1 et 2) puis elle diminue fortement lorsque la fleur est ouverte. Ceci suggère que *CYP77B1* jouerait donc un rôle dans la formation de la cutine au cours du développement de la fleur.

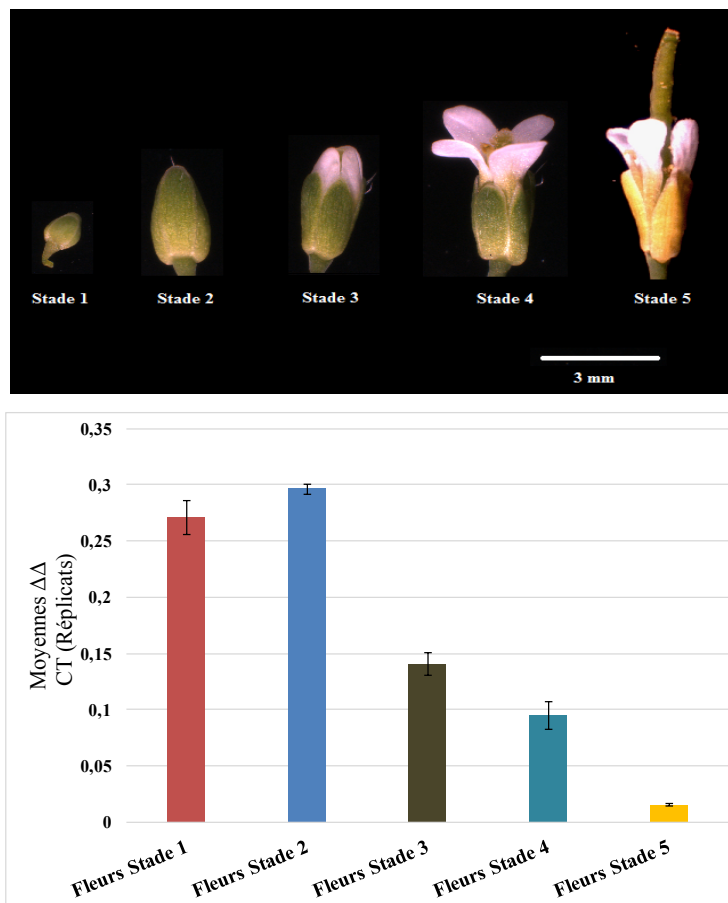
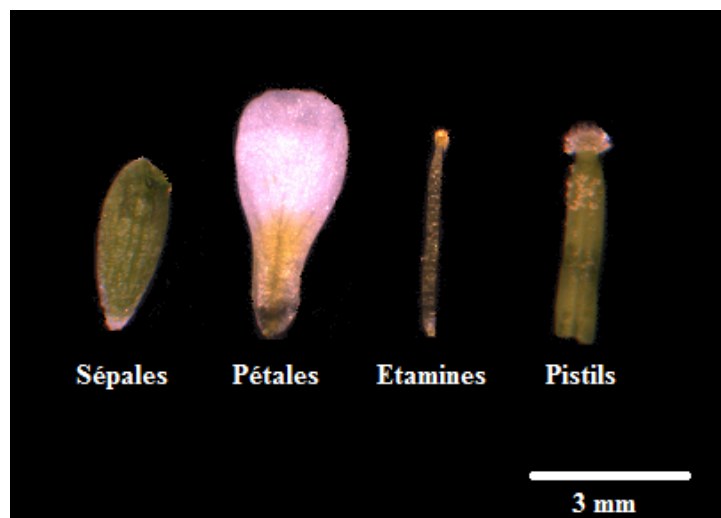


Figure 3.3 : Expression de *CYP77B1* d'*Arabidopsis thaliana* à différents stades floraux chez *Col0*. Les différents stades floraux sont observés à la loupe Binoculaire x 10 et les niveaux relatifs de transcrits de *CYP77B1* au cours du développement floral sont déterminés par RT-qPCR

Des fleurs d'*Arabidopsis thaliana* au stade 4 ont été utilisées pour réaliser la dissection des organes floraux. En effet, il est difficile de disséquer les fleurs à des stades plus précoces chez cette plante modèle. Cette expérience (**Figure 3.4**) a pour but de déterminer le profil d'expression plus précisément dans les organes de la fleur. Les résultats présentés (**Figure 3.4**), montrent que l'expression de *CYP77B1* dans les fleurs (au stade 4) est localisée plus précisément dans le pistil et les sépales. En revanche, les transcrits de *CYP77B1* ne sont pratiquement pas détectables dans les pétales et les étamines.

(A)



(B)

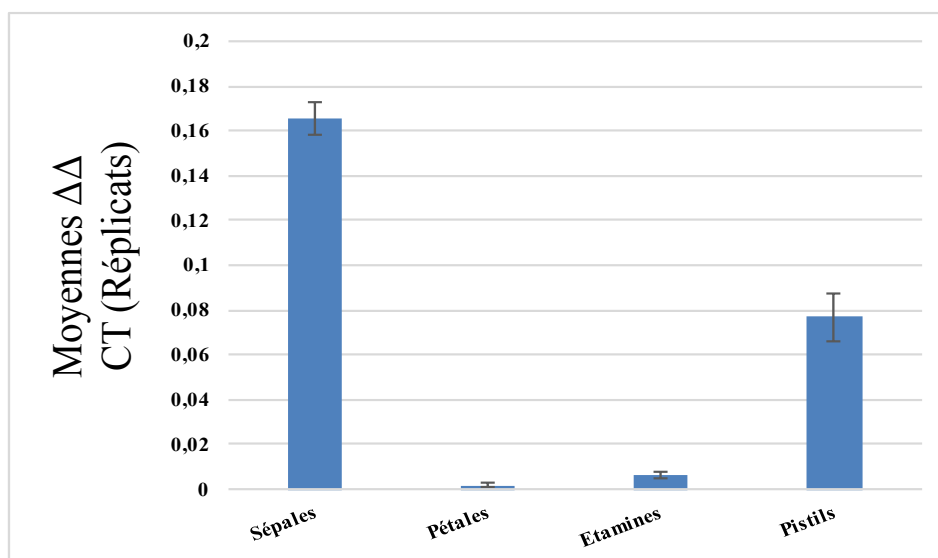


Figure 3.4 : Expression de *CYP77B1* dans des fleurs ouvertes (Stade 4) d'*Arabidopsis thaliana*. Les profils d'expression ont été déterminés par PCR quantitative. (A) Les différents organes floraux sont observés à la loupe Binoculaire x 20 (B) Niveau relatif de transcrits de *CYP77B1* dans les différentes pièces florales chez *Col0*

3.2.3 Etude de l'expression spatio-temporelle de *CYP77B1* par le gène rapporteur *GUS*

En complément de l'étude de l'expression de *CYP77B1* par RT-qPCR, nous avons transformé des plantes avec une construction codant pour le gène *GUS* sous le contrôle du promoteur (2000pb amplifié pour avoir le maximum d'éléments régulateurs) de *CYP77B1* pour étudier la localisation de l'expression de *CYP77B1* au niveau des organes de la plante (Figure 3.5).

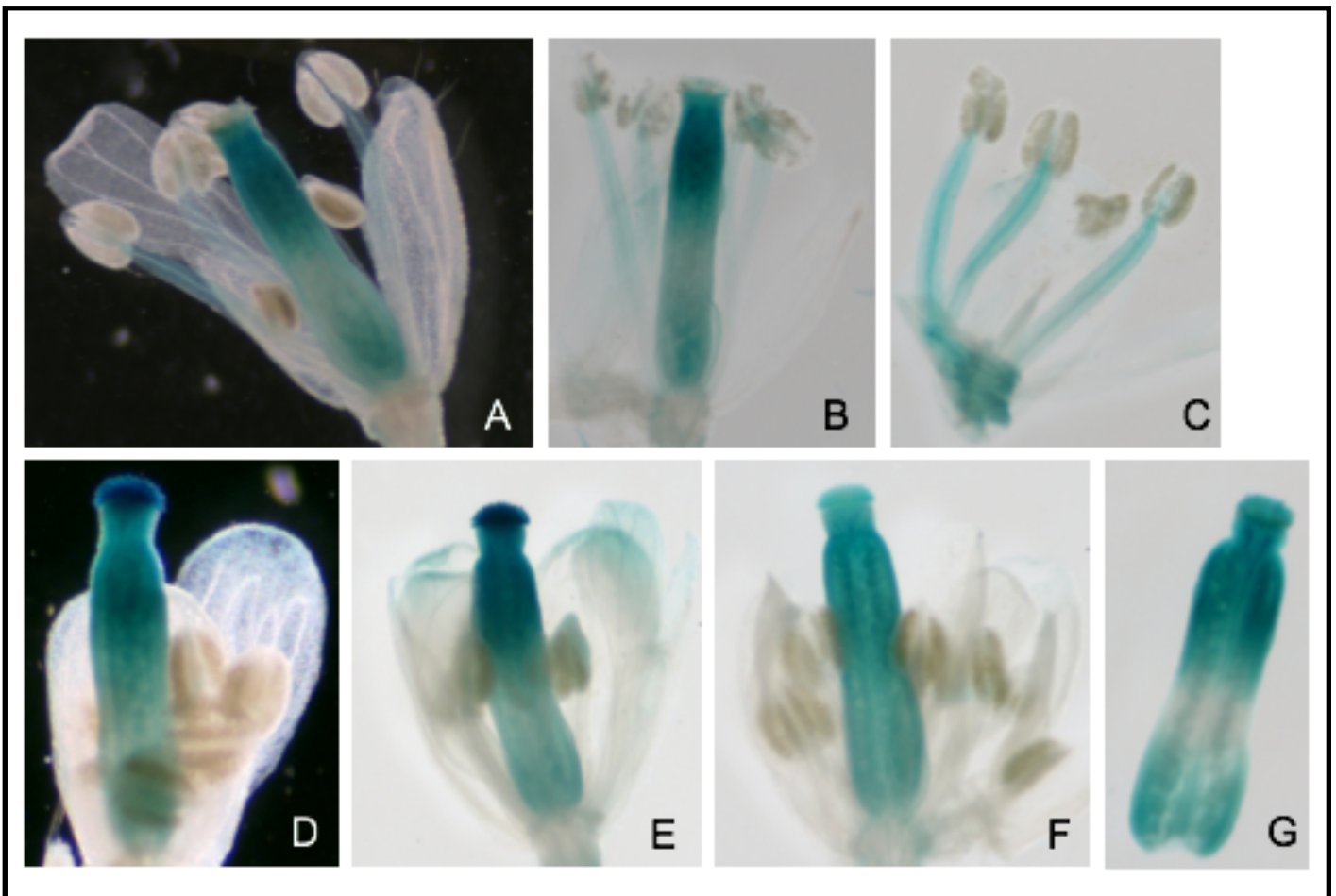


Figure 3.5 : Expression du gène rapporteur *GUS* sous le contrôle du promoteur de *CYP77B1*, (A) Fleur au stade 4, (B) et (C) Pistil et Etamines au stade 4 (D à G), Fleurs au stade 2 et 3.

Les colorations ont été effectuées sur des hampes florales de plusieurs plantes différentes issues de la première ainsi que de la deuxième génération. Le profil d'expression du gène rapporteur *GUS* au niveau de la plante indique que *CYP77B1* est exprimé au niveau

du pistil (**Figure 3.5**) quel que soit le stade floral observé (**Figure 3.5, A,D**). Cette expression de *CYP77B1* au niveau du pistil se trouve plus spécifiquement à ses extrémités (**Figure 3.5, G**).

CYP77B1 est exprimé également dans les papilles stigmatiques (**Figure 3.5, D,E**) ainsi que dans les étamines des fleurs aux stades 4 et 5 (**Figure 3.5, C**) et plus précisément dans les filets des anthères. On n'observe aucune coloration bleue ni au niveau des racines, ni au niveau des feuilles et des tiges (Photos d'observation non montrées).

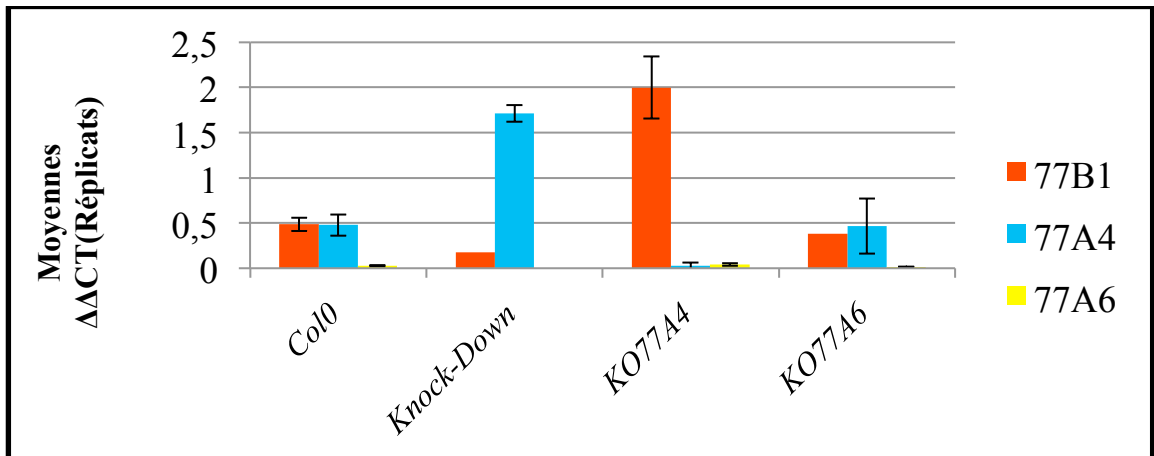
3.3 Etude de l'expression de *CYP77B1* chez *cyp77a4* et *cyp77a6* et expression de *CYP77A4* et *CYP77A6* dans un mutant knock-down *cyp77b1*

Des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont permis de caractériser *CYP77A4* comme étant capable d'époxyder les acides gras (Sauveplane *et al.*, 2009). Ces travaux ont également mis en évidence le rôle de *CYP77A6* dans la biosynthèse de cutine au niveau de la fleur (Li-Beisson *et al.*, 2009). Des P450s appartenant à une même famille interviennent souvent dans des mêmes voies métaboliques et peuvent aussi avoir des capacités catalytiques similaires voire identiques. Nous avons donc étudié l'impact du niveau d'expression d'un membre de la famille *CYP77* sur le niveau d'expression des autres membres dans un premier temps sur des rosettes (« vegetative rosette », stade deux semaines).

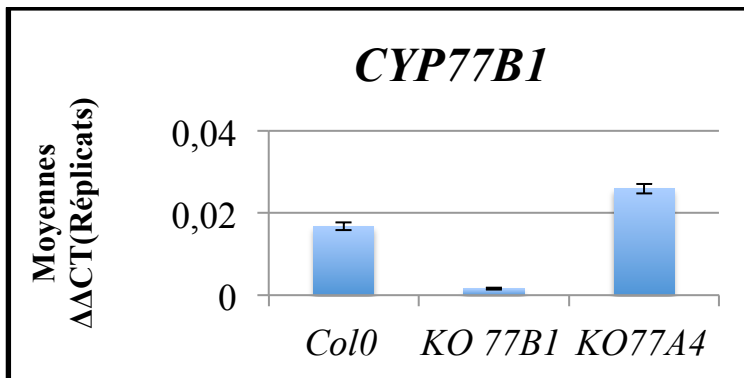
Comme le montre la **Figure 3.6**, le niveau de transcrits de *CYP77B1* chez *cyp77A4* est 3 fois plus important que celui observé chez *Col0*. Réciproquement chez les knock-down *cyp77b1*, l'expression de *CYP77A4* est 4 fois plus importante que chez *Col0* (**Figure 3.6, A**). En revanche, on ne voit pas d'effet chez les différents mutants de l'expression de *CYP77A6*.

L'expérience est renouvelée cette fois sur des fleurs avec la deuxième lignée de *cyp77b1*, lorsqu'on mesure l'expression de *CYP77A4*, on peut voir qu'elle double chez le mutant par rapport au *Col0* (**Figure 3.7, C**). On peut observer le même effet chez le mutant *cyp77a4* où l'expression relative de *CYP77B1* mesurée double également (**Figure 3.6, B**). Ceci suggère une redondance entre les gènes *CYP77B1* et *CYP77A4* et pas avec *CYP77A6* qui voit son expression inchangée chez les deux mutants. Ceci va dans le sens de notre hypothèse : *CYP77B1* pourrait avoir une activité d'époxydation comme ce qui a pu être observée précédemment pour *CYP77A4* (Sauveplane *et al.*, 2009)

(A)



(B)



(C)

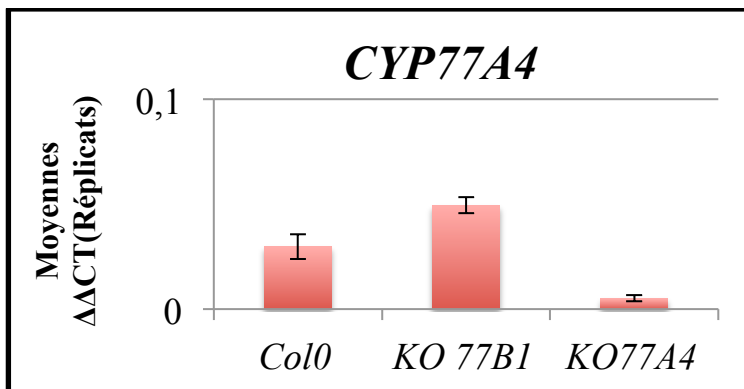


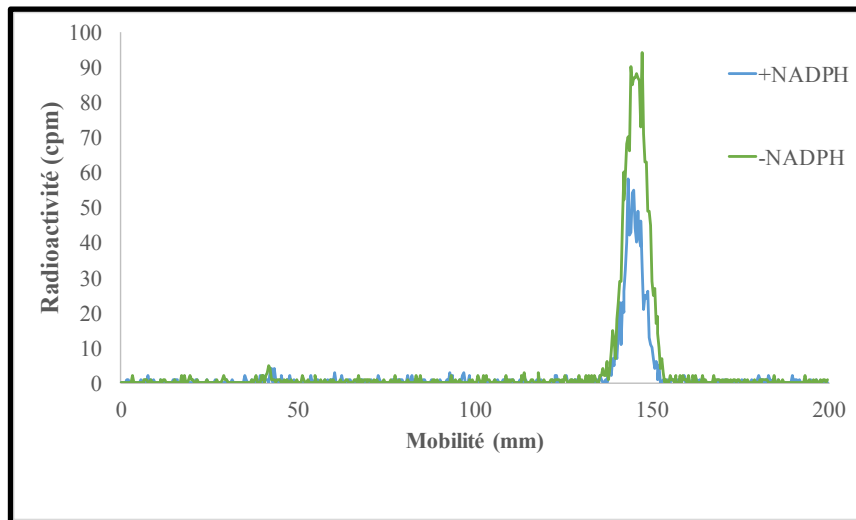
Figure 3.6 : Expression des gènes de la famille CYP77 chez les mutants des CYP77 au stade « vegetative rosette », deux semaines. (A) Expression des CYP77 chez les mutants *kd77b1* (1^{ère} lignée), *cyp77A4*, *cyp77A6*, (B) Expression de *CYP77B1* chez les mutants *cyp77b1* (2^{ème} lignée), *cyp77A4*, (C) Expression de *CYP77A4* dans les fleurs chez les mutants *cyp77b1* (2^{ème} lignée), *cyp77A4*

3.4 Mesure de l'activité enzymatique *in vitro* de CYP77B1

Afin de tester les capacités catalytiques de CYP77B1, la protéine a été produite dans le système hétérologue de levure. Les microsomes, qui représentent la fraction subcellulaire enrichie en réticulum endoplasmique où sont localisés les cytochromes P450s, ont été extraits par centrifugations différentielles. Nous avons ensuite incubé ces microsomes avec l'acide laurique (C12:0) qui est un substrat modèle. Ce substrat ne contient pas de double liaison, ainsi il ne peut pas être substrat d'enzymes du type lipoxigénase ou peroxygénase qui pourraient interférer avec les mesures de l'activité enzymatique de CYP77B1.

L'incubation de microsomes de levures (**Figure 3.7**) exprimant *CYP77B1* a lieu en absence ou en présence de NADPH qui est le cofacteur indispensable au cycle catalytique d'un P450. Aucun métabolite n'est formé même en présence de NADPH (**Figure 3.7, A**). De la même façon, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité enzymatique avec des acides gras de différentes longueurs de chaînes (C14:0, C16:0) et d'acides gras en C18 saturés (C18:0) ou insaturés (C18:1, C18:2). Afin de valider notre protocole de transformation et d'extraction de microsomes, nous avons travaillé en parallèle avec CYP94C1 (**Figure 3.7, B**), une ω -hydroxylase d'acide gras caractérisée au laboratoire (Kandel *et al.*, 2006). Lors de l'incubation des microsomes de levure exprimant CYP94C1, on peut voir que l'on a des métabolites formés (**Figure 3.7 B**). Ceci suggère que notre protocole d'extraction et d'incubations sont corrects. Les incubations de CYP77B1 avec les différents substrats testés ne permettant pas de mettre en évidence une activité, il est possible que les substrats testés ne soit pas ceux que métabolise l'enzyme ou qu'il y ait un problème lors de la production de l'enzyme.

(A)



(B)

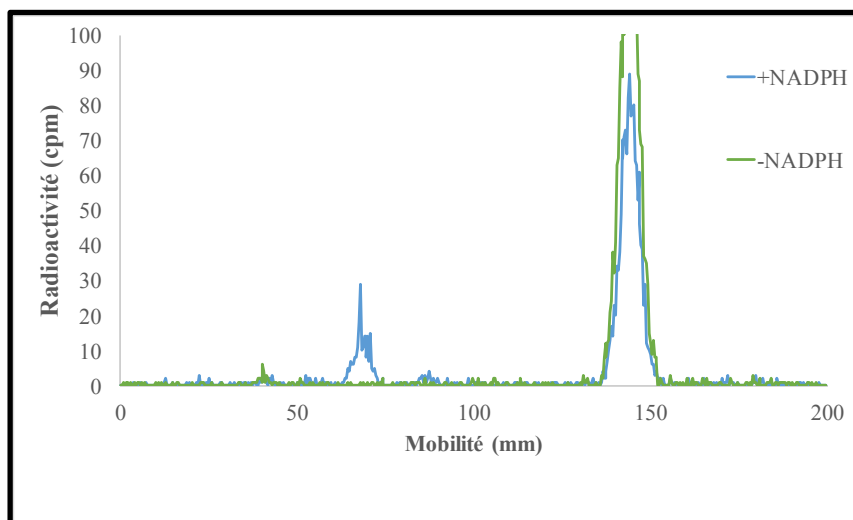


Figure 3.7 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de C12 :0 en présence de microsomes de levures exprimant *CYP77B1* (A) ou *CYP94C1* (B) , en absence (Courbes vertes) ou en présence (Courbes bleues) de NADPH. Les microsomes (0.4mg de protéines) sont incubés avec 100 μ M [1-¹⁴C] de substrat. Les incubations sont réalisées à 27°C pendant 10 min.

3.4.1 Etude *in silico* des domaines transmembranaires des P450s de la famille CYP77

Les cytochromes P450s sont des enzymes membranaires intégrées au niveau du réticulum endoplasmique grâce principalement à une ancre hydrophobe située à l'extrémité N-terminale de la protéine et grâce à des hélices transmembranaires. Nous avons entrepris

l'analyse des séquences protéiques afin de prédire le nombre d'hélices transmembranaires de CYP77B1, CYP77A4 et CYP77A6. Comme le montre la **Figure 3.8**, CYP77A6 et CYP77A4 présentent des profils transmembranaires très similaires qui montrent que les 40 acides aminés de la partie N-terminale ont une localisation membranaire avec une probabilité de 1. En revanche, cette probabilité n'est que de 0,5 pour CYP77B1 ce qui suggère un ancrage plus faible.

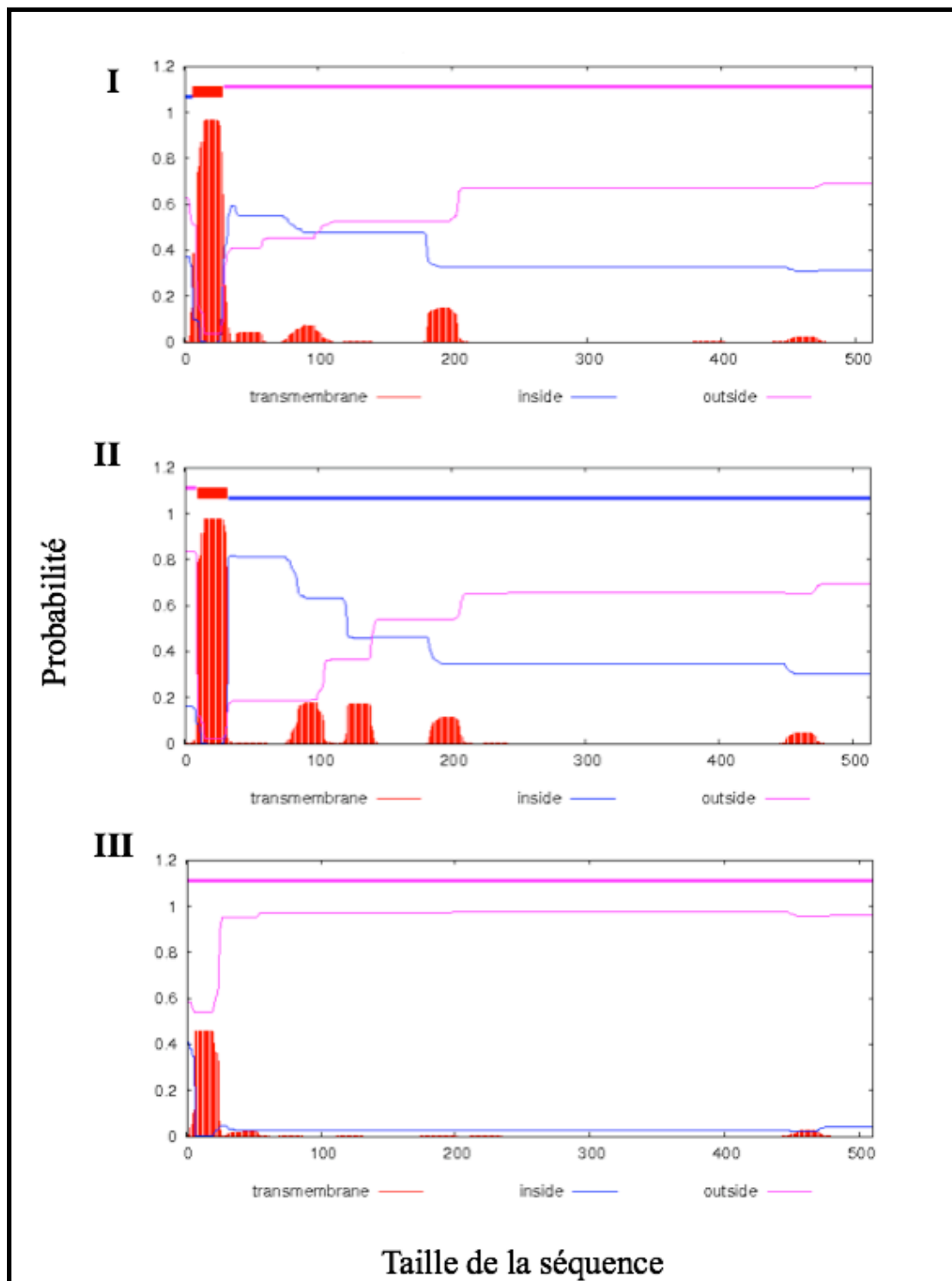


Figure 3.8 : Analyse *in silico* des domaines transmembranaires de CYP77A4 (I), CYP77A6 (II) et CYP77B1 (III) d'après <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

3.4.2 Modification du domaine transmembranaire de CYP77B1

Afin de voir si l'absence d'activité enzymatique observée chez CYP77B1 ne pouvait pas provenir d'un mauvais ancrage au niveau du RE, nous avons modifié la partie N-Terminale de la protéine. Le domaine transmembranaire de CYP77B1 a été modifié avec l'ancre de CYP73A92 (**Figure 3.9**) de *Brachypodium distachyon*. En effet, ce P450 présente une forte activité catalytique lorsqu'il est exprimé dans la levure (Renault *et al.*, 2017). De plus, 300 nucléotides en 5' ont été recodés pour favoriser l'expression dans la levure.

MDFLFVEKLLVGLLASALVAIAVSKIRGRKLLKLP

Figure 3.9 : Séquence protéique de l'ancre membranaire de CYP73A92

3.4.3 Mesure de l'activité enzymatique *in vitro* de CYP77B1 modifié

Afin de tester les capacités catalytiques de CYP77B1, la protéine modifiée a été produite dans le système hétérologue de levure. Les microsomes sont ensuite incubés avec l'acide laurique (C12:0), notre substrat modèle. L'incubation de microsomes de levures exprimant *CYP77B1* a lieu en présence (**Figure 3.10, A**) ou en absence (**Figure 3.10, B**) de NADPH qui est le cofacteur indispensable au cycle catalytique d'un P450.

En présence de NADPH, deux métabolites polaires sont produits à partir de l'acide laurique (pic 1 et 2). De la même façon, avec l'acide oléique (C18:1), on peut voir plusieurs métabolites formés (**Figure 3.10, B**). Il est donc nécessaire de déterminer quels sont les produits formés lors de ces incubations. Pour cela on va utiliser la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

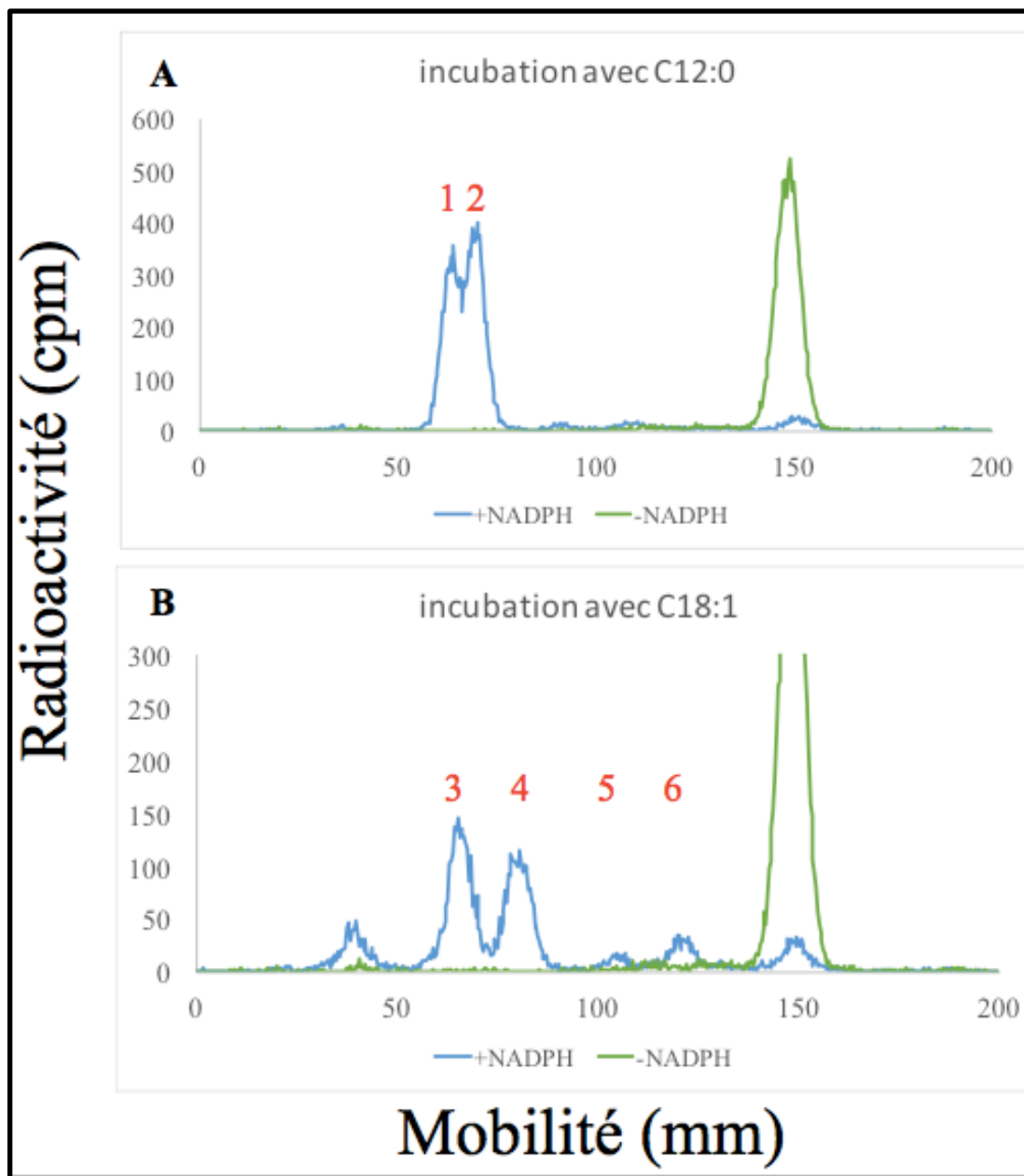


Figure 3.10 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de C12 :0 avec avec les microsomes exprimant *CYP77B1* modifié (A) avec NADPH (courbe bleue), sans NADPH (courbe verte), après l'incubation avec C18:1 (B) avec NADPH (courbe bleue) sans NADPH (courbe verte). Les microsomes (0.4mg de protéines) sont incubés avec 100 μ M [1- 14 C] de substrat. Les incubations sont réalisées à 27°C pendant 10 min.

3.5 Identification des métabolites formés par CYP77B1

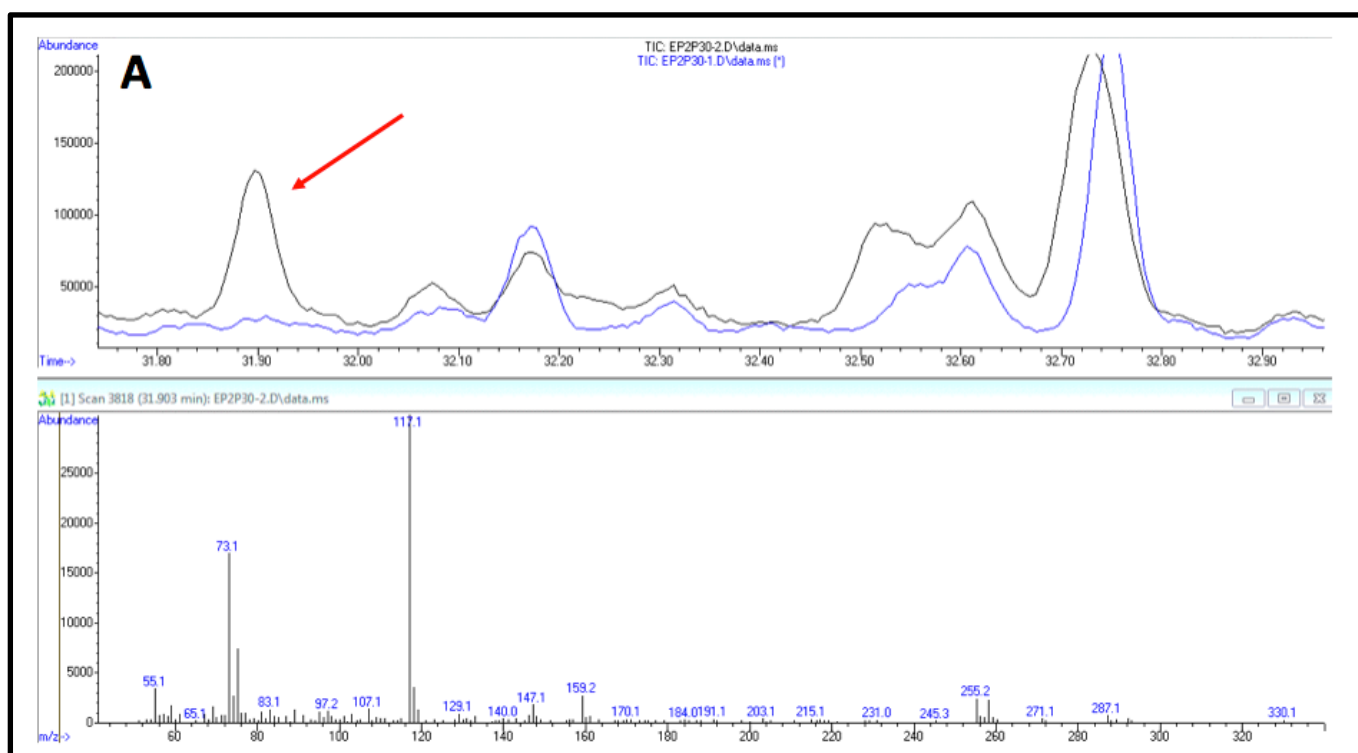
3.5.1 Hydroxylation dans la chaîne par CYP77B1

Afin de déterminer l'identité des métabolites, ceux-ci ont été purifiés, dérivatisés et soumis à une analyse en spectrométrie de masse (GC-MS).

J'ai réalisé une analyse simultanée des produits formés par l'incubation du C12:0 avec CYP77B1 (Pic 1 et 2 **Figure 3.10A**). Le spectre de masse du métabolite dérivé obtenu dont le temps de rétention est de 31,90 min (**Figure 3.11 A**) a montré les ions à m/z (intensité relative %) des valeurs de 117 (100%) 73 ((CH₃)₃Si⁺) (54%) 287 (M-15) (perte de OCH₃ à partir d'ester de méthyle, 8%), 255 M-47 (perte de CH₃O₂, 8%). Ce schéma de fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 11-hydroxylaurique (ω -1) (M = 302) (Egliton *et al.*, 1968) (**Figure 3.12 A**).

Le spectre de masse du métabolite dérivé obtenu dont le temps de rétention est de 31,55 min a montré l'ion à m/z (intensité relative %) des valeurs de 73 ((CH₃)₃Si⁺) (100%) 131 (54%), 273 (15%), 255 M-47 (perte de CH₃O₂, 3%). (**Figure 3.11 B**). Ce schéma de fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 10-hydroxylaurique (ω -2) (M = 302) (**Figure 3.12 B**).

Le spectre de masse du métabolite dérivé a montré l'ion à m/z (intensité relative %) des valeurs de 73 ((CH₃)₃Si⁺) (100%) 145 (95%), 259 (35%), 287 (M-15) (perte de OCH₃ à partir d'ester de méthyle, 8%) (**Figure 3.11 C**). Ce schéma de fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 9-hydroxylaurique (ω -3) (M = 302) (**Figure 3.12 C**).



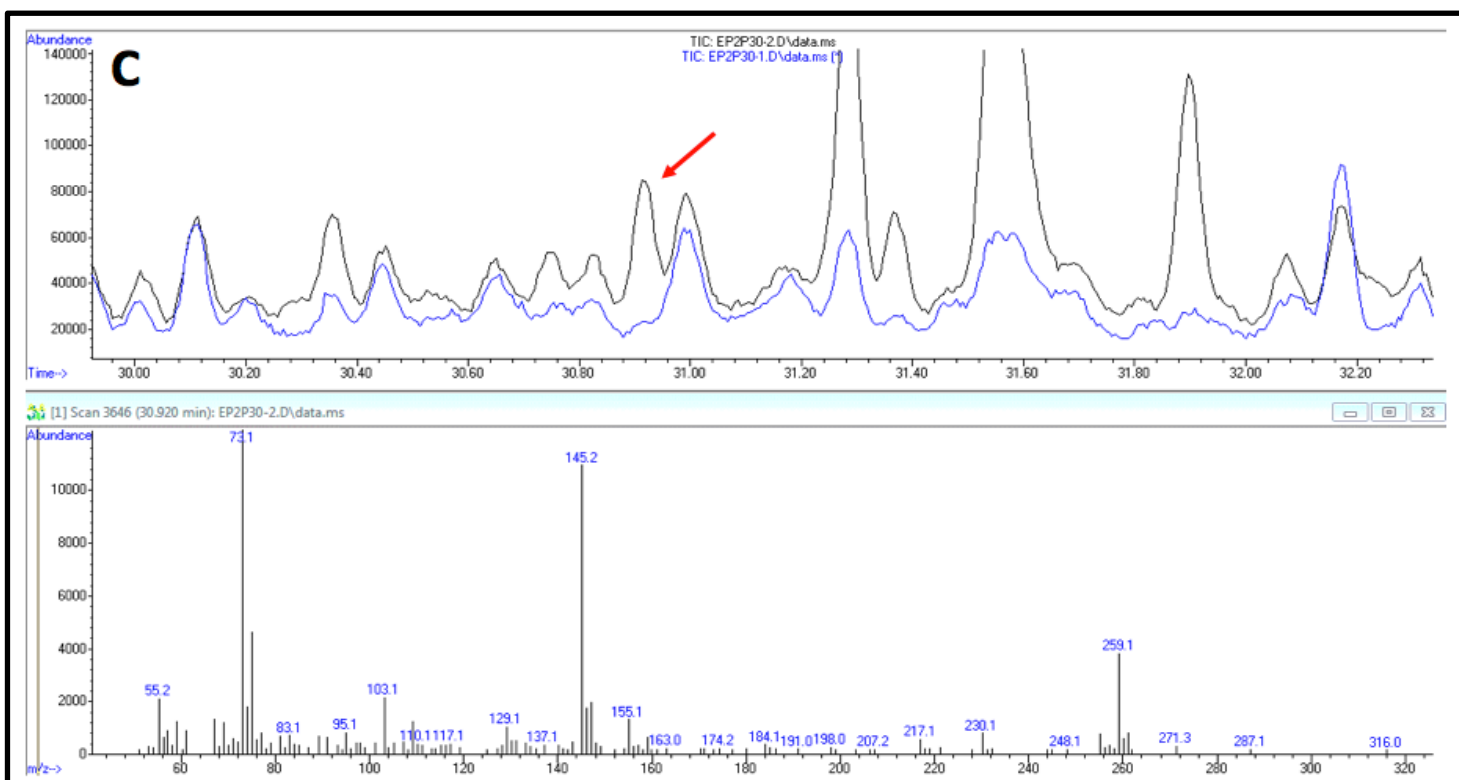
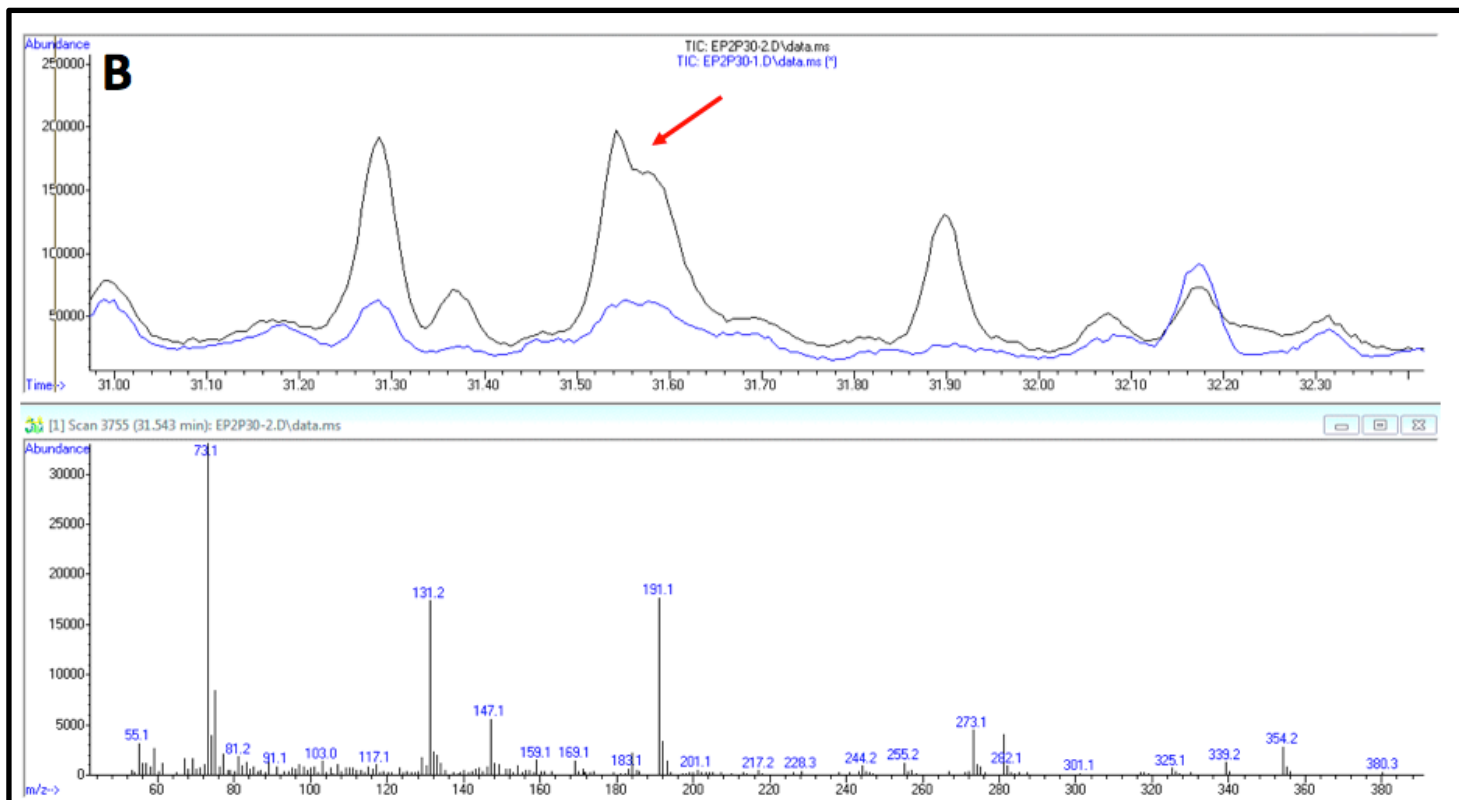
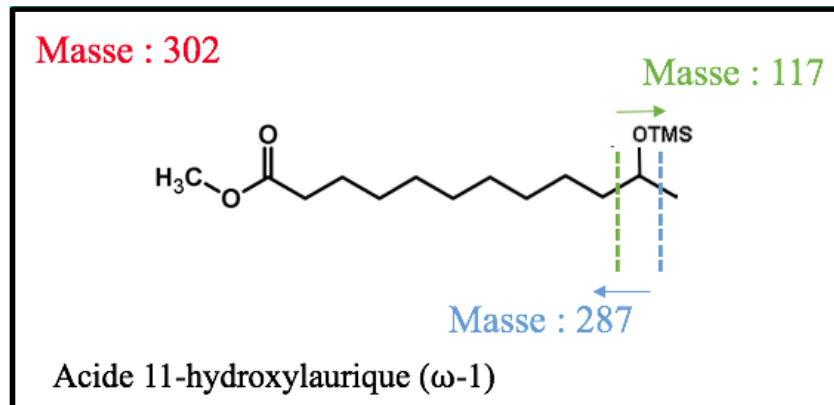
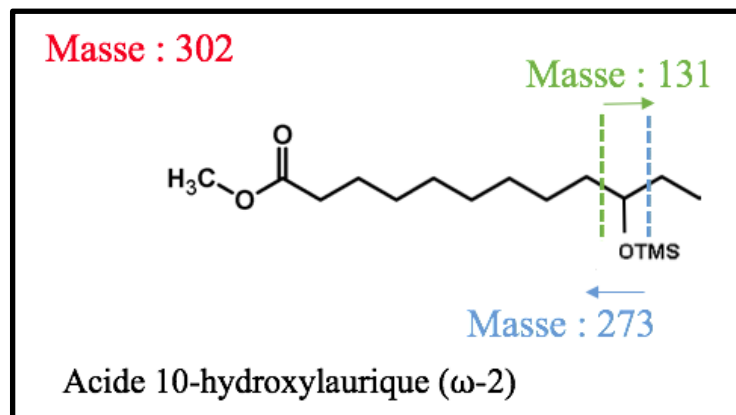


Figure 3.11 : Analyse en GC-MS des métabolites formés lors de l'incubation de l'acide laurique avec CYP77B1, Pic 1 et 2 de la figure 3.10. L'incubation a lieu en présence (courbe noire) et en absence (courbe bleue) de NADPH

(A)



(B)



(C)

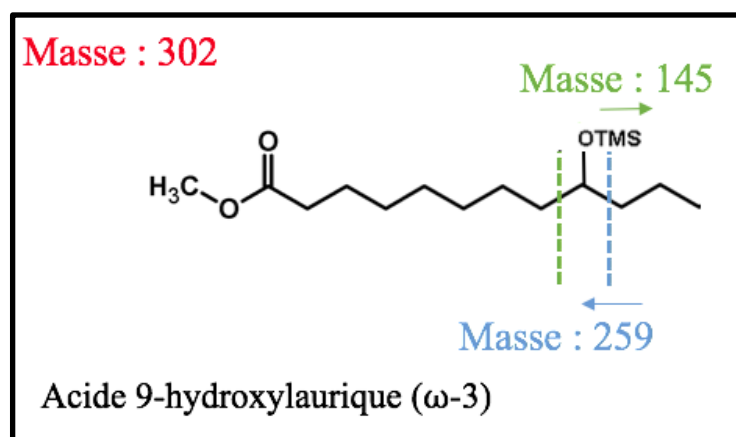


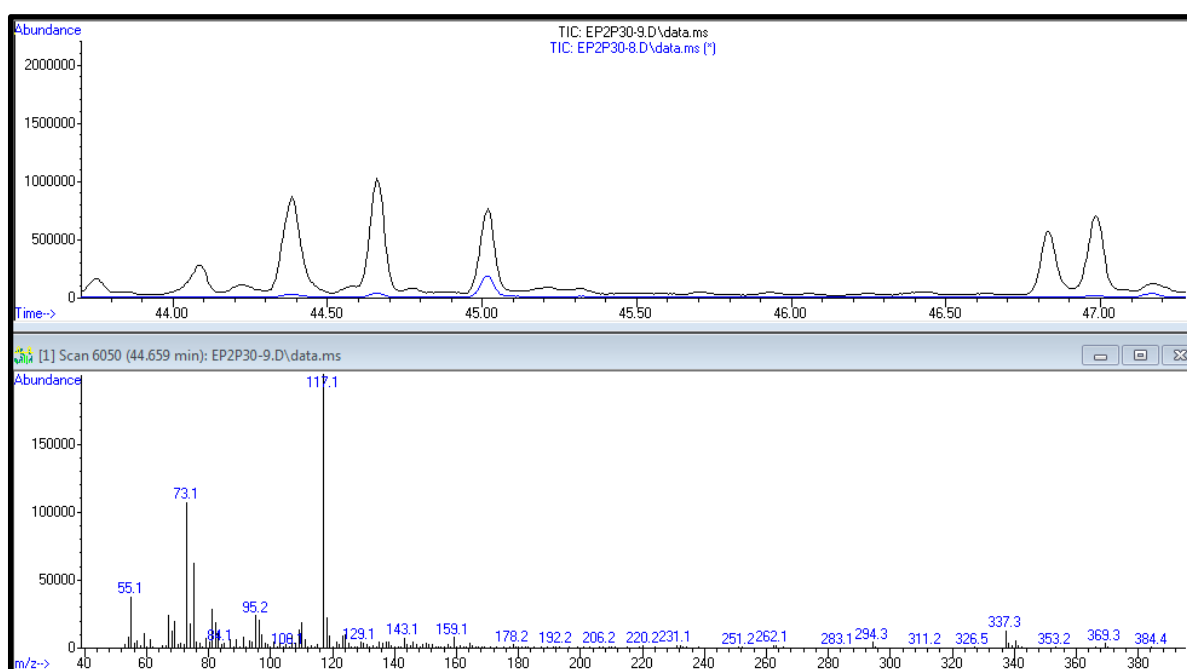
Figure 3.12 : Formules chimiques représentant (A) l'acide 11-hydroxylaurique, (B) l'acide 10-hydroxylaurique, (C) l'acide 9-hydroxylaurique dérivatisés avec leurs fragmentations en GC-MS

J'ai ensuite réalisé une analyse simultanée des produits formés majoritairement (2 et 3) dans l'incubation du C18 :1 avec CYP77B1 (Pic 3,4,5,6 **Figure 3.10 B**). Cette analyse montre la présence de 3 métabolites. Le spectre de masse du métabolite dérivé obtenu dont le temps de rétention est de 44,665 min (**Figure 3.13 A**) a montré les ions à m / z (intensité relative %) des valeurs de 117 (100%) 73 ((CH₃)₃Si +) (54%) 369 (M-15) (perte de OCH₃ à partir d'ester de méthyle, 4%), 337 M-47 (perte de CH₃O₂, 8%). Ce schéma de fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 17-hydroxyoléique (ω-1) (M = 384) (Egliton *et al.*, 1968) (**Figure 3.14 A**).

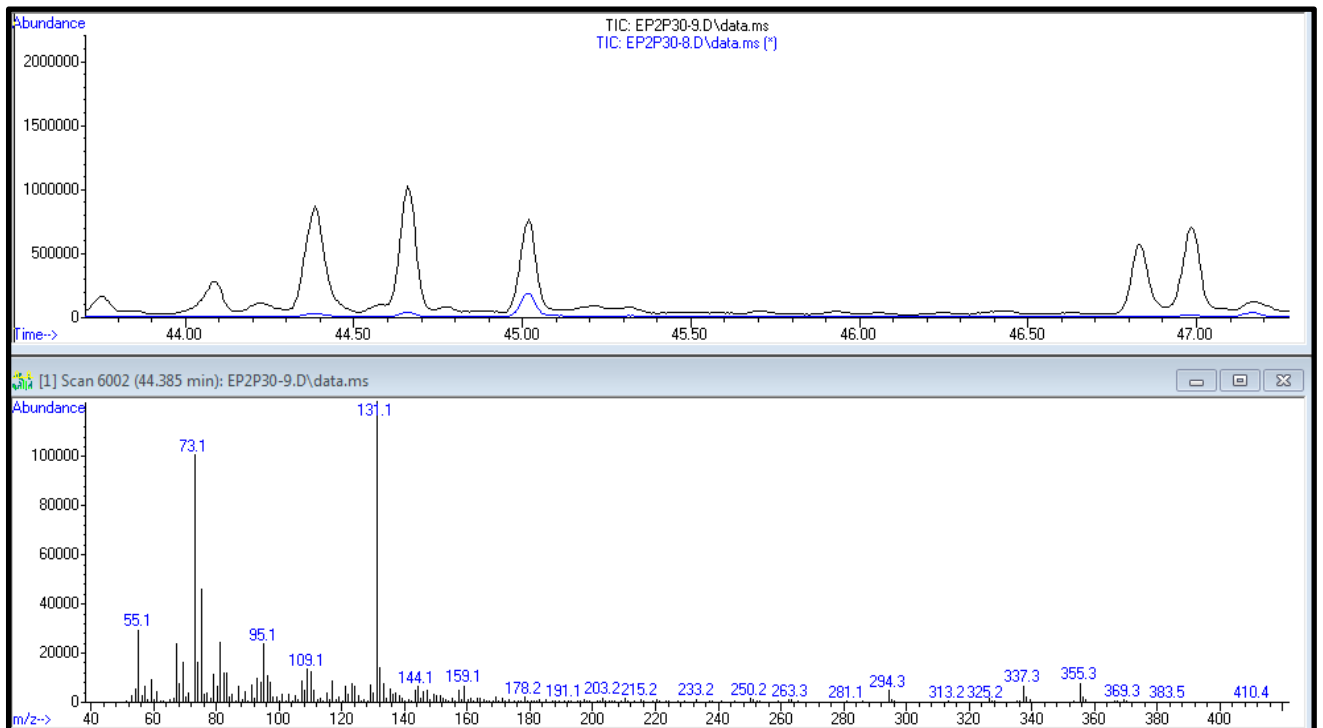
Le spectre de masse du métabolite dérivé obtenu dont le temps de rétention est de 31,55 min a montré l'ion à m / z (intensité relative %) des valeurs de 73 ((CH₃)₃Si +) (90%) 131 (100%), 337 M-47 (perte de CH₃O₂, 5%), 355 M-31 (6%), 369 M-15 (2%) et 384 M (1%). (**Figure 3.13 B**). Ce schéma de fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 16-hydroxyoléique (ω-2) (M = 384) (**Figure 3.14 B**).

Le spectre de masse du métabolite dérivé a montré l'ion à m / z (intensité relative %) des valeurs de 73 ((CH₃)₃Si +) (100%) 145 (95%), 337 M-47 (perte de CH₃O₂, 5%) 369 M-15 (perte de OCH₃ à partir d'ester de méthyle, 2%). (**Figure 3.13 C**). Ce schéma de fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 15-hydroxyoléique (ω-3) (M = 384) (**Figure 3.14 C**).

(A)



(B)



(C)

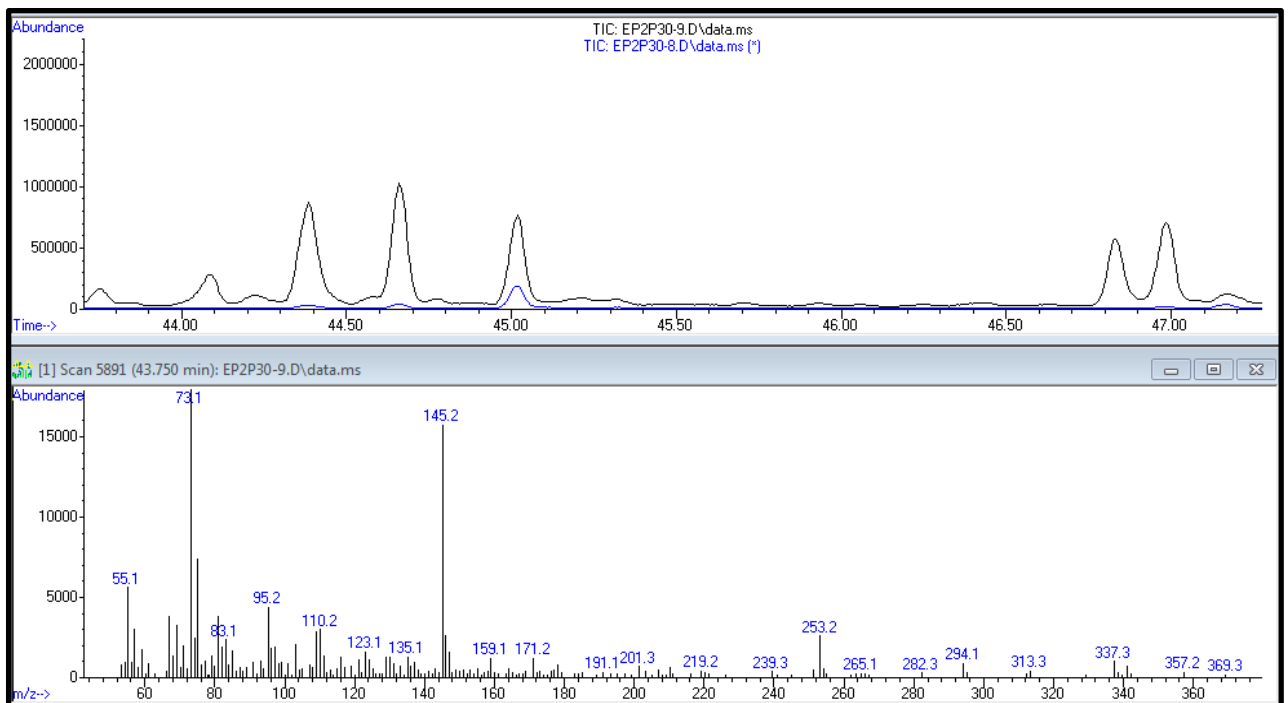
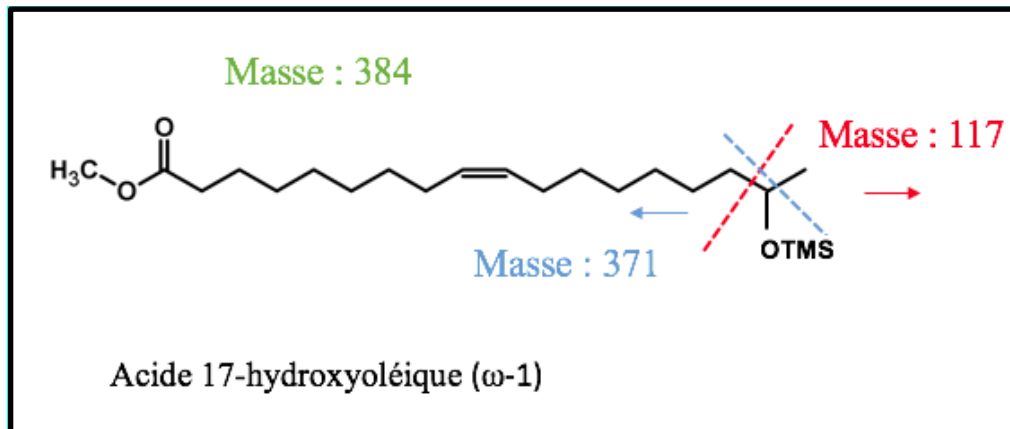
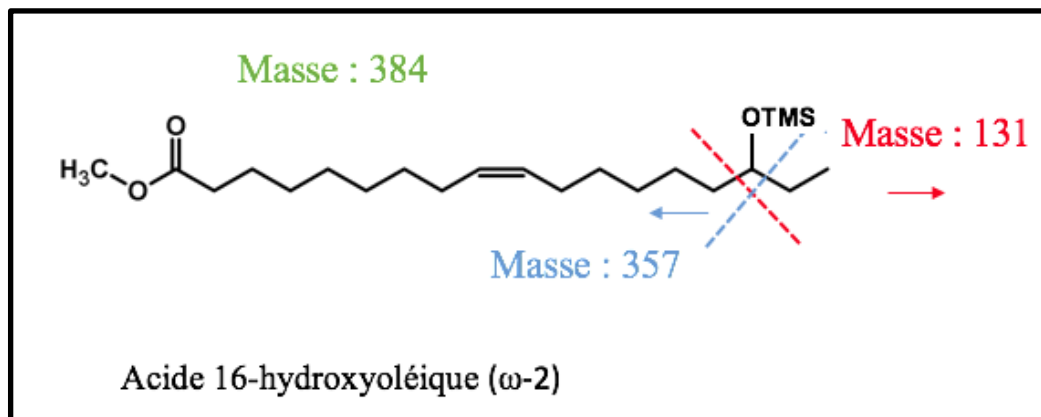


Figure 3.13 : Analyse en GC-MS des métabolites formés lors de l'incubation de l'acide oléique avec CYP77B1 (Pic 3, 4 obtenus sur la figure 3.12). L'incubation a lieu en présence (courbe noire) et en absence (courbe bleue) de NADPH. (A) (B) (C)

(A)



(B)



(C)

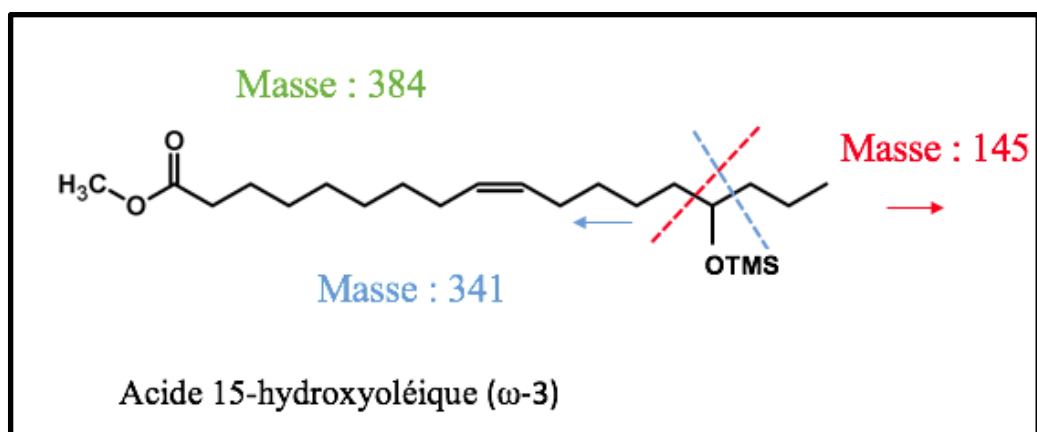


Figure 3.14 : Formules chimiques représentant (A) l'acide 17-hydroxyoléique, (B) l'acide 16-hydroxyoléique, (C) l'acide 15-hydroxyoléique dérivatisés avec leurs fragmentations en GC-MS

Ces expériences confirment que CYP77B1 est capable de métaboliser les acides gras comme le C18 :1. Mais nous n'avons pas pu montrer la formation de dérivé époxyde de ce C18 :1. D'expérience, nous savons au laboratoire qu'ils ne fragmentent pas très bien lors d'analyse en GC/MS ce qui pourrait expliquer que nous ne les ayons pas détectés. Comme nous le verrons au chapitre suivant, lors de mon travail de thèse, j'ai caractérisé une époxyde hydrolase chez *Arabidopsis thaliana*. Nous avons imaginé une stratégie basée sur l'utilisation de cette enzyme pour démontrer que CYP77B1 est capable d'époxyder certains acides gras.

Contrairement aux époxydes, les diols qui en dérivent donnent facilement des spectres de fragmentation caractéristiques. Comme les positions ω -1 et ω -2 du C18 :1 sont voisines de l'insaturation en position 12-13 du C18 :2, nous avons décidé d'incuber ce composé avec CYP77B1 dans un premier temps puis l'époxyde hydrolase dans un second temps afin de rechercher dans le milieu réactionnel la présence de diols dans l'incubation (Figure 3.15).

3.5.2 Epoxydation de l'acide linoléique (C18 :2) par CYP77B1

Après avoir incubé des microsomes de levures exprimant *CYP77B1*, nous avons ajouté du cytosol de levures exprimant *AtEHI* à l'incubation puis nous avons extrait les métabolites formés avant de les dérivatiser et de les analyser en GC-MS. Le spectre de masse du métabolite dérivé obtenu dont le temps de rétention est de 45,814 min a montré l'ion à m/z (intensité relative %) des valeurs de 73 (100%) ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$) et 75 (28%) ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+ = \text{O}$). Le spectre de masse a également montré l'ion d'une valeur de 173 (85%), 275 (67%) et 299 (60%) résultant du clivage entre deux hydroxyles portant un groupe triméthylsilyl (**Figure 3.17**). Cette fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 12,13-dihydroxyoctadec-9-énoïque ($M = 472$). Ceci permet donc de confirmer l'hypothèse que CYP77B1 est aussi capable de réaliser l'époxydation en position 12-13 du C18 :2.

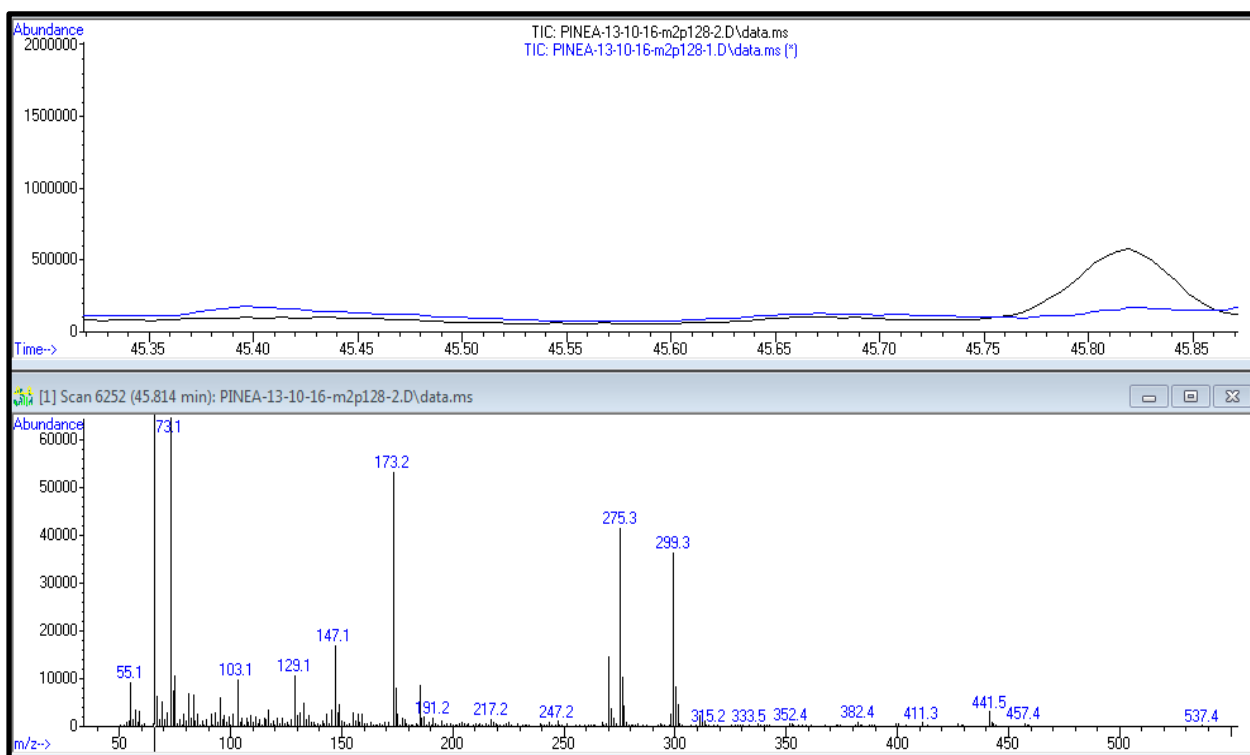


Figure 3.15: Analyse en GC-MS des métabolites formés lors de l'incubation de l'acide linoléique avec CYP77B1. L'incubation a lieu en présence (courbe noire) et en absence (courbe bleue) de NADPH. (A) (B) (C) Pic 3 à 6 obtenus sur la figure 3.12

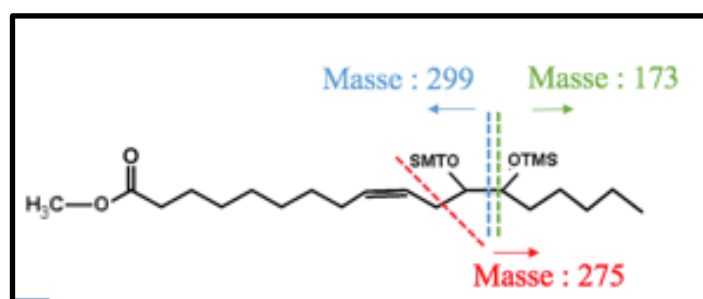


Figure 3.16 : Formule chimique représentant (A) l'acide 17-hydroxylinoléique (B) l'acide 16- hydroxylinoléique (C) l'acide 15- hydroxylinoléique dérivatisés avec leurs fragmentations en GC-MS

Afin de vérifier si le changement d'ancre ne modifie pas les capacités catalytiques d'une enzyme, j'ai modifié l'ancre d'un autre CYP450 caractérisé au laboratoire capable de métaboliser les acides gras insaturés: CYP77A4 (Sauveplane *et al.*, 2009). L'expérience de modification d'ancre a été réalisée de la même manière que pour CYP77B1. J'ai ensuite

incubé CYP77A4 avec du C18 :1 radiomarqué. Comme le montre la **Figure 3.17**, l'enzyme est toujours active et métabolise le C18 :1.

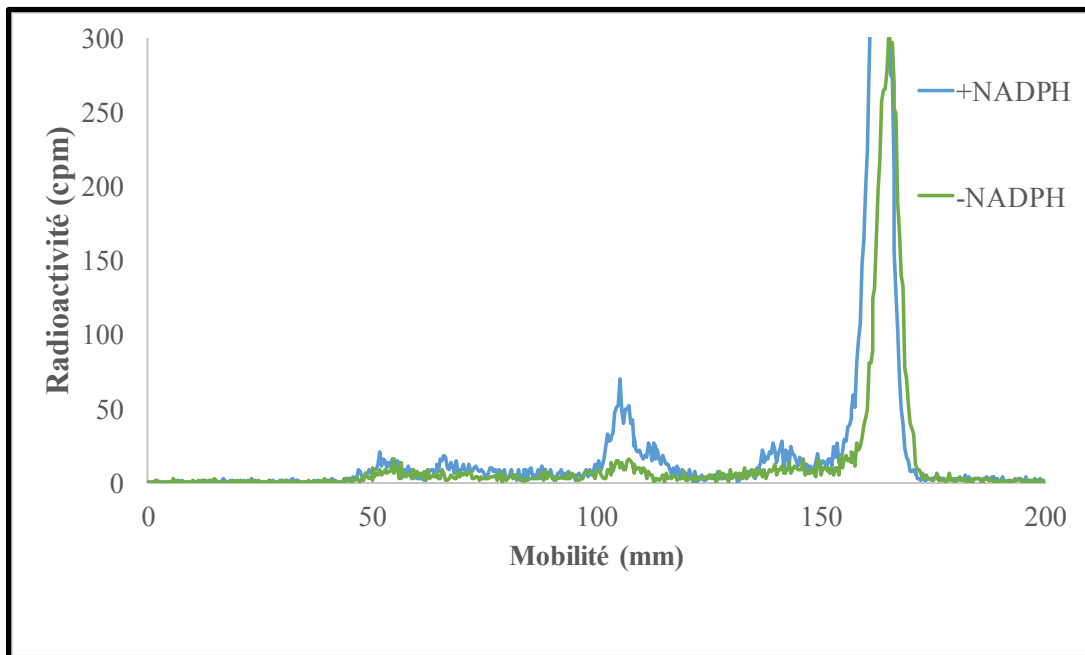


Figure 3.17 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de C18 :1 avec les microsomes exprimant CYP77A4 modifié avec NADPH (courbe bleue), sans NADPH (courbe verte). Les microsomes (0.4mg de protéines) sont incubés avec 100 μ M [1-¹⁴C] de substrat. Les incubations sont réalisées à 27°C pendant 10 min. Pic formé à 100mm caractéristique de l'activité de CYP77A4 (Sauveplane *et al.*, 2009)

Partie II : Etude de AtEH1

4.1 Etude *in silico* d'un gène candidat *AtEH1*

Afin d'identifier les EHs impliquées dans la synthèse de la cutine, nous avons utilisé des données accessibles du transcriptome pour analyser parmi les gènes co-exprimés avec les gènes d'enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras ou la synthèse de la cutine s'il y avait un ou des gènes codant pour une (ou des) époxyde(s) hydrolase(s) potentielle(s). Nous avons utilisé la plateforme CYPEDIA (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr> CYPedia; Ehlting *et al.*, 2008). Cette approche nous a permis de mettre en évidence un gène *At3g05600* (*AtEH1*) d'*Arabidopsis thaliana*, qui est co-exprimé avec le gène codant pour *CYP77A4*, une époxygénase caractérisée produisant les substrats potentiels d'une EH (Sauveplane *et al.*, 2009) et les gènes codant pour *CYP86A8* et *LACS9* qui sont impliquées dans la synthèse de cutine (Wellesen *et al.*, 2001) (**Tableau 8**).

Locus	r-value	Name	Description
<i>At5g04660</i>	1	CYP77A4	Cytochrome P450 family protein
<i>At2g45970</i>	0,750	CYP86A8	Encodes a member of the CYP86A subfamily of cytochrome p450 genes. Expressed at moderate levels in flowers, leaves, roots and stems. Fatty Acid Omega-Hydroxylase; transposon mutant (<i>lacerata</i>) characterized
<i>At2g43710</i>	0,747	SSI2	Stearoyl ACP desaturase
<i>At1g34430</i>	0,729		Similar to dihydrolipoamide S-acetyltransferase (<i>LTA2</i>) from <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>At5g35360</i>	0,726	CAC2	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit (<i>CAC2</i>)
<i>At5g16390</i>	0,721	CAC1	Subunit of the multi-enzyme complex plastidial acetyl-coenzyme A carboxylase. The <i>CAC1</i> gene codes for the biotin carboxyl-carrier subunit of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase.

<i>At2g05990</i>	0,715	MOD1	Encodes enoyl-ACP reductase a component of the fatty acid synthase complex. A reduced function mutation in this gene, mod1, was found in a screen for premature cell death mutants. Mutant plants have reduced lipid level and pleiotropic morphological defects
<i>At1g77590</i>	0,713	LACS9	Encodes major plastidic long chain acyl-CoA synthetase with a slight substrate preference of oleic acid over any of the other fatty acids.
<i>At3g25110</i>	0,704		acyl-(acyl carrier protein) thioesterase / acyl-ACP thioesterase / oleoyl-(acyl-carrier protein) hydrolase / S-acyl fatty acid synthase thioesterase
<i>At5g04530</i>	0,699		beta-ketoacyl-CoA synthase family protein, <i>KCSI</i> fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase 1
<i>At5g05270</i>	0,633		contains very low similarity to chalcone-flavonone isomerase (chalcone isomerase), from <i>Vitis vinifera</i>
<i>At1g24540</i>	0,628	CYP86C1	cytochrome P450 family protein
<i>At3g08770</i>	0,622	LTP6	lipid transfer protein 6
<i>At4g39510</i>	0,617	CYP96A12	cytochrome P450 family protein
<i>At3g05600</i>	0.608		Similar to epoxyde hydrolase

Tableau 8 : Gènes co-régulés avec le gène codant pour *CYP77A4* (issu de la base de données CYPEDIA)

L'analyse de la séquence protéique supporte l'hypothèse que AtEH1 soit bien une époxyde hydrolase. En effet, les acides aminés catalytiques conservés qui ont été identifiés chez plusieurs EHs caractérisées sont présents chez AtEH1 (**Figure 3.18**), en particulier l'acide aspartique en position 105 et l'histidine en position 303. Ceci correspond à l'acide aspartique 333 et l'histidine 523 de l'EH de souris (*Mus musculus*) qui sont impliqués dans le mécanisme catalytique (Pinot *et al.*, 1995). Il faut noter que AtEH1 n'a pas le domaine N-Terminal présent chez les EHs de mammifères, ce qui donne une protéine de taille plus petite, de 331aa ayant une masse de 37,2kDa équivalent à ce qui a été décrit chez d'autres EHs de plantes.

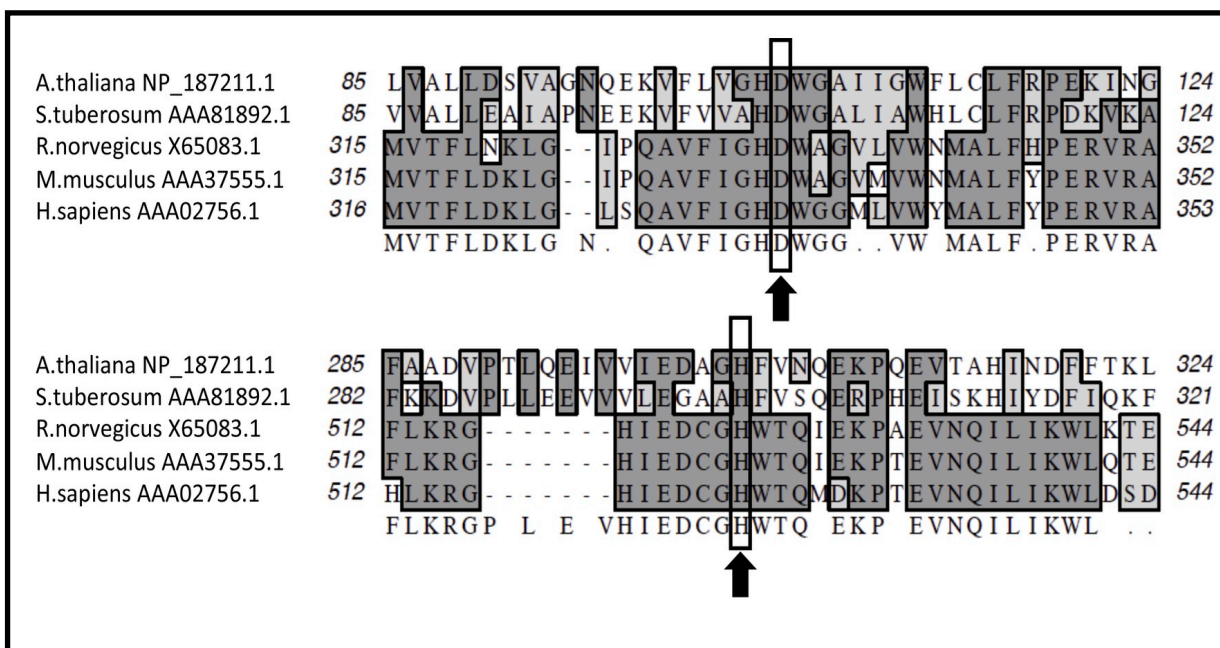


Figure 3.18 : Alignement des séquences protéiques d'époxydes hydrolases d'*Arabidopsis thaliana* et d'autres organismes par CLUSTALW.

Les numéros d'accèsion GenBank sont cités. On retrouve les acides aminés conservés encadrés

4.2 AtEH1 est une protéine soluble localisée dans le cytosol

Comme mentionné précédemment, les EHs de mammifères peuvent être soit cytosoliques soit membranaires (Morisseau, 2013). Beaucoup moins d'informations sont disponibles concernant les EHs de plantes mais les deux localisations ont également été

rapportées suite à des mesures d'activités enzymatiques faites avec différentes fractions subcellulaires (Blée et Schuber, 1992 ; Pinot *et al.*, 1997 ; Sauveplane *et al.*, 2009).

4.2.1 Expression transitoire de *AtEH1* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* et observation au microscope confocal

Afin de localiser l'expression de *AtEH1 in planta*, une stratégie d'expression transitoire (couplage de la protéine à la GFP), a été mise en œuvre dans *Nicotiana benthamiana*. Pour déterminer si AtEH1 est soluble ou liée à la membrane, des feuilles de *Nicotiana benthamiana* ont été transfectées avec la construction exprimant *AtEH1* fusionnée à la GFP sous le contrôle du promoteur 35S. Deux constructions ont été utilisées : GFP ajoutée en C-terminal et GFP ajoutée en N-Terminal. Comme présenté dans la **Figure 3.19**, les observations au microscope confocal montrent que AtEH1 se comporte comme une protéine cytosolique en comparaison avec le contrôle soluble utilisé qui est la mRFP (ligne a et b) et la GFP (EGFP, en ligne d). Elle n'est pas co-localisée avec le marqueur du RE (reticulum endoplasmique) qui est l'ancre de CYP51 fusionnée à la RFP (ligne d et e). Ces résultats sont équivalents quelle que soit la fusion de l'EGFP en N-ter ou C-ter (ligne a et b).

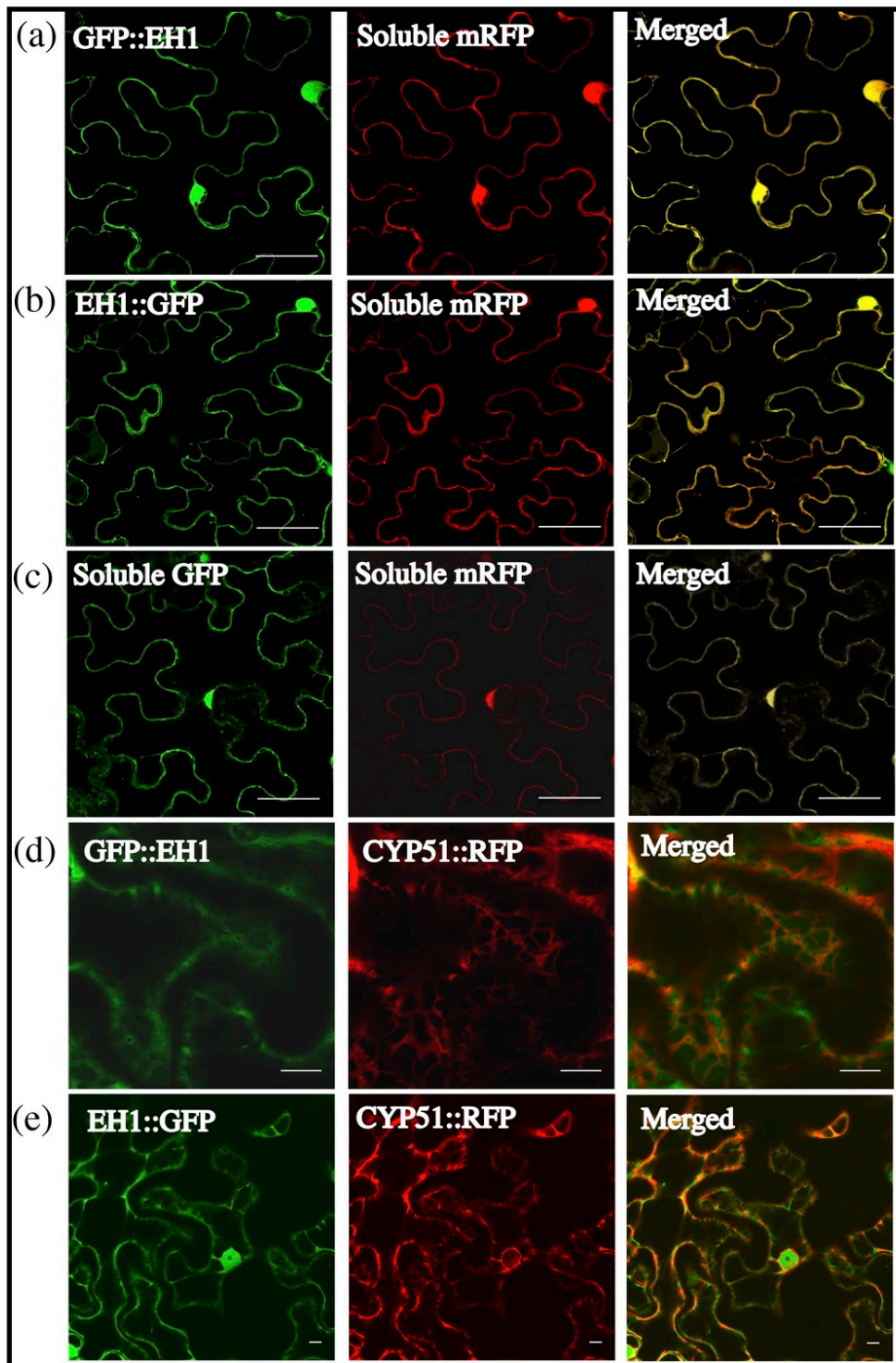


Figure 3.19 : Localisation subcellulaire de AtEH1 chez *Arabidopsis thaliana*.

Les images ont été prises 3-4 jours après l'agroinfiltration des feuilles de *Nicotiana benthamiana*. (a, d) AtEH1 fusionnée en N-terminal avec la GFP (GFP::EH1), (b, e) AtEH1 fusionnée en C-terminal avec la GFP (EH1::GFP), et (c) GFP seule. (a–c) des marqueurs du cytosol, (soluble red fluorescent protein (RFP)) ou (d, e) du reticulum endoplasmique (CYP51::RFP) ont été introduits. Echelle, 10 μ M

4.2.2 Etude de la localisation de AtEH1 par Western Blot

Ces résultats de localisation ont été confirmés par un Western Blot sur des extraits de *Nicotiana benthamiana*. J'ai déposé sur le gel les différentes fractions subcellulaires exprimant *AtEH1*. On retrouve *AtEH1* dans la fraction totale (« Input ») ainsi que dans le cytosol (**Figure 3.20**). Aucune bande n'est révélée avec l'anticorps dirigé contre la protéine tagée dans la fraction microsomale. Les mêmes résultats sont obtenus lorsqu'on utilise l'anticorps dirigé contre une protéine localisée dans le cytosol (UGPase). Ceci confirme les résultats obtenus avec la microscopie confocale, *AtEH1* est bien cytosolique.

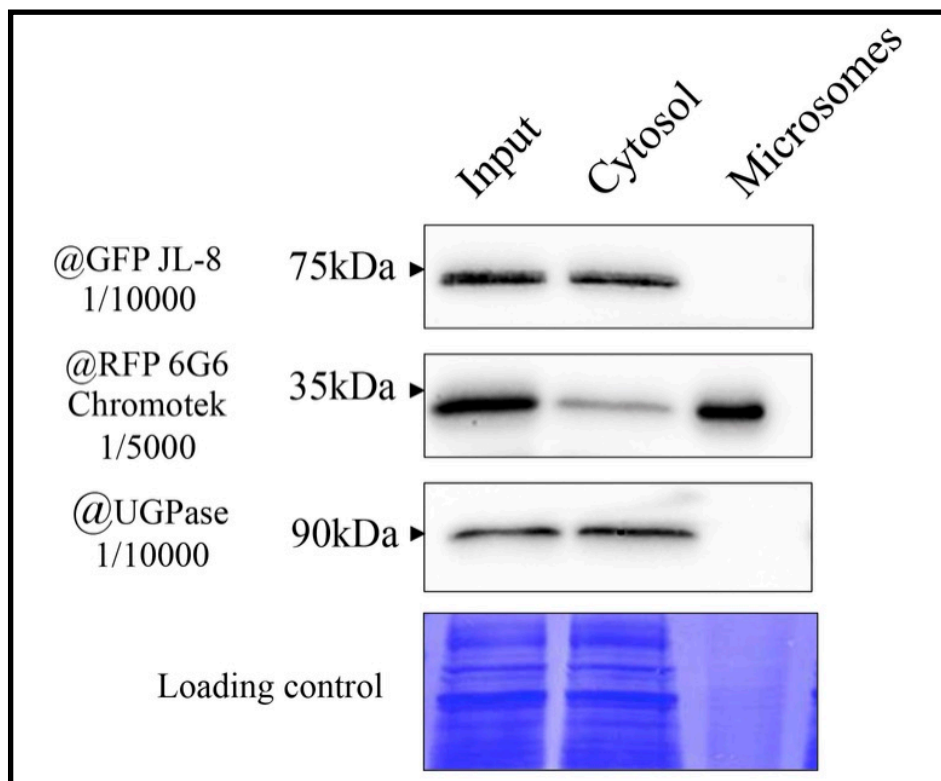


Figure 3.20 : Etude de la localisation subcellulaire de *AtEH1* d'*Arabidopsis thaliana* (*AtEH1*::GFP) par Western blot. Les protéines totales du cytosol et des microsomes correspondent à 25mg de poids frais de feuilles de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrées. Les protéines sont séparées sur un gel d'électrophorèse 10% de polyacrylamide (SDS-PAGE) et transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidene difluoride). Ligne 1, anti-GFP JL8; ligne 2, anti red fluorescent protein (RFP) 6G6; ligne 3, anti-UGPase (Uridine glucose pyrophosphorylase; cytosol marker). Une coloration au bleu de Coomassie du gel sert de contrôle de charge

4.3 Etude de l'activité enzymatique de AtEH1

Un fractionnement subcellulaire de culture de levure exprimant *AtEH1* a été réalisé. Comme la protéine est cytosolique, c'est la fraction cytosolique qui a été conservée pour réaliser les différentes études enzymatiques.

La fraction cytosolique de levure exprimant *AtEH1* a été incubée avec de l'acide 9,10-époxyatéarique radiomarqué et les produits de la réaction ont été séparés du substrat résiduel par une chromatographie sur couche mince (TLC) (**Figure 3.21**). Une fraction cytosolique de levure transformée avec un vecteur vide a été utilisée comme contrôle. Après 20 min de réaction, on observe un seul métabolite formé (**Figure 3.21a Pic 1**). Dans la réaction contrôle, aucun métabolite n'est produit (**Figure 3.21b**). Ces résultats montrent que la formation du métabolite observé (**Figure 3.21c Pic 1**) est bien due à l'activité de AtEH1.

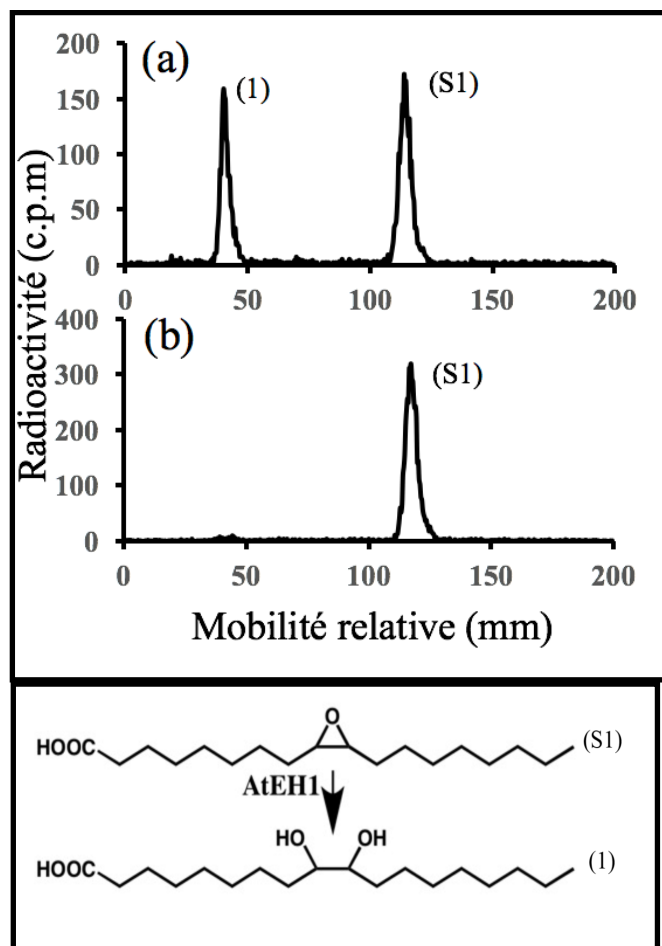


Figure 3.21 : Radiochromatographie sur couche mince (TLC) des métabolites formés après l'incubation de l'acide 9,10 époxyatéarique avec le cytosol de levures exprimant *AtEH1*

Les incubations sont réalisées à 27°C pendant 20 min avec le cytosol de levures exprimant *AtEH1* (a) ou le cytosol de levure transformées avec un vecteur vide (b). Les réactions ont été stoppées avec 20 µL d'acetonitrile contenant 0,2% d'acide acétique pendant 10 min. Pic (S1), acide 9,10-epoxystéarique ; pic (1), acide 9,10-dihydroxystéarique

Afin de déterminer l'identité du métabolite (1), celui-ci a été purifié, dérivé (**Figure 3.22**) et soumis à une analyse en spectrométrie de masse (GC-MS). On fait en parallèle une incubation sans substrat (**Figure 3.23a**) qui servira à montrer que le métabolite formé provient bien du substrat testé et non d'un composé endogène présent dans le cytosol de levure qui pourrait être métabolisé par *AtEH1*. On retrouve un métabolite formé seulement dans l'incubation avec le substrat (**Figure 3.23b**) à un temps de rétention de 45,779min.

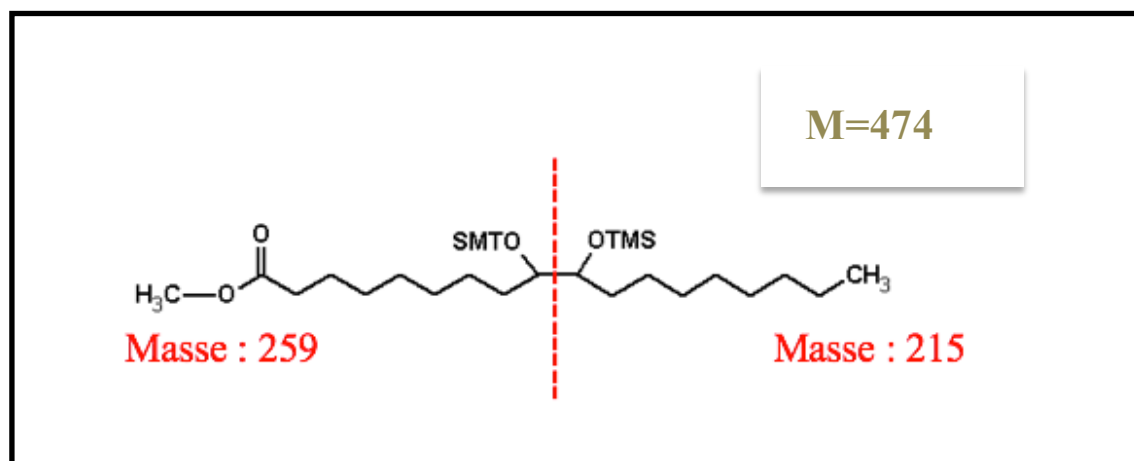


Figure 3.22 : Fragments obtenus lors de la fragmentation en GC-MS du dérivé de l'acide 9,10-dihydroxystéarique

Le spectre de masse du métabolite dérivé (**Figure 3.23c**) a montré l'ion à m/z (intensité relative %) des valeurs de 73 (100%) ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$), 75 (24%) ($(\text{CH}_3)_3\text{Si} + \text{O}$), 443 ($M-31$) (perte de OCH_3 à partir d'ester de méthyle), 259 (65%) et 215 (66%), résultant du clivage entre deux groupes hydroxyle portant les groupes triméthylsilyl générés après hydrolyse par l'enzyme (**Figure 3.22**). Ce schéma de fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 9,10-dihydroxystéarique ($M = 474$).

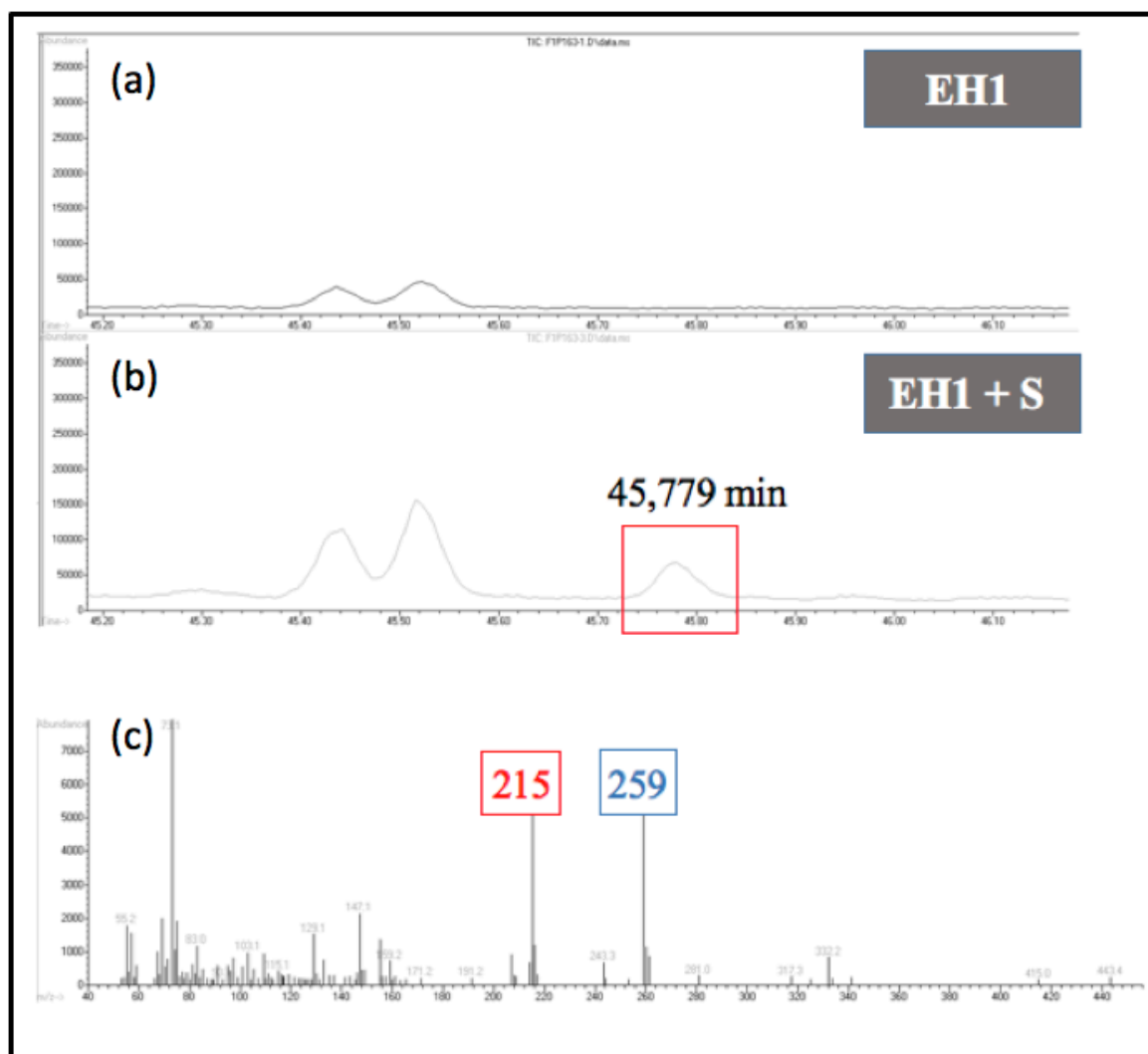


Figure 3.23 : TIC obtenu après l'injection des extraits des incubations de AtEH1 avec ou sans acide 9,10-époxystéarique et analyse en GC-MS (a) EH1 seule, (b) EH1 + substrat, (c) Fragmentation du pic retrouvé lors de l'incubation (b) à 45, 779 min.

Nous avons également montré que lorsque la fonction carboxyle de l'acide 9,10-époxystéarique est bloquée par un groupe méthyle, AtEH1 est incapable de catalyser la transformation de l'époxyde en diol correspondant. Des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont montré que CYP77A4 catalyse la formation *in vitro* de l'acide 12,13-époxyoctadec-9-énoïque. Nous avons donc entrepris une étude pour voir si ce composé est métabolisé par AtEH1. Comme montré dans la **Figure 3.24**, un métabolite majeur (Pic 2) a été formé après l'incubation de l'acide 12,13-époxyoctadec-9-énoïque (**Figure 3.24a**) qui est le produit de la réaction catalysée par CYP77A4 (Sauveplane *et al.*, 2009). Dans la réaction

contrôle avec le cytosol de levures transformé avec le vecteur vide (**Figure 3.24b**), aucun métabolite n'est formé. Nous avons ensuite vérifié par GC-MS que le produit de la réaction est bien le diol représenté dans la **Figure 3.24c**.

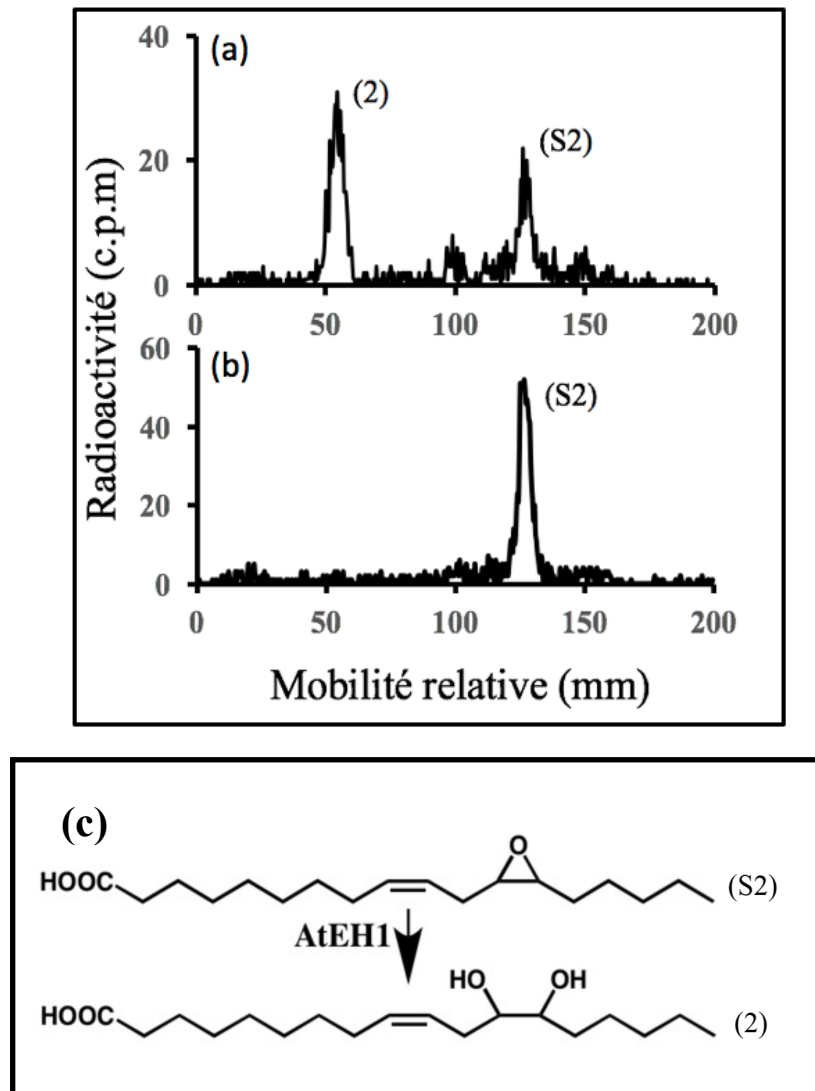


Figure 3.24 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de l'acide 12,13-époxyoctadec-9-énoïque avec le cytosol isolé à partir de levures exprimant *AtEH1*. Ces incubations sont réalisées à 27°C pendant 10 min avec le cytosol de levures exprimant *AtEH1* (a) ou le cytosol de levure transformées avec un vecteur vide (b). Les réactions ont été stoppées avec 20µL d'acetonitrile contenant 0,2% d'acide acétique pendant 10 min. Pic (S2), acide 12,13-époxyoctadec-9-énoïque ; pic (2), acide 12,13-dihydroxyoctadec-9-énoïque

Le métabolite du pic 2 (**Figure 3.24**) a été purifié, dérivé et analysé en GC-MS. Le spectre de masse du métabolite dérivé obtenu dont le temps de rétention est de 46,071 min a montré l'ion à m/z (intensité relative %) des valeurs de 73 (100%) ($((\text{CH}_3)_3\text{Si}^+)$) et 75 (28%) ($((\text{CH}_3)_3\text{Si}^+ = \text{O})$). Le spectre de masse a également montré l'ion d'une valeur de 173 (60%) et 299 (22%) résultant du clivage entre deux hydroxyles portant un groupe triméthylsilyl (**Figure 3.25**). Cette fragmentation est caractéristique du dérivé de l'acide 12,13-dihydroxyoctadec-9-énoïque ($M = 472$). Ceci permet donc de confirmer l'hypothèse que AtEH1 est aussi capable de réaliser l'hydrolyse de l'acide 12-13-époxyoctadec-9-énoïque.

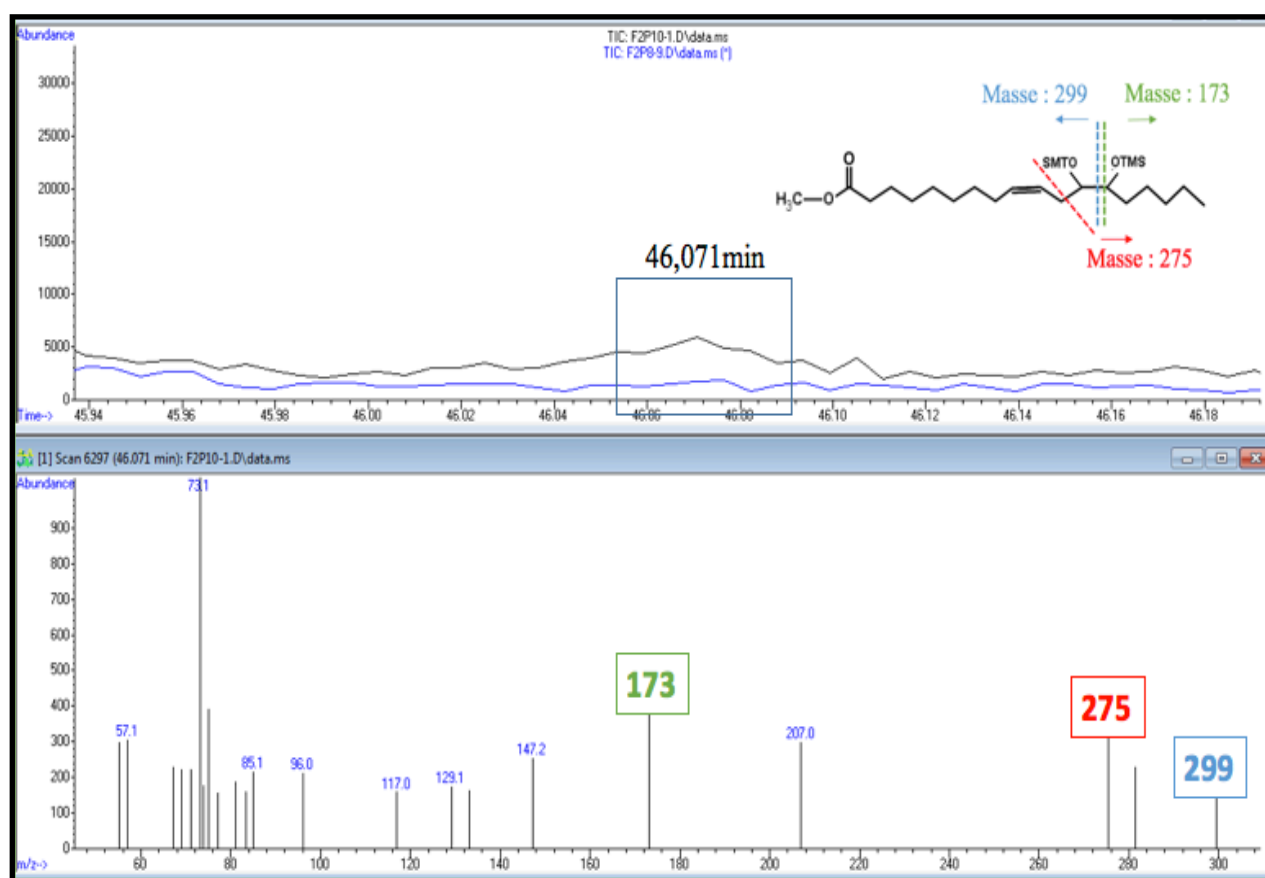


Figure 3.25 : TIC (Total ion current intensity) obtenu lors de l'analyse du milieu d'incubation de AtEH1 en présence (courbe noire) et en absence (courbe bleue) de l'acide 12,13-époxyoctadec-9-énoïque

Ces résultats montrent que AtEH1 est une EH qui peut hydrolyser aussi bien l'acide 9,10-époxyoctadec-9-énoïque que l'acide 12,13-époxyoctadec-9-énoïque.

Pour vérifier si l'absence d'activité au niveau des microsomes de levures transformées ne provenait pas d'un problème lors de l'extraction des microsomes, nous avons préparé en

parallèle des microsomes de levures exprimant CYP94C1 (**Figure 3.26**). Lorsque ceux ci sont incubés avec l'acide palmitique, comme attendu (Kandel *et al.*, 2006), un métabolite est formé (**Figure 3.26a pic 1**). Les microsomes sont donc actifs du point de vue enzymatique, ceci confirme les résultats obtenus avec les anticorps (**Figure 3.20**), AtEH1 n'est pas localisée au niveau du RE.

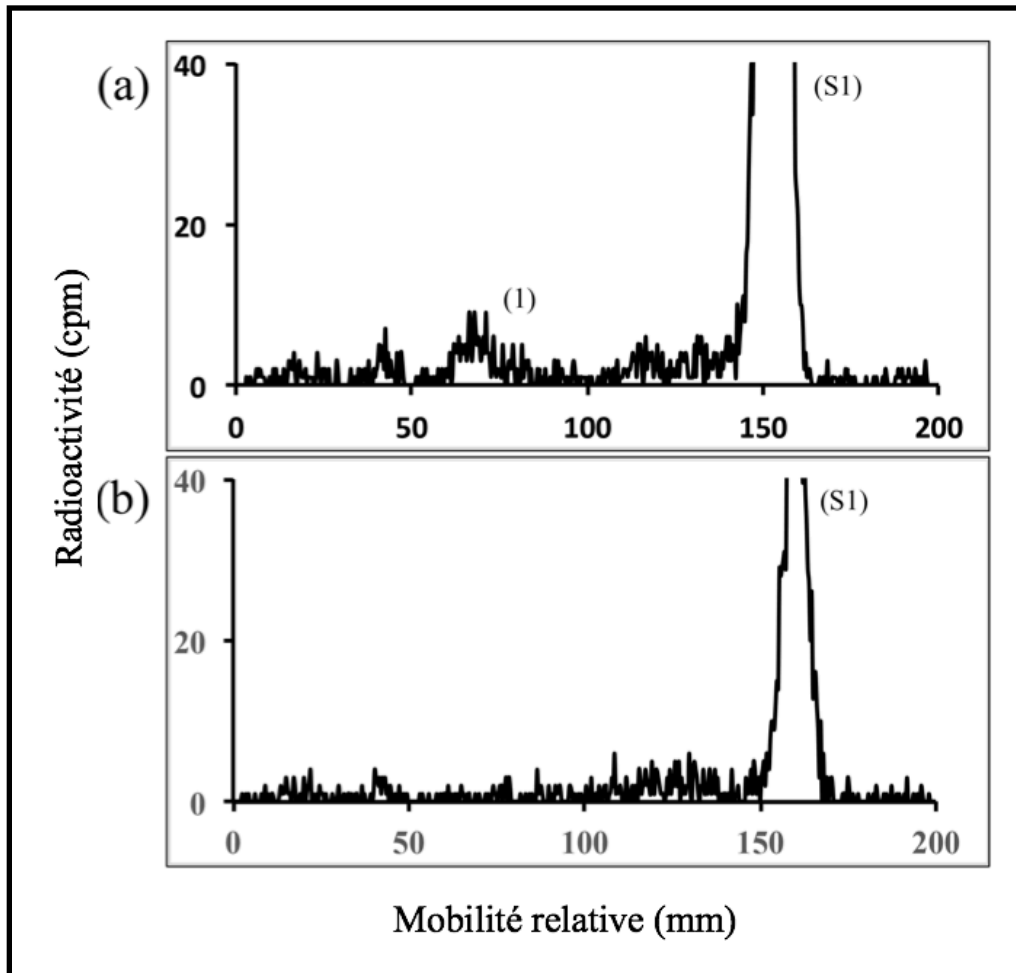


Figure 3.26 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de l'acide palmitique avec les microsomes de levure exprimant CYP94C1. Les microsomes (0.4mg de protéines) sont incubés avec 100µM [1-¹⁴C] d'acide palmitique. Les incubations sont réalisées à 27°C pendant 10 min en présence (a) ou en absence (b) de NADPH. Pic 1: acide 16-hydroxypalmitique ; Pic S: acide palmitique

4.4 AtEH1 est impliquée dans la synthèse de monomères de cutine

Afin d'étudier l'implication de AtEH1 dans la synthèse de la cutine, nous avons analysé deux lignées de mutants homozygotes pour une insertion T-DNA dans *AtEH1*

(Figure 3.27a). Dans les deux lignées mutantes *Ateh1-1* et *Ateh1-2*, aucun transcrit n'a été détecté par analyse en RT-qPCR (Figure 3.27b) ce qui confirme que ces mutants sont bien des mutants knock-out.

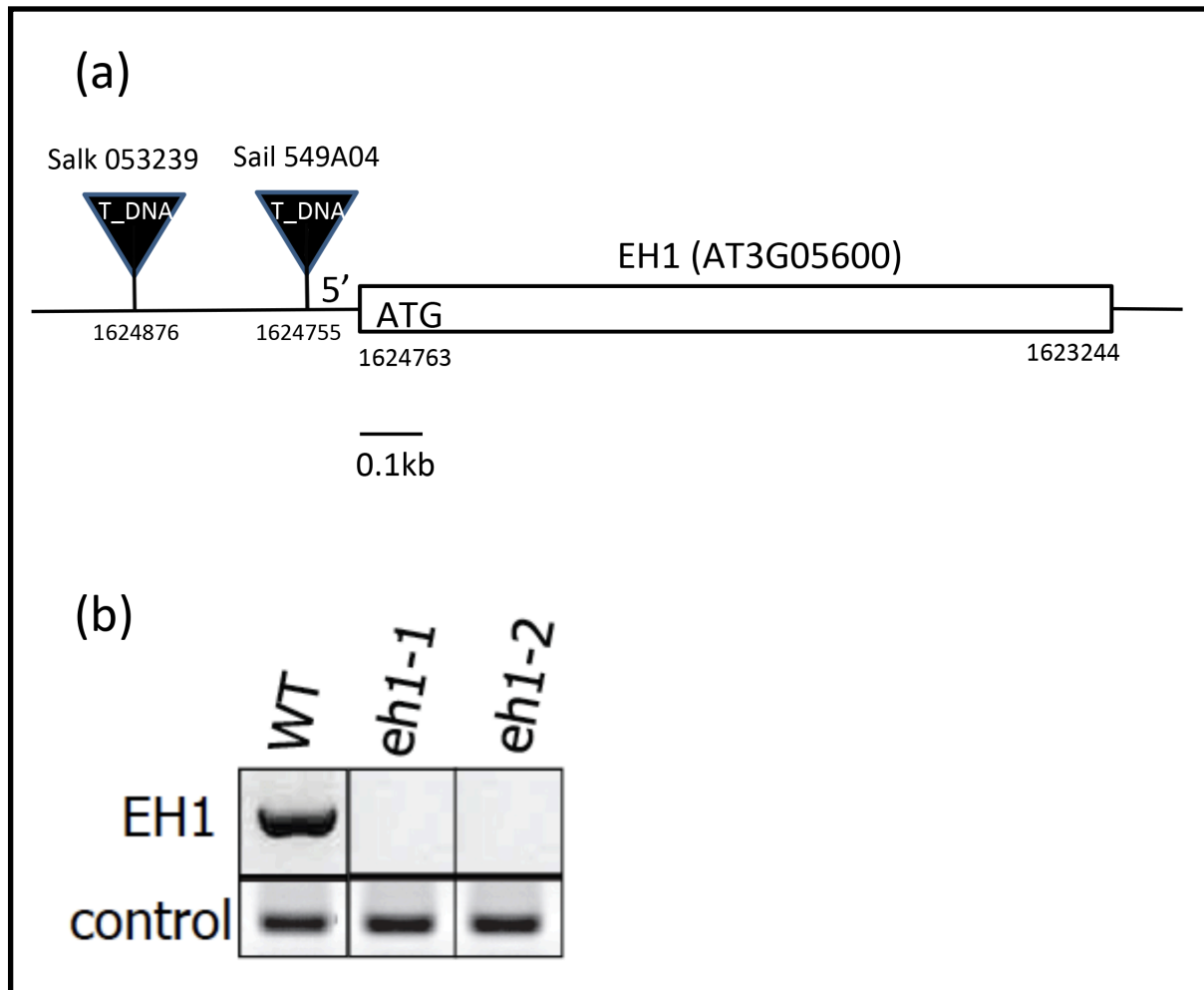


Figure 3.27 : Locus d'*AtEH1* et vérification des mutants. (a) Structure du gène *AtEH1* et sites d'intégration des T-DNA. (b) Analyse par RT-PCR de l'expression de *AtEH1* chez *Col0*, chez *Ateh1-1* et *Ateh1-2* ; Contrôle: *GAPC1* (*At3g04120*)

Le profil d'expression spatiotemporel de *AtEH1* a été étudié dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* par RT-qPCR et a montré une expression dans tous les organes (Figure 3.28) mais à des niveaux très faibles.

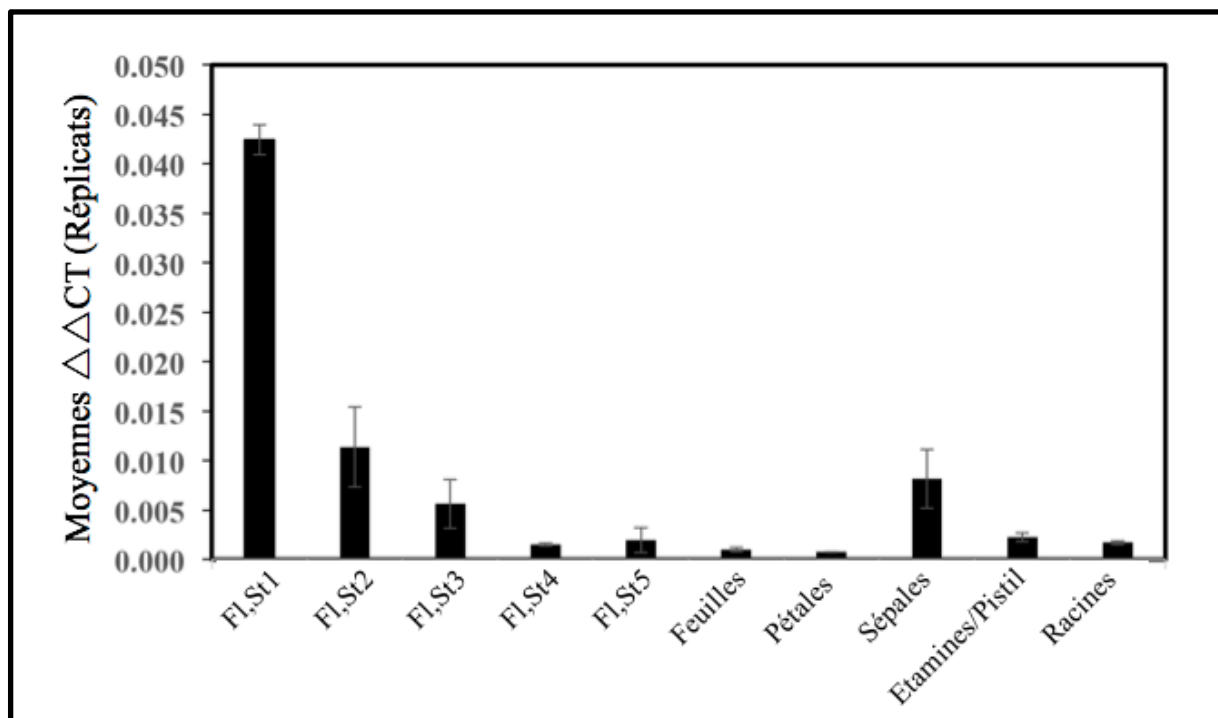


Figure 3.28 : Expression de *AtEH1* dans les organes d'*Arabidopsis thaliana*. L'expression de *AtEH1* a été étudiée par RT-qPCR et normalisée en utilisant les gènes de référence *EXP* (*At4g26410.1*) et *TIP41* (*At3g18780.2*)

Des données d'expression *in silico* (bar.utoronto.ca) montrent une expression plus importante de *AtEH1* dans les graines (enveloppe de la graine et embryon) et dans certaines parties de la fleur. Ces données sont retrouvées également sur Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008) (Figure 3.29).

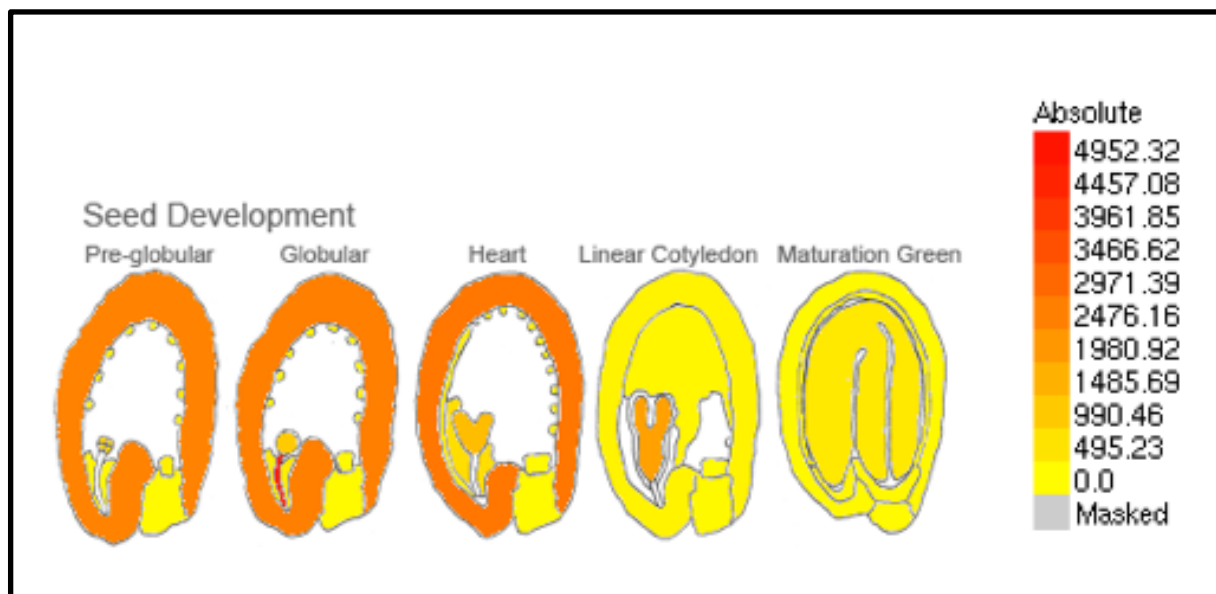


Figure 3.29 : Expression relative de *AtEH1* (*At5g05600*) dans les différents stades de développement de la graine chez *Arabidopsis thaliana* (d'après EFP Browser, données *in silico*)

C'est pourquoi, la composition du polymère de cutine de la graine de ces deux lignées mutantes a été analysée et comparée avec celle d'une lignée *Col0* par GC-MS. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un projet « Bioepoxy » en collaboration avec Frédéric Beisson (CEA, Cadarache). La GC-MS ne permettant de détecter que très faiblement les monomères d'acides gras époxydés, les analyses ont été réalisées avec une méthode plus sensible, la LC-MS/MS. La seule différence significative observée entre les lignées mutantes et le *Col0* est une réduction de 20% de l'acide 9,10,18-trihydroxy-octadec-12-énoïque (**Figure 3.30**) chez les mutants (**Figure 3.31 A**). Nous avons pu mesurer une très forte accumulation du dérivé époxydé d'un C18 :1 chez les mutants (**Figure 3.31 B**).

Afin de déterminer la position du groupement époxydé sur ce monomère qui s'accumule, des monomères d'acides gras époxydés ont été préparés à partir de cutine de *Col0* et de mutants puis digérés avec la cutinase de *Fusarium solani* et analysés par LC-MS/MS. Ceci permet d'obtenir le spectre de fragmentation précis de l'acide gras époxydé (**Figure 3.32**). En se basant sur les masses exactes, nous avons déterminé que le monomère qui s'accumule est l'acide 18-hydroxy-9,10-époxy-octadec-12-énoïque (**Figure 3.30 et 3.31 B**).

Au niveau des feuilles (**Figure 3.31 C**), l'analyse de la cutine par LC-MS/MS des mutants nous a permis de montrer que lorsqu'il n'y a plus *AtEH1* alors on observe la

disparition presque totale de l'acide 9,10,18-trihydroxy-octadec-12-énoïque. On mesure la disparition presque totale de l'acide 9,10,18-trihydroxy-octadec-12-énoïque dans la cutine et en parallèle une accumulation de l'acide 18-hydroxy-9-10-époxyoctadécénoïque chez les mutants. Les résultats obtenus lors de l'étude de ces mutants corroborent notre étude enzymatique *in vitro* qui nous a permis de montrer que AtEH1 présente une activité catalytique de type EH. Ces résultats confirment également notre hypothèse de travail : cette enzyme est bien impliquée dans la biosynthèse de cutine.

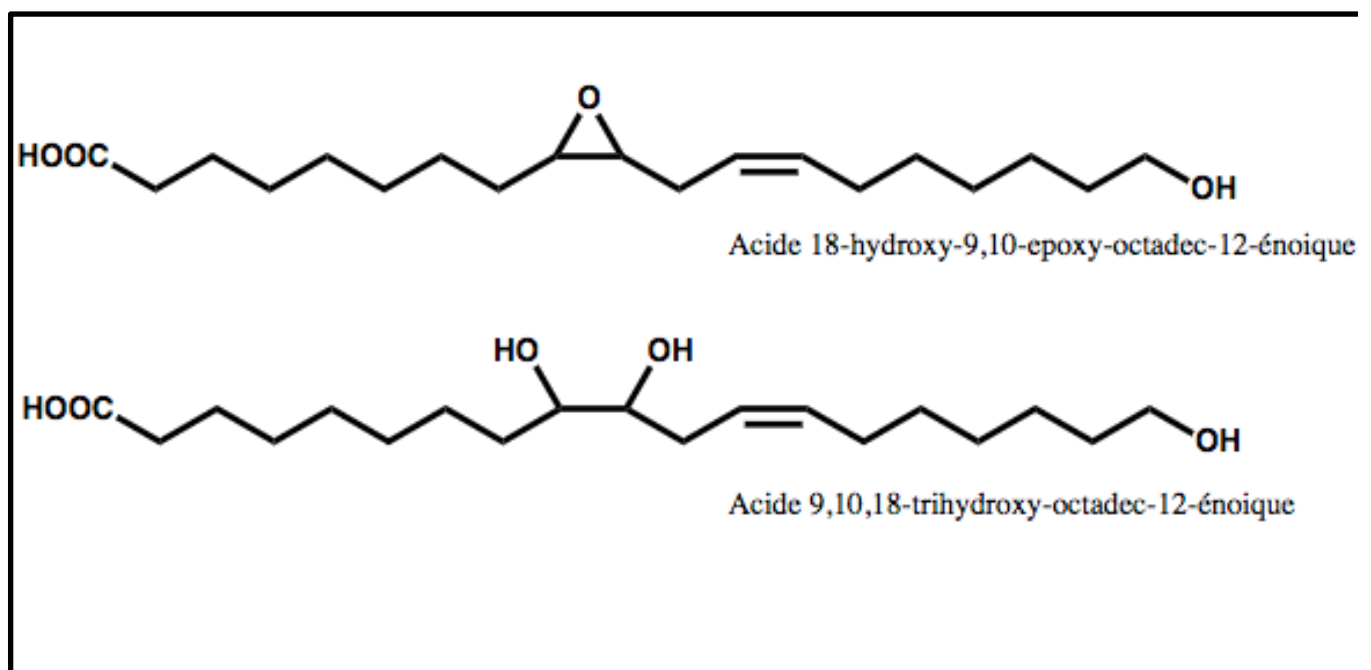
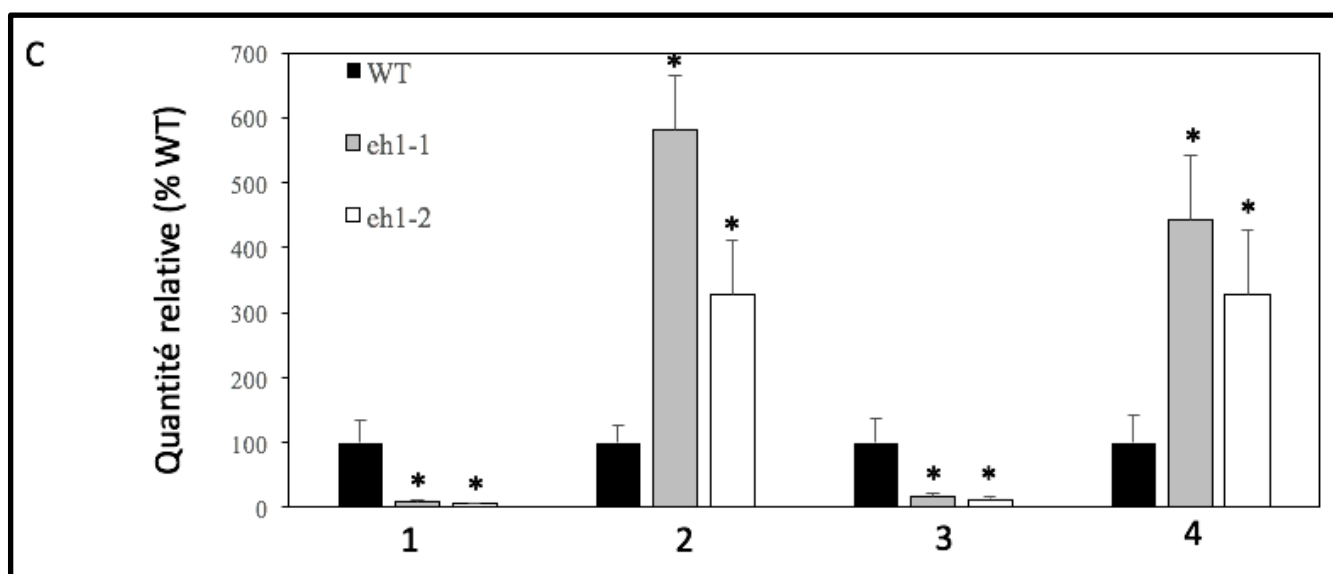
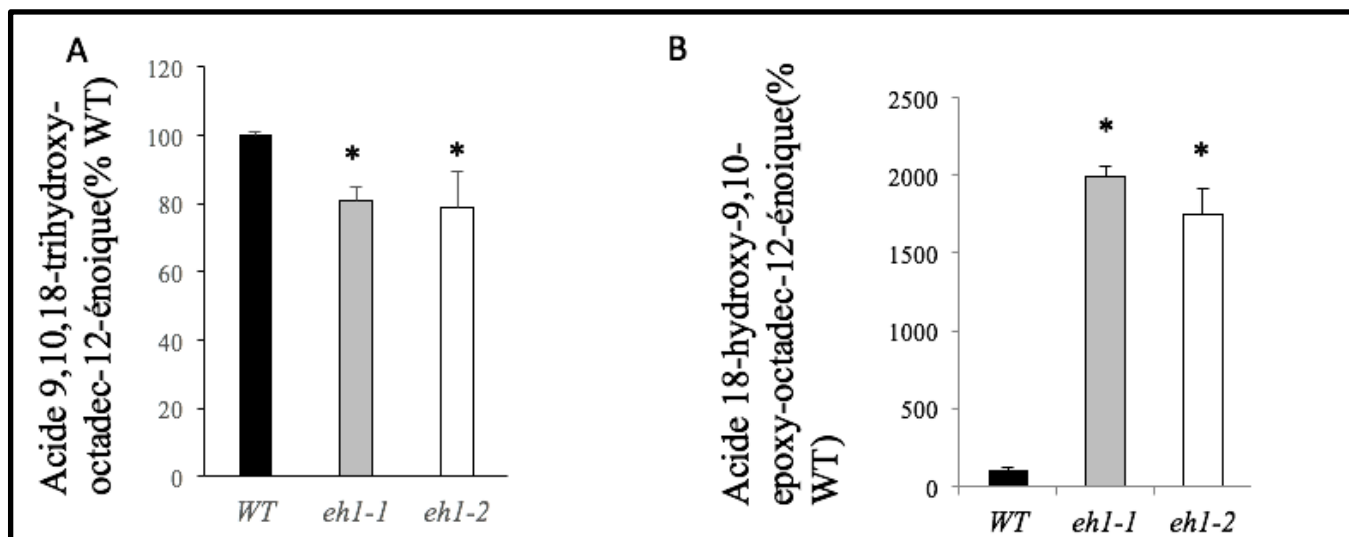


Figure 3.30 : Composés époxydé et poly-hydroxylé issus du C18 :2



- 1 Acide 9,10,18-trihydroxy-octadec-12-énoïque
- 2 Acide 18-hydroxy-9,10-octadec-12-énoïque
- 3 C18:2 9,10,18 trihydroxy
- 4 C18:2 18-hydroxy 9,10 epoxy

Figure 3.31 : Quantification relative de monomères de C18 époxydés et hydroxylés dans la cutine des graines et des feuilles de *Ateh1-1* et *Ateh1-2*. Quantité relative dans les graines de (a) Acide 9,10,18 trihydroxy-octadec-12 énoïque (b) son précurseur l'acide l'acide 18-hydroxy-9,10-époxy-octadec-12-énoïque. (c) quantité relative dans les feuilles de C18:1 et C18:2 9,10,18-trihydroxy et leurs précurseurs attendus (18-hydroxy-9,10-époxy). Les quantités de monomères ont été déterminées en comparaison avec des *Col0* en utilisant la LC-MS/MS. Les astérisques (*) indiquent des quantités statistiquement différentes des quantités mesurées chez *Col0*

Les quantités de monomères ont été déterminées en comparaison avec des *Col0* en utilisant la LC-MS/MS. Les astérisques (*) indiquent des quantités statistiquement différentes des quantités mesurées chez *Col0*

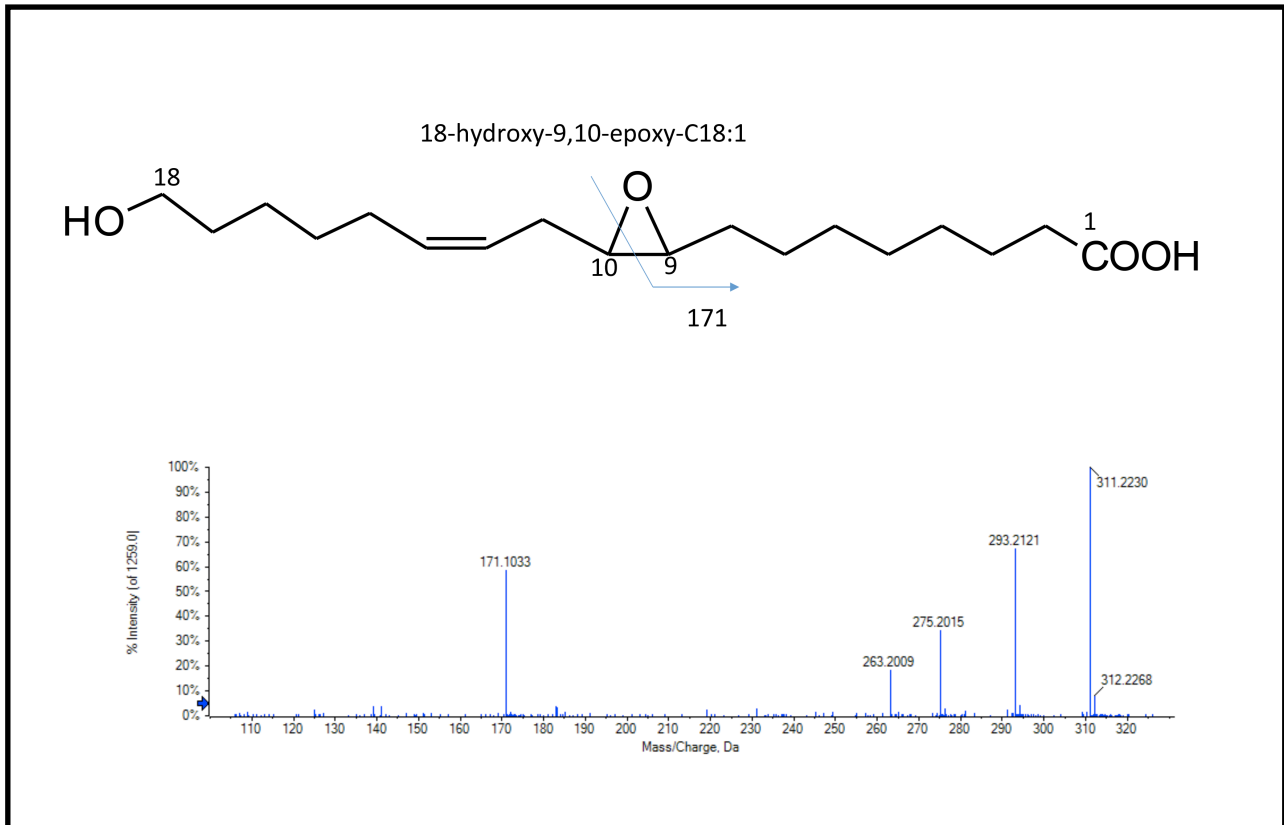


Figure 3.32 : Spectre MS/MS correspondant à l'acide 18-hydroxy-9,10-époxy-octadéc-12-énoïque. Ce composé a été obtenu après avoir enlevé l'enveloppe de la graine d'*Arabidopsis thaliana* qui a ensuite été digérée par la cutinase de *Fusarium solani*

4.5 L'activité de AtEH1 est dépendante de l'acide aspartique en position 105

L'analyse des séquences des différentes époxydes hydrolases de mammifères et de plantes a permis de montrer qu'il existait des acides aminés très conservés entre les espèces. De plus, les acides aminés catalytiques conservés qui ont été identifiés chez plusieurs EHs caractérisées sont présents chez AtEH1 (**Figure 3.16**), en particulier l'acide aspartique en position 105 et l'histidine en position 303 afin de confirmer le rôle dans la catalyse enzymatique.

J'ai utilisé la mutagenèse dirigée pour modifier différents acides aminés catalytiques très conservés chez les époxydes hydrolases notamment l'acide aspartique en position 105 et l'histidine en position 303.

Grâce à la mutation de l'acide aspartique en position 105, on peut observer une perte totale de l'activité enzymatique de AtEH1 (**Figure 3.33, AtEH1***). Ceci montre bien qu'un résidu acide joue un rôle majeur dans son activité catalytique, en effet il participe à la formation d'une liaison covalente au cours de la catalyse entre l'enzyme et le substrat (Pinot *et al.*, 1995)

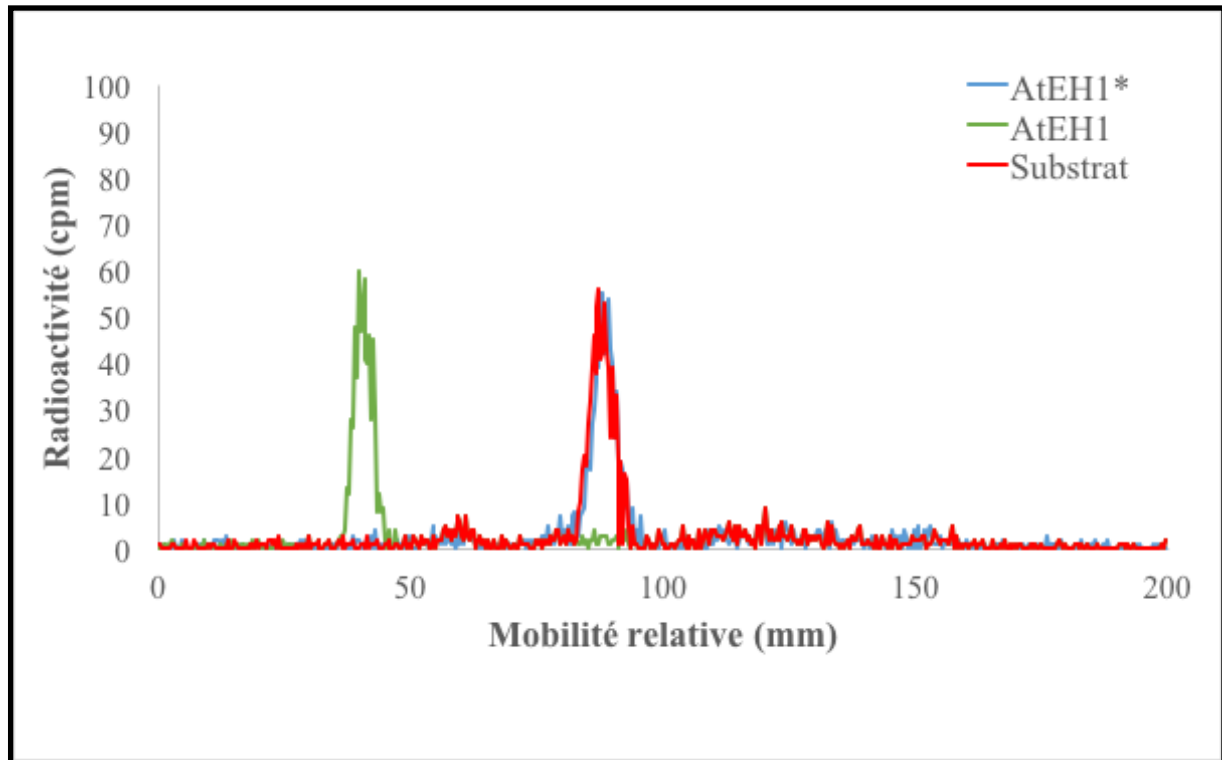


Figure 3.33 : Radiochromatographie sur couche mince des métabolites formés après l'incubation de l'acide 9,10-epoxystéarique avec les fractions solubles de levure exprimant *AtEH1* ou *AtEH1* mutée (*AtEH1**). 0.4mg de protéines sont incubés avec 100 μ M [1-¹⁴C] de substrat. Les incubations sont réalisées à 27°C pendant 10 min.

4.6 Etude de la perméabilité des mutants *Ateh1-1* et *Ateh1-2*

4.6.1 Rôle physiologique de AtEH1 dans la graine

Comme nous l'avons vu précédemment, AtEH1 est un acteur majeur dans la biosynthèse de la cutine au niveau des graines. Afin d'étudier le rôle physiologique de AtEH1 dans cette graine, la germination des graines de AtEH1 a été étudiée en différentes conditions

de stress. Plusieurs stress abiotiques ont été mimés, tels que le stress salin, le froid, ou encore le stress osmotique.

Seul le stress osmotique a eu un effet sur la germination des graines de *AtEH1*. En effet, les graines de *Ateh1-1* et *Ateh1-2* ont été semées sur un milieu MS en l'absence ou en présence de mannitol (500mM) (**Figure 3.34**). Sans mannitol, les graines de *Ateh1-1* et *Ateh1-2* et des *Col0* ont germé de manière identique (**Figure 3.34a**). Dans le cas du stress osmotique (ajout de mannitol dans le milieu), les graines de *Ateh1-1* et *Ateh1-2* ont une germination retardée par rapport aux graines de type sauvage. Après 2,5 jours sur milieu MS+mannitol 500mM seulement 50% des graines de *Ateh1-1* et *Ateh1-2* ont germé par rapport au *Col0*. Ce retard de germination n'est plus visible après 5,5 jours. (**Figure 3.34b**)

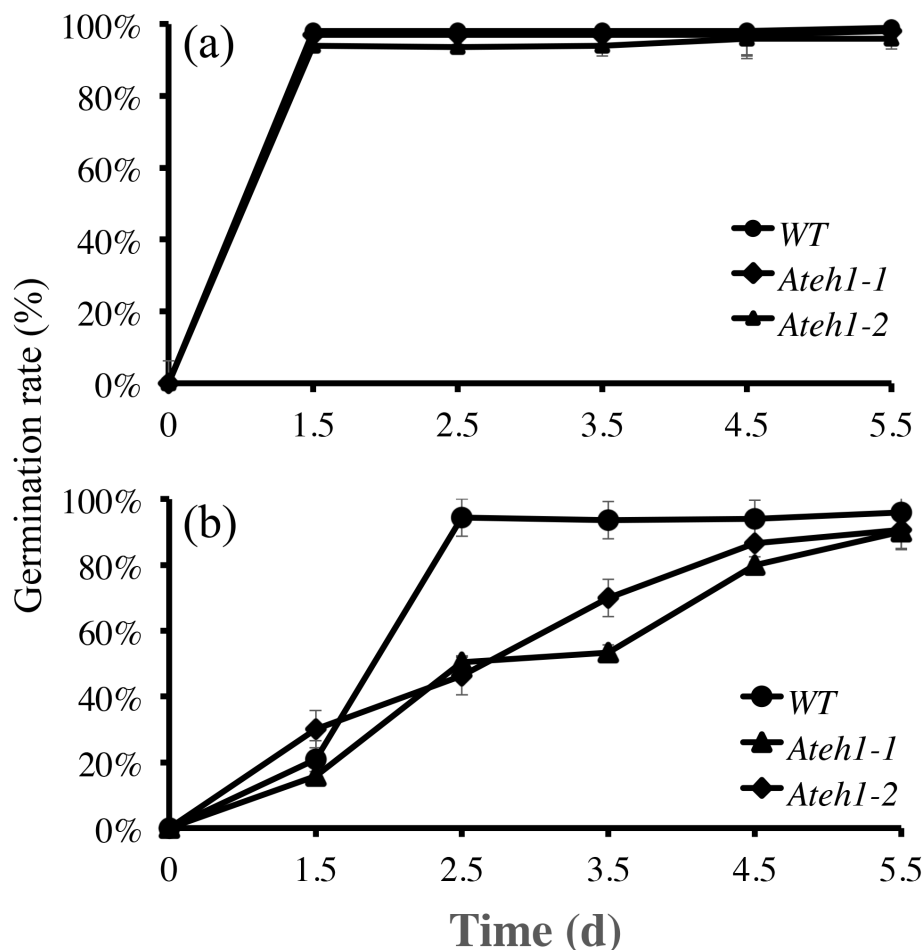


Figure 3.34 : Effet du stress osmotique sur la germination des graines. Les graines de *Col0* et des deux mutants *Ateh1-1* et *Ateh1-2* ont été semées sur milieu MS sans (a) ou avec (b) Mannitol 500mM. L'expérience a été réalisée plusieurs fois sur 100 graines à chaque expérience pour chaque génotype.

Pour aller plus loin dans cette étude des graines de *Ateh1-1* et *Ateh1-2*, la perméabilité de l'enveloppe de la graine a été testée en utilisant la coloration aux sels de Tetrazolium. Ce colorant pénètre plus facilement dans les graines des mutants *Ateh1-1* et *Ateh1-2* que dans les graines des *Col0*, ce qui montre une perméabilité de l'enveloppe de la graine altérée chez les mutants (**Figure 3.35**).

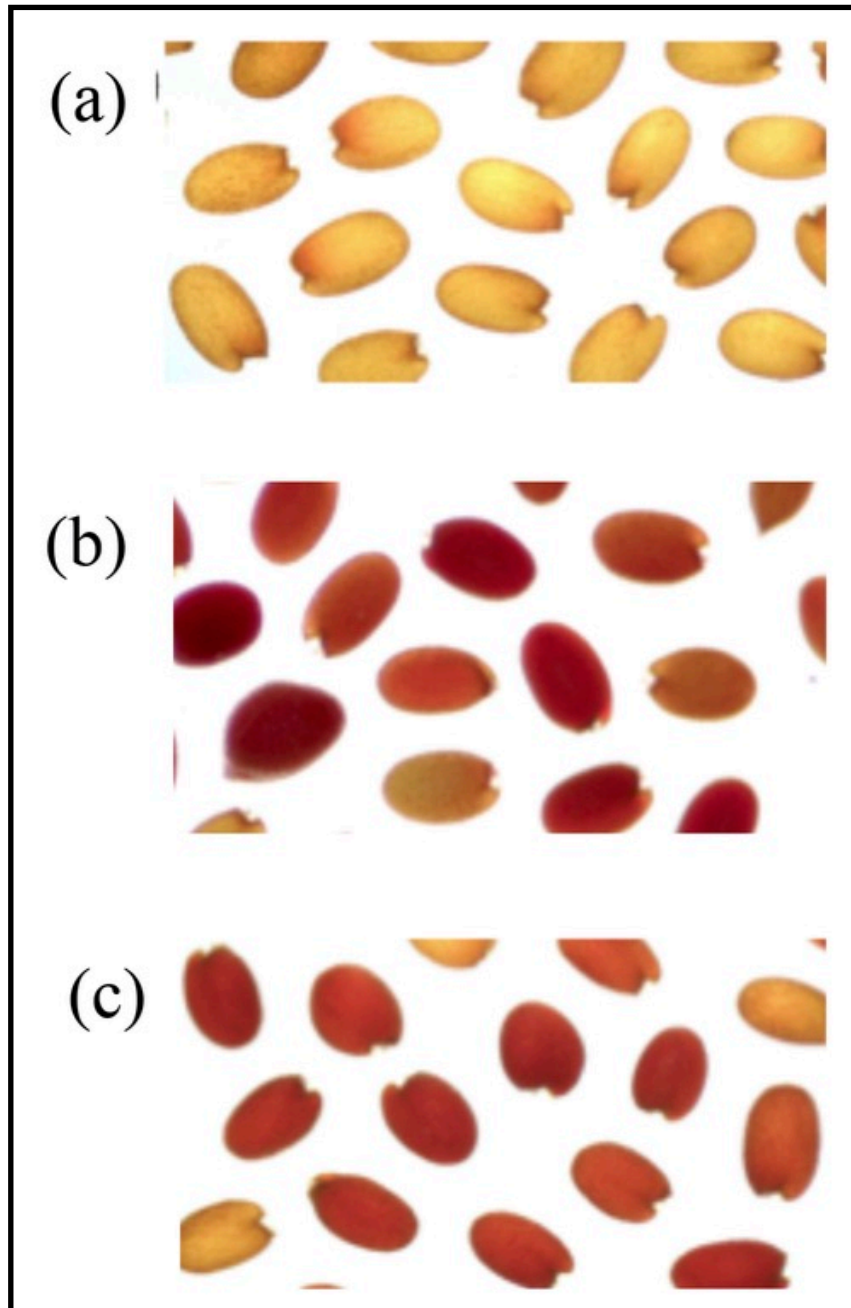


Figure 3.35 : Coloration aux sels de Tetrazolium (24h) de graines de *Col0* d'*Arabidopsis*

thaliana (a) et des mutants *Ateh1-1* (b) et *Ateh1-2* (c). Les incubations sont réalisées à température ambiante dans des tubes épendorf de 1,5mL.

4.6.2 Etude de la perméabilité des feuilles de *Ateh1-1* et *Ateh1-2*

Suite aux différents résultats obtenus avec les tests de perméabilité sur les graines, je me suis intéressée à l'impact de la mutation dans le gène *AtEH1* sur la perméabilité de la cuticule des feuilles où nous avons montré l'intervention de *AtEH1* dans la biosynthèse de la cutine. Pour cela, j'ai récolté des feuilles de rosette d'*Arabidopsis* de 36 jours et j'ai mesuré la perte en eau des feuilles au cours du temps. Comme le graphique de la **Figure 3.36** le montre, on peut voir que les feuilles de *Col0* au bout de 3 heures ont perdu près de la moitié de leur poids en eau. Aucune différence significative n'est observée pour les feuilles des deux mutants *Ateh1-1* et *Ateh1-2* par rapport aux feuilles de *Col0*.

Afin de confirmer ce résultat, j'ai réalisé des tests de coloration au bleu de toluidine sur les feuilles de rosette (Résultats non montrés). Les résultats sont cohérents avec ceux obtenus par le test de perte hydrique (**Figure 3.36**).

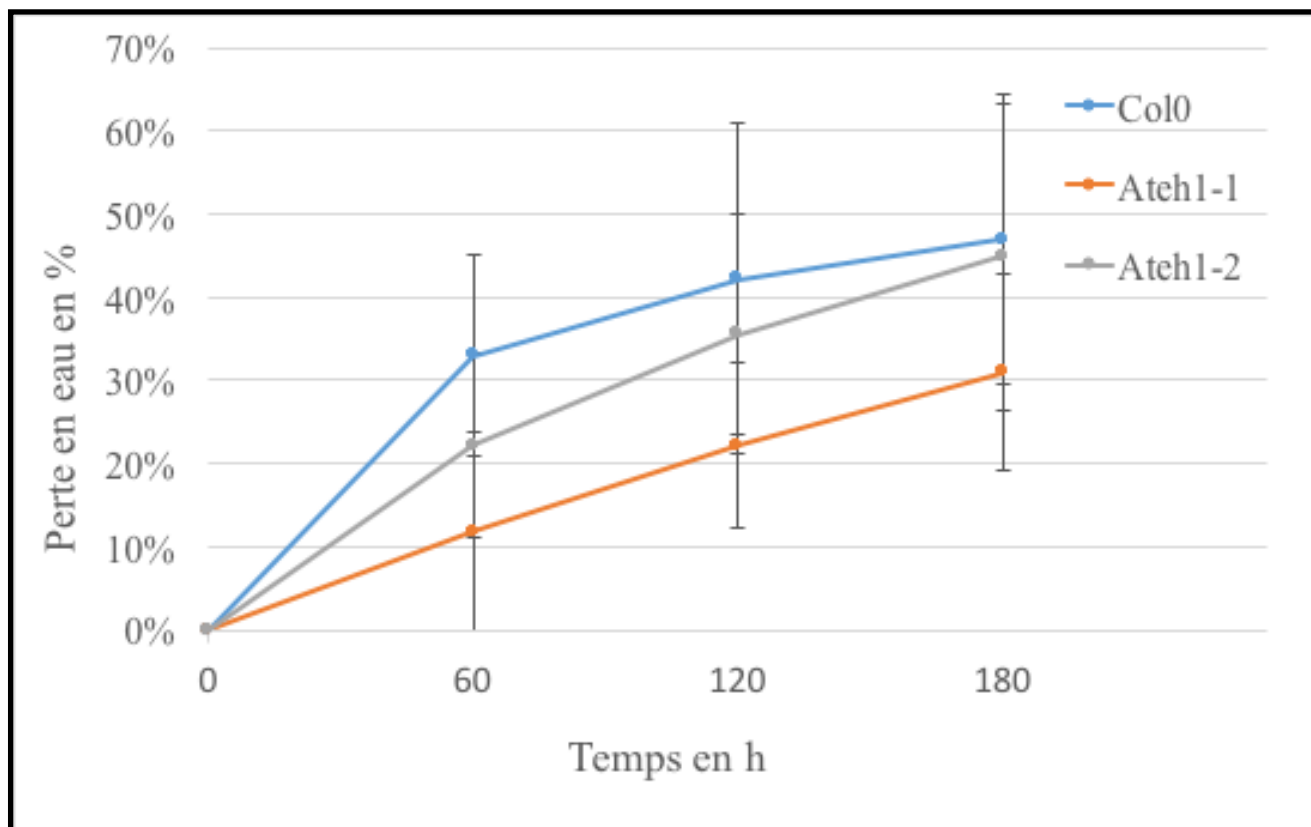


Figure 3.36 : Perte hydrique au cours du temps après coupure des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* chez *Col0* par rapport aux deux mutants *Ateh1-1* et *Ateh1-2*

4.7 Mise en évidence d'autres époxydes hydrolases chez *Arabidopsis thaliana*

Une étude phylogénétique nous a permis de montrer qu'il existe 6 autres époxydes hydrolases potentielles chez *Arabidopsis thaliana* (**Figure 3.37**).

4.7.1 Etude phylogénétique des EHs chez *Arabidopsis thaliana*

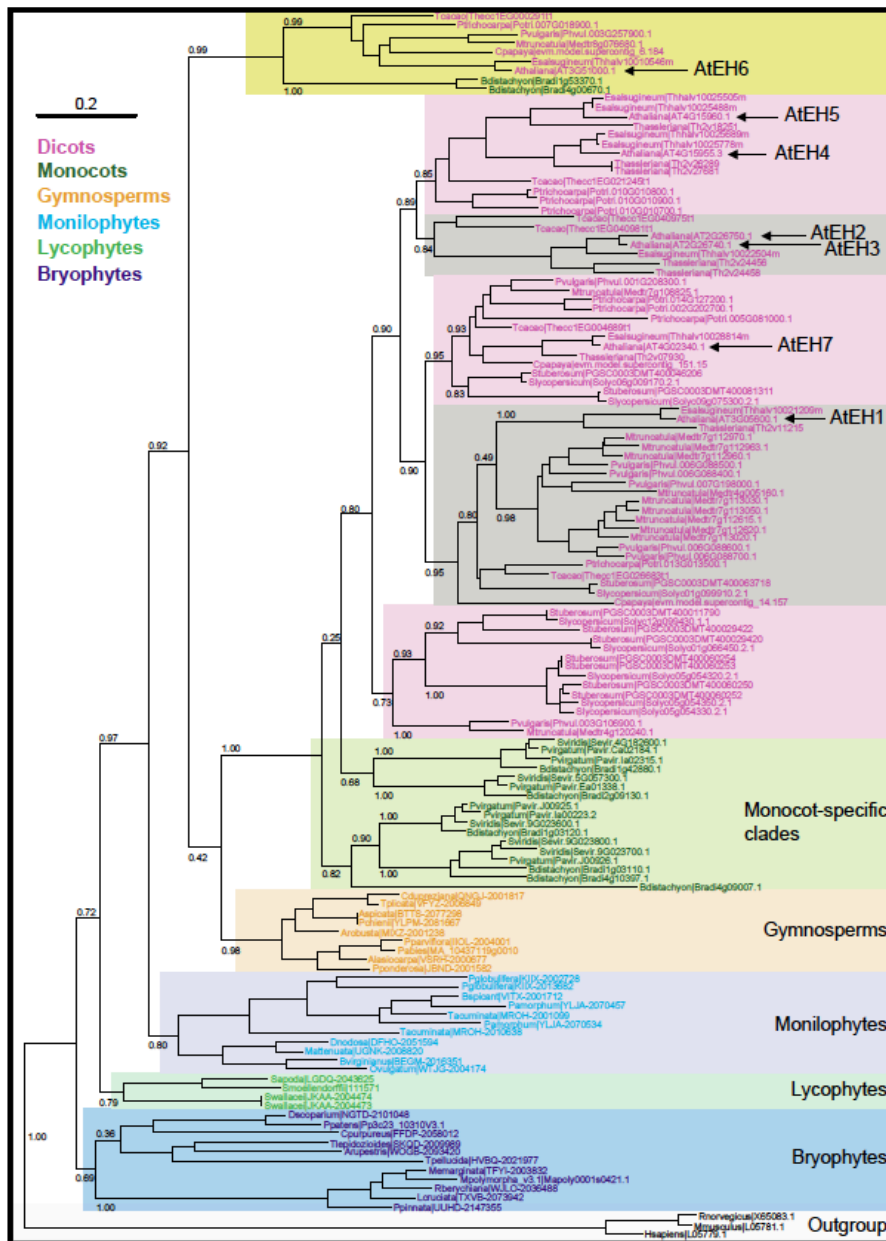


Figure 3.37 : Histoire évolutive de la famille des EHs. L'arbre a été réalisé en utilisant 132 séquences de 43 espèces. La souris, le rat et l'humain ont été utilisés comme groupe externe.

On peut voir d'après le **Tableau 9**, que les 7 EHs chez *Arabidopsis thaliana* sont de taille très similaires. *AtEH2* et *AtEH3* sont issues de duplication de séquences ce qui est le cas également pour *AtEH4* et *AtEH5*.

Nom	AGI locus	aa	MW (kDa)
<i>AtEH1</i>	<i>At3g05600</i>	331	37,2
<i>AtEH2</i>	<i>At2g26750</i>	320	36,3
<i>AtEH3</i>	<i>At2g26740</i>	321	36,4

<i>AtEH4</i>	<i>At4g15955</i>	304	34,8
<i>AtEH5</i>	<i>At4g15960</i>	375	43,1
<i>AtEH6</i>	<i>At3g51000</i>	323	36,7
<i>AtEH7</i>	<i>At4g02340</i>	324	36,7

Tableau 9 : Masses moléculaires et nombre d'acides aminés chez les différentes EHs d'*Arabidopsis thaliana*

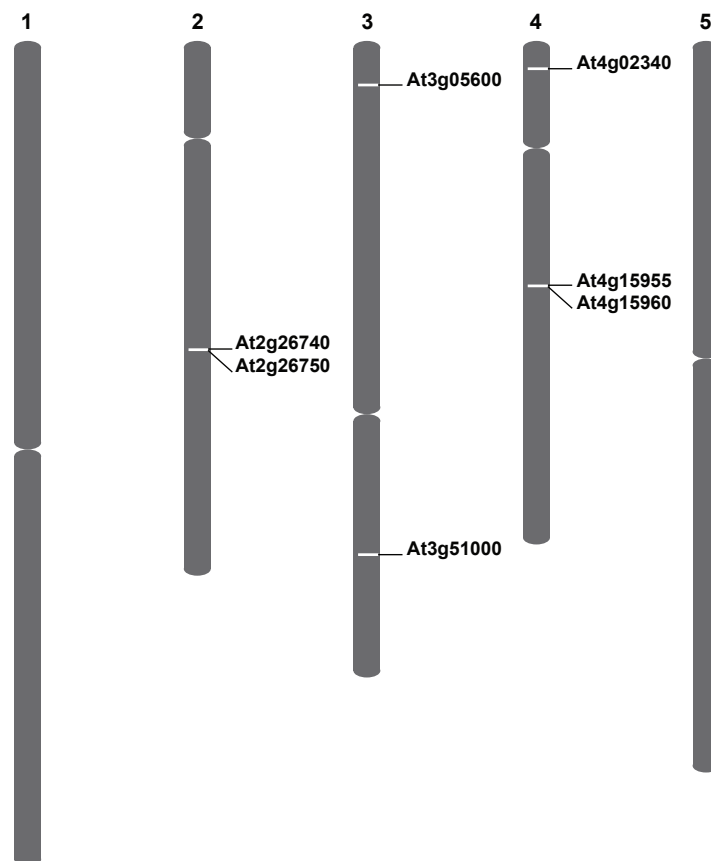


Figure 3.38 : Représentation de la position des 7 EHs sur les chromosomes chez *Arabidopsis thaliana*

L'alignement des séquences montre que *AtEH1* n'a que 25% d'homologie avec les autres EHs. En revanche les autres ont toutes entre 50 et 55% d'homologies entre elles (Tableau 10).

```

ClustalW multiple sequence alignment
7 Sequences Aligned           Processing time: 3.5 seconds
Gaps Inserted = 73           Conserved Identities = 97
Score = 0

Pairwise Alignment Mode: Slow
Pairwise Alignment Parameters:
  Open Gap Penalty = 15.0   Extend Gap Penalty = 6.7

Multiple Alignment Parameters:
  Open Gap Penalty = 15.0   Extend Gap Penalty = 6.7
  Delay Divergent = 30%    Transitions: Weighted

** Identity Scores (%) **
      At4g023  At4g159  At2g267  At3g510  At2g267  At4g159  EH
      40      55      40 EH      00CDS      50      60
At4g02340  100.0    51.4    56.8    53.8    56.9    50.1    25.5
At4g15955  51.4    100.0    53.2    46.4    52.5    53.2    24.4
At2g26740 EH 56.8    53.2    100.0    52.0    94.3    52.5    24.2
At3g51000CDS 53.8    46.4    52.0    100.0    51.6    43.9    27.3
At2g26750  56.9    52.5    94.3    51.6    100.0    51.8    24.3
At4g15960  50.1    53.2    52.5    43.9    51.8    100.0    20.5
EH         25.5    24.4    24.2    27.3    24.3    20.5    100.0
** Similarity Scores (%) **

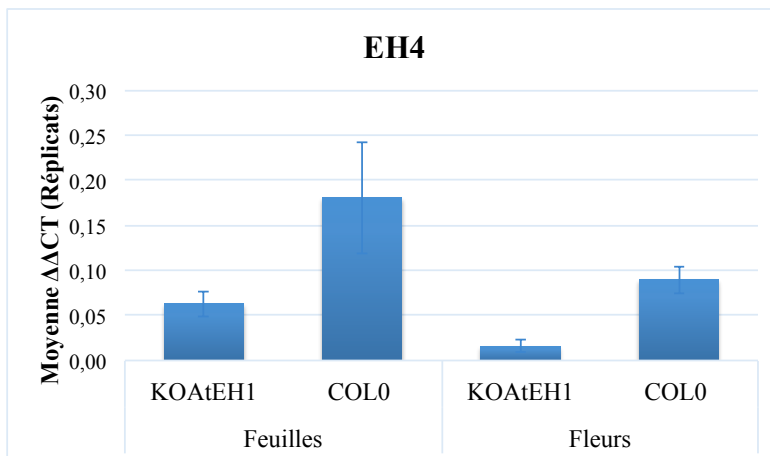
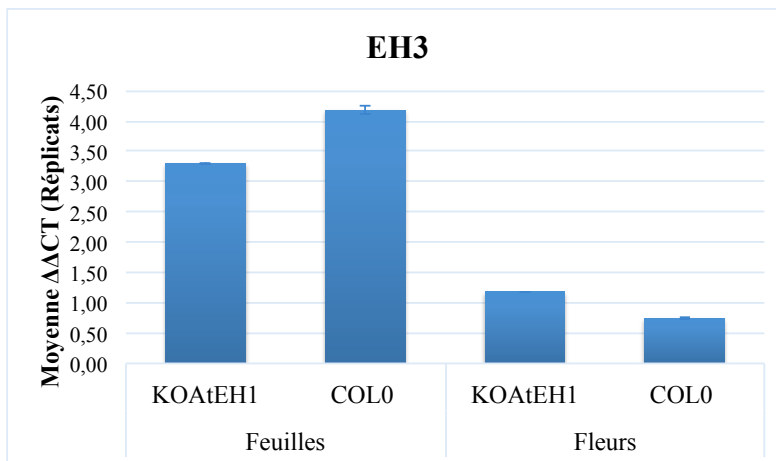
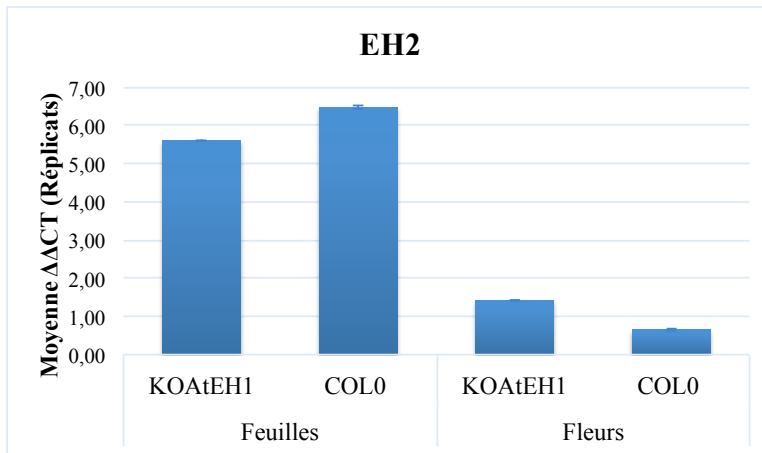
**Similarity Scores(s) are shown below the diagonal (x) with Identity Scores(I) above**

```

Tableau 10 : Identité de séquences entre les 7 EHs d'*Arabidopsis thaliana*

D'après les données d'eFPBrowser, *At2g26750* et *At2g26740* sont exprimés dans les sépales, *At4g15960* et *At4g15955* sont exprimés dans les fleurs et les feuilles, *At4g02340* est exprimé dans tous les organes de la plante. *AtEH1* est exprimé dans la graine comme *At3g51000*.

D'après des données de RT-qPCR, on peut observer que les autres EH chez *Arabidopsis thaliana* sont majoritairement plus exprimées dans les feuilles que dans fleurs (3 fois plus) (**Figure 3.39**) mais également on peut voir qu'il n'y a pas de surexpression d'une EH en particulier chez les mutants *Ateh1*. Ceci suggère qu'il n'y a pas de redondance d'activité entre *AtEH1* et les 6 autres EHs chez *Arabidopsis thaliana*.



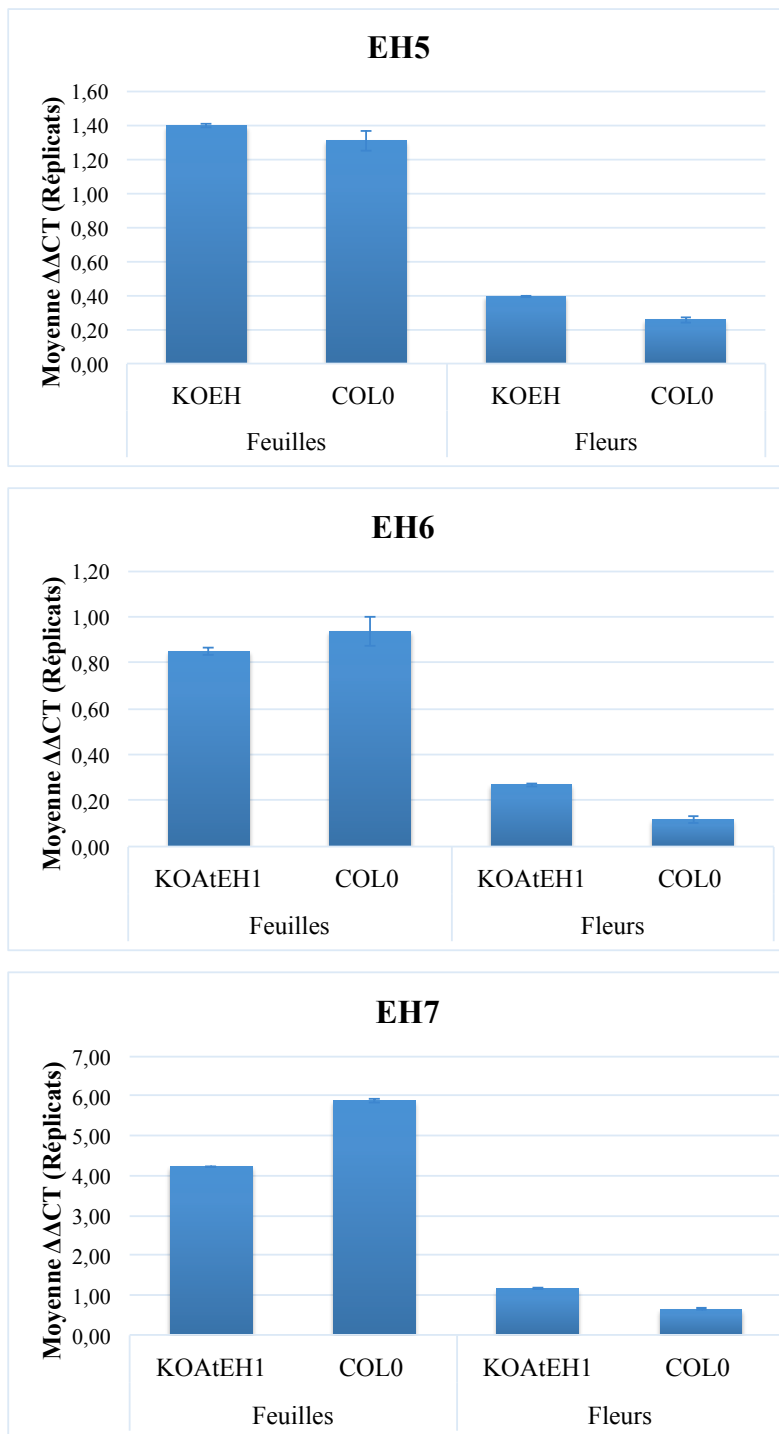


Figure 3.39 : Expression des 7 EHs dans les fleurs et les feuilles au stade 8 semaines de plantes *Col0* et *Ateh1*

4.7.2 Etude d'un stress biotique, l'infection de feuilles par *Botrytis cinerea* sur l'expression des EHs chez *Arabidopsis thaliana*

Des données de microarray suggèrent que les expressions de *At2g26750*, *At2g26740* et *At3g51000* sont fortement induites par des stress biotiques (comme l'infection par *Pseudomonas*) mais aussi des stress abiotiques comme le stress osmotique. Nous avons entrepris des expériences préliminaires en vue de tester cette hypothèse.

La mesure se fait sur des ARNs totaux de feuilles de *Col0* après 1 à 3 jours (T0 à T3) d'inoculation avec des spores de *Botrytis cinerea*.

On peut observer que l'expression des 7 EHs n'a pas été induite par le traitement avec *Botrytis cinerea* (**Figure 3.40**).

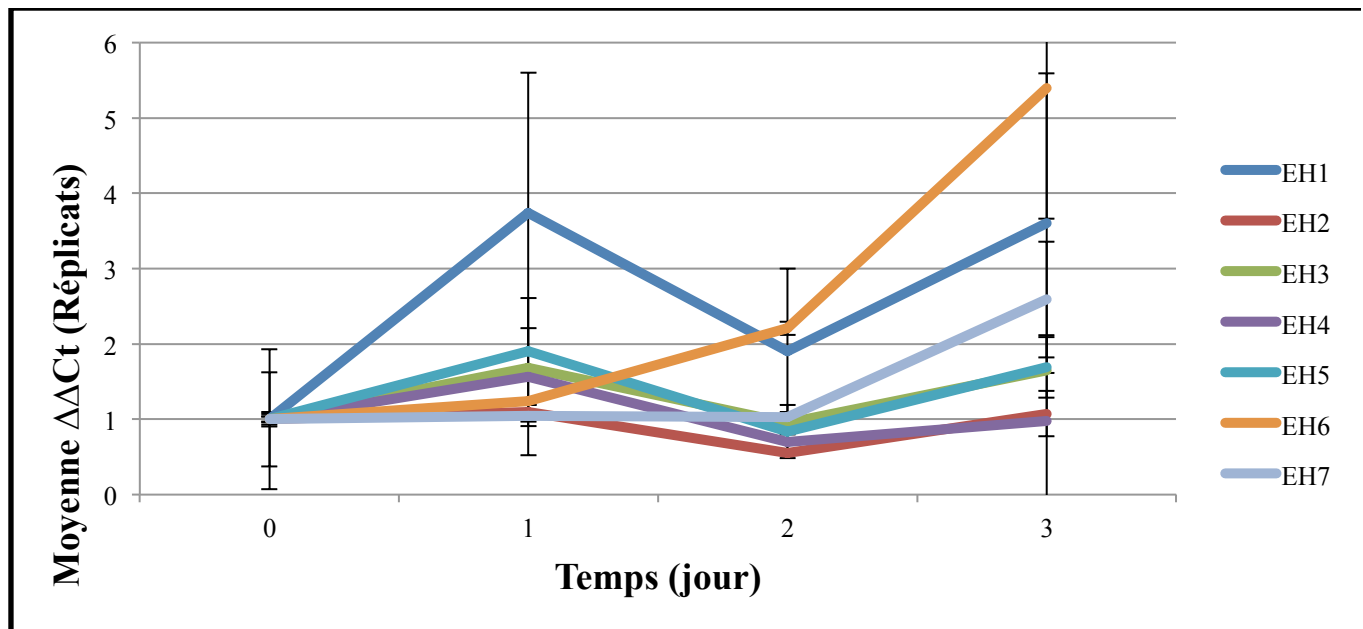


Figure 3.40 : Expression des 7 EHs chez *Arabidopsis thaliana* suite à l'infection des feuilles par *Botrytis cinerea*. Le niveau d'expression est mesuré par RT-qPCR après traitement (1-3J)

Partie III : Effet des acides gras libres sur l'expression de certains gènes impliqués dans la défense

Les réponses de défense de la plante face à des stress biotiques passent par la reconnaissance d'éléments associés au stress. Les pathogènes sont perçus par la plante grâce à des éléments conservés comme par exemple la chitine ou la flagelline qui sont reconnus à l'aide de récepteurs (PRRs, Pathogens-associated Molecular Patterns). Ces motifs conservés sont appelés PAMPs (Pathogens-associated molecular patterns). Ceci va induire chez la plante une cascade de réactions de défense dont l'immunité innée appelée PTI (PAMP-Triggered Immunity).

L'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique régulent les réponses de défense lorsque la plante est attaquée par un herbivore, un champignon ou un pathogène. On peut citer l'exemple les jasmonates qui interviennent lors d'une attaque d'herbivore (Heitz *et al.*, 2012) ou d'un champignon phytopathogène comme *Botrytis cinerea* (Aubert *et al.*, 2014). Les réponses de défense de la plante incluent un renforcement de la paroi mais aussi la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Dans une étude citée auparavant (Schweizer *et al.*, 1996a), le traitement de culture de cellules de pommes de terre avec des monomères de cutine induit une alcalinisation du milieu, de la production d'éthylène et induit l'expression de gènes de défense (PR). Par exemple les défensines de plantes constituent la famille 12 des protéines PR (Sels *et al.*, 2008). Ce sont des petits peptides cationiques formant des pores multimériques qui perméabilisent les membranes. *Pdfl.2* code pour une défensine et est induit par la voie des JA et éthylène chez *Arabidopsis thaliana* (Pennick *et al.*, 1996). La famille PR4 (et PR1) est une famille d'enzymes dégradant le polymère de chitine. Le but de mon travail a été d'étudier la perception de la plante vis à vis de la cutinase de champignons mais également lors de traitement avec des acides gras libres et voir si les groupements hydroxyles jouent un rôle dans la perception d'une attaque par la plante.

5.1 Traitement de rosettes avec la cutinase de *Fusarium solanii*

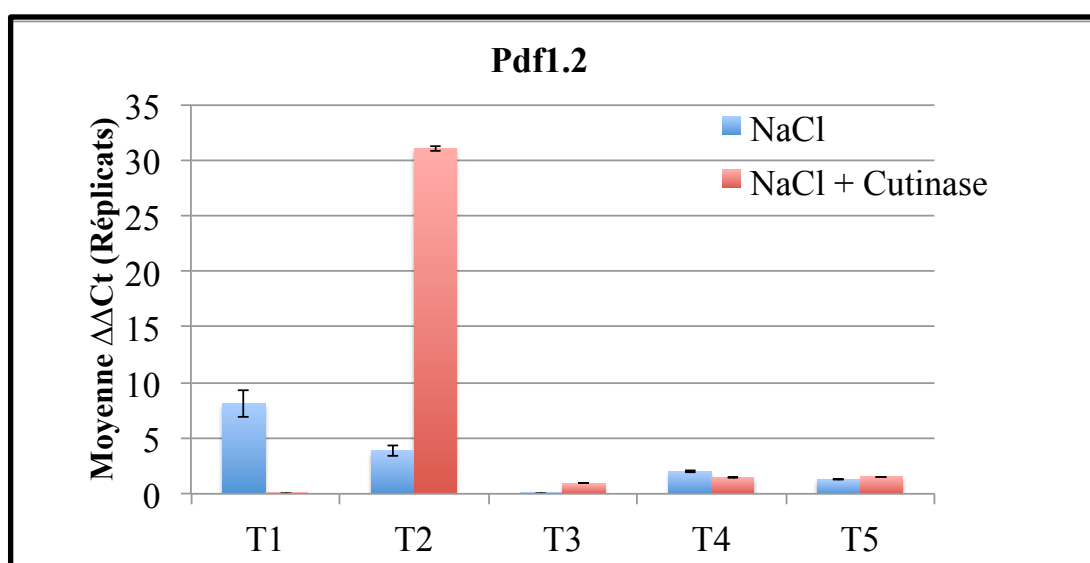
La cutinase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la cutine libérant les monomères d'acides gras de la cutine. Cette enzyme est sécrétée par les champignons phytopathogènes et participe à l'infection de la plante puisqu'elle permet aux champignons de pénétrer la cuticule. Je me suis intéressée à la réponse de la plante à un traitement avec la cutinase de *Fusarium solanii*. *Fusarium solanii* est un champignon phytopathogène

appartenant à la famille des ascomycètes qui attaque de nombreuses plantes d'intérêt économique comme la soja et le maïs. J'ai réalisé les traitements sur plusieurs rosettes d'*Arabidopsis thaliana* et récolté à 5 temps différents après traitement (30 min, 1h, 6h, 12h et 24h). J'ai ensuite regardé l'expression de plusieurs gènes de défense par RT-qPCR. J'ai étudié l'expression de *PR4* (pathogenesis related protein), *Pdf1.2* (plant defensine), *JAR1* (Jasmonate related protein) et *CYP74A1* (allène oxidase) ces gènes étant impliqués dans les réponses de défense lors de stress biotiques et sont des marqueurs des voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène. J'ai également étudié l'expression de deux gènes impliqués dans la voie de l'acide jasmonique *CYP94B3* et *CYP94C1* impliqués dans le catabolisme du JA-Ile (Widemann *et al.*, 2013), caractérisés au laboratoire.

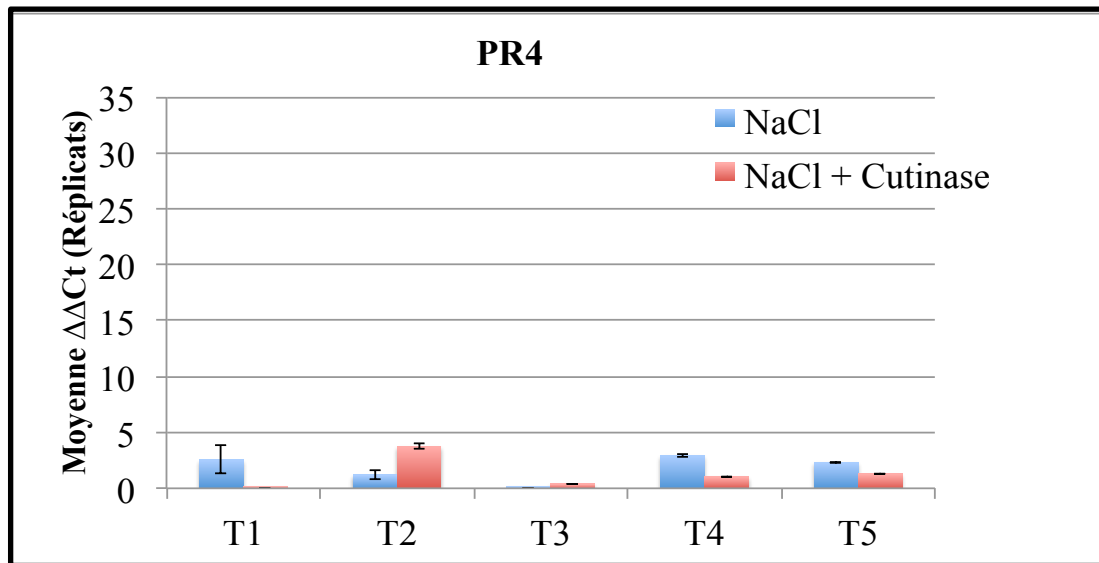
Pour les deux gènes de défense *PR4* et *Pdf1.2*, on peut observer que l'on a une augmentation de l'expression de *Pdf1.2* après 1h de traitement puis on retrouve l'expression observée dans les feuilles non-traitées. Pour *PR4*, il n'y a pas de modification de l'expression au cours des 24h qui suivent le traitement.

Dans le cas des deux *CYP94s* impliqués dans la voie de catabolisme de l'acide jasmonique, on peut observer comme pour *Pdf1.2* une augmentation de l'expression rapidement après le traitement. En effet, 1h après le traitement, *CYP94B3* et *CYP94C1* sont induits par le traitement plus de 30 fois

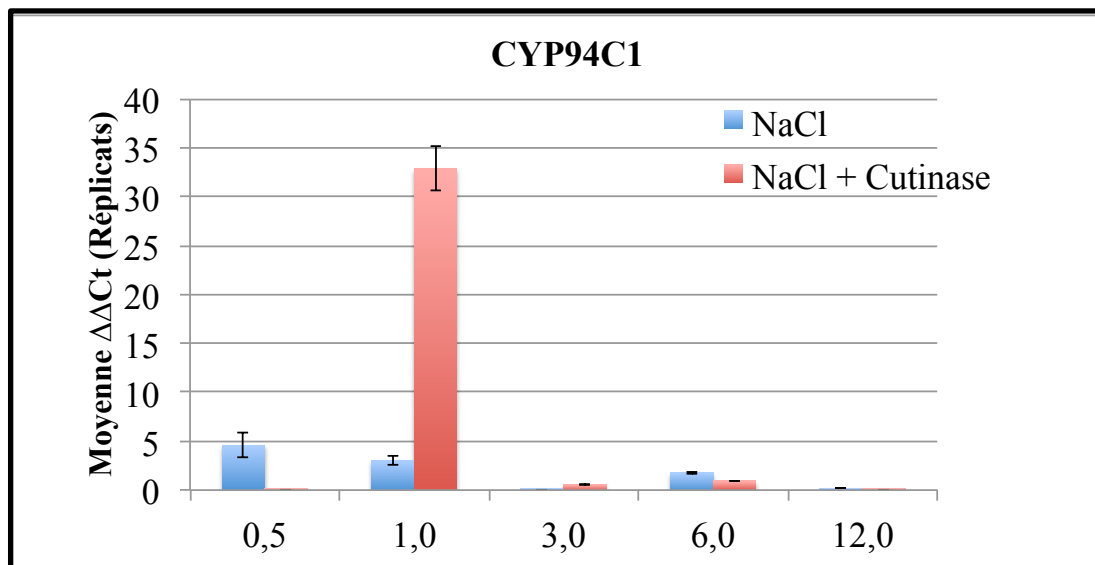
(A)



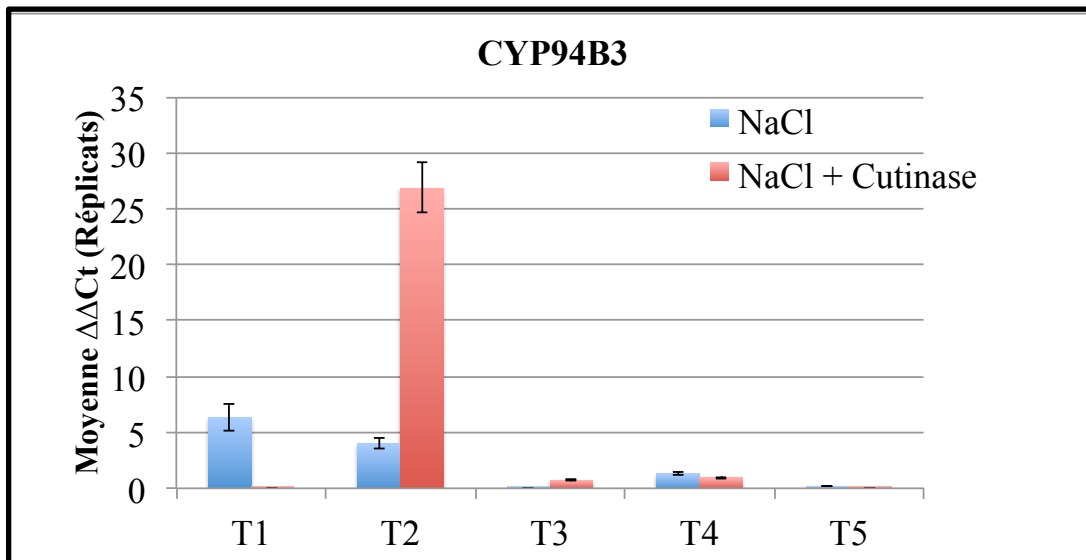
(B)



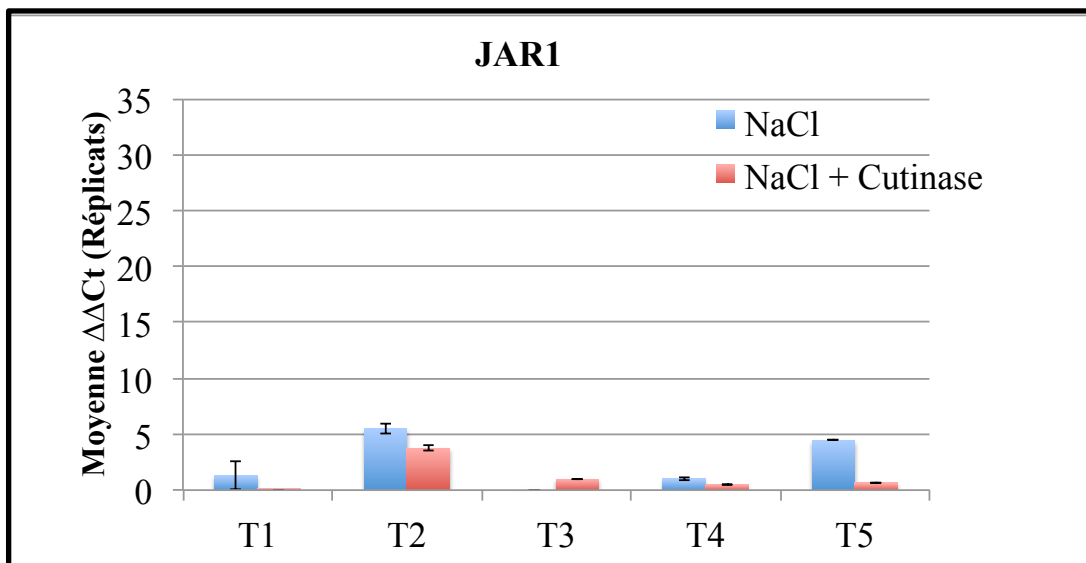
(C)



(D)



(E)



(F)

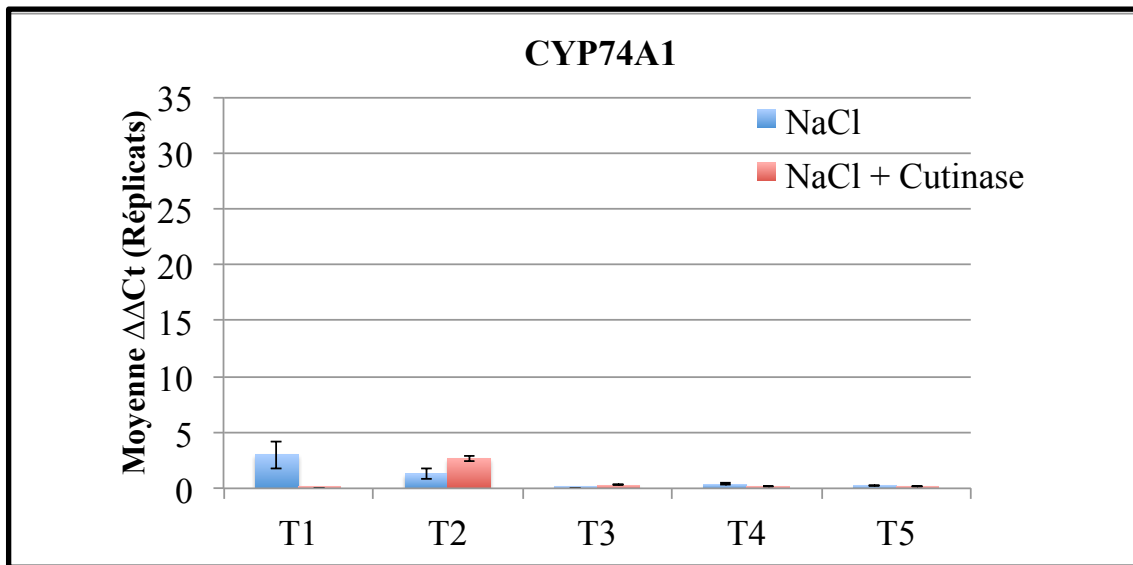


Figure 3.41 : Effet du traitement des feuilles d’*Arabidopsis thaliana* par la cutinase de *Fusarium solanii* et mesure du niveau d’expression par RT-qPCR au cours du temps (en heures) de plusieurs gènes indiqués dans les mécanismes de défense de la plante. (A) Pdf1.2 (B) PR4 (C) CYP94C1 (D) CYP94B3 (E) JAR1 (F) CYP74A1. Les expériences sont réalisées avec le tampon de reprise NaCl seul (en bleu) ou avec la cutinase (en rouge).

Il semble donc que le traitement avec la cutinase de *Fusarium Solanii* est perçu par *Arabidopsis thaliana* et induit la transcription des gènes impliqués dans les mécanismes de défense. Cette perception est très probablement due à la libération des acides gras par la cutinase.

5.2 Traitement de rosettes d’*Arabidopsis thaliana* avec des acides gras libres

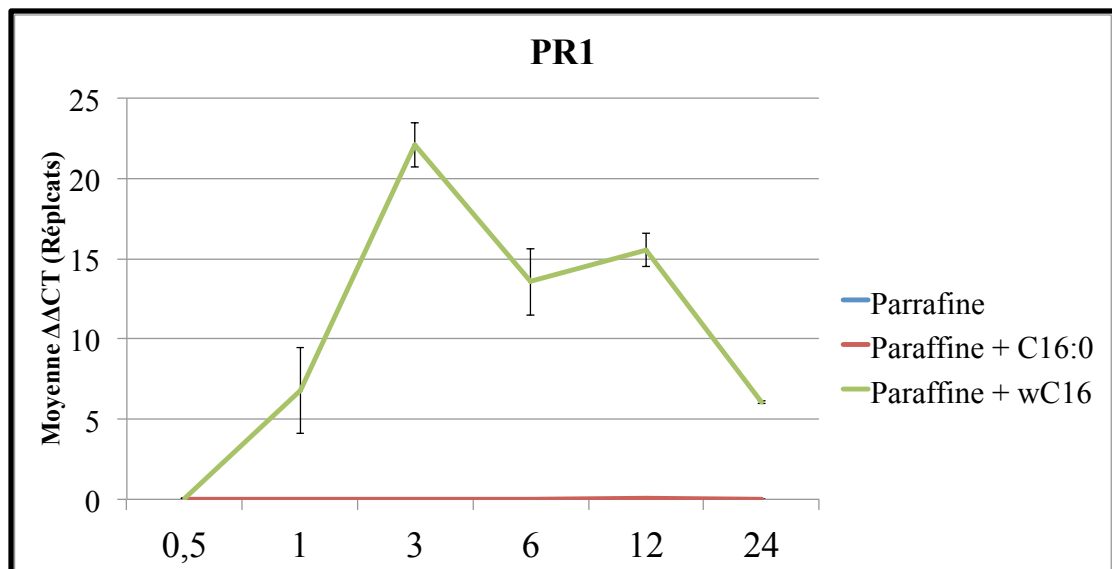
5.2.1 Traitement avec des C16

Les acides gras libres peuvent être perçus par les plantes et induire des réactions de défense. Plusieurs tests de traitement d’acides gras ont été réalisés. Dans la première partie de ce travail je me suis intéressée aux effets des C16. J’ai réalisé des traitements avec du C16 :0 et du C16 ω -hydroxylé.

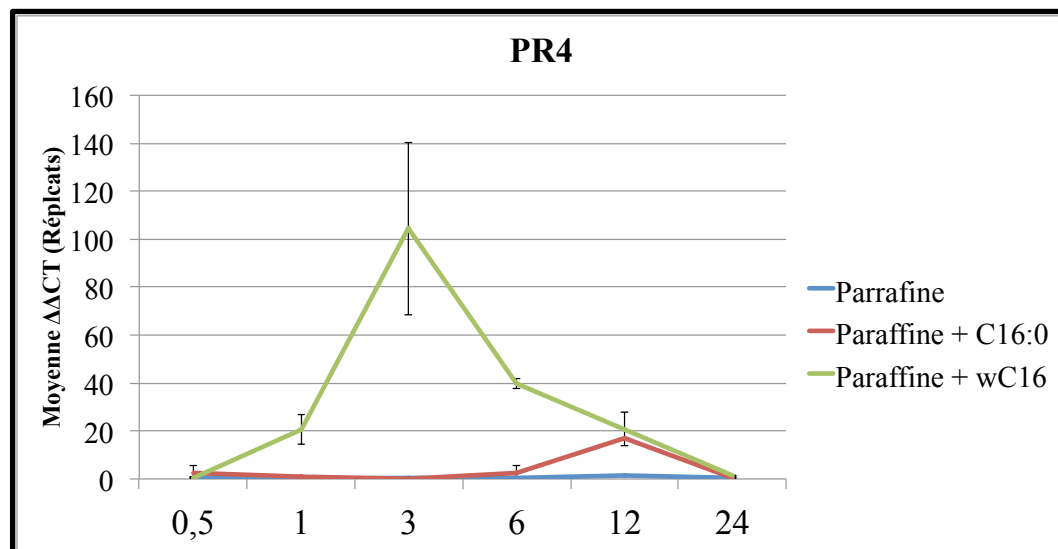
L’expression de plusieurs gènes de défense est mesurée par RT-qPCR. Dans le cas de

PR1 et PR4, on peut observer que les deux gènes sont induits très fortement, près de 25 fois et 100 fois respectivement dans les 6h qui suivent le traitement (**Figure 3.42 A et B**). L'expression de Pdf1.2 est induite 1h après le traitement (**Figure 3.42 C**) donc plus tôt que pour les deux autres gènes étudiés.

(A)



(B)



(C)

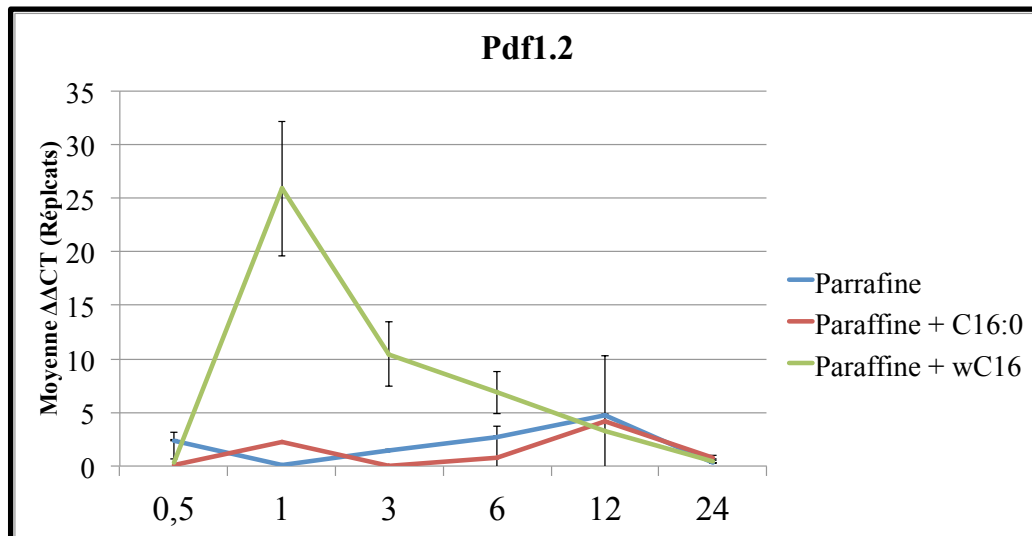
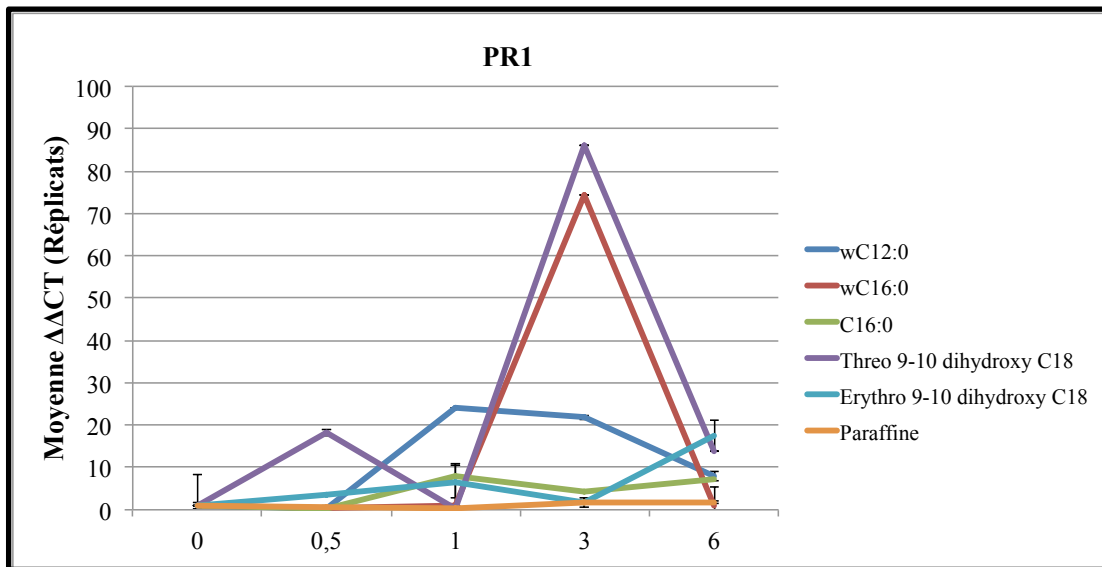


Figure 3.42 : Effet du traitement de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* avec des acides gras en C16 au cours du temps (en heures). L'expression des gènes *PR1* (A), *PR4* (B) et *Pdf1.2* (C) est mesurée par RT-qPCR de 1 à 6 jours après traitement (800 μ M) d'acides gras.

5.2.2 Traitement avec des C18

L'étude de l'expression de *PR1* après traitement avec différents acides gras montre que le traitement avec le C12:0 ω -hydroxylé, et le C16:0 ω -hydroxylé a un effet plus marqué (induction entre 70 et 90 fois) que l'effet observé avec les acides gras non hydroxylés. Ensuite je me suis intéressée à l'effet de deux formes de C18 hydroxylés dans la chaîne. On peut observer que le C18 9,10 dihydroxy thréo induit près de 90 fois l'expression de *PR1* 6 heures après le traitement avec que la forme erythro n'induit pas l'expression du gène. La stéréochimie des acides gras libres est donc très importante pour la perception des acides gras par les plantes.

(A)



(B)

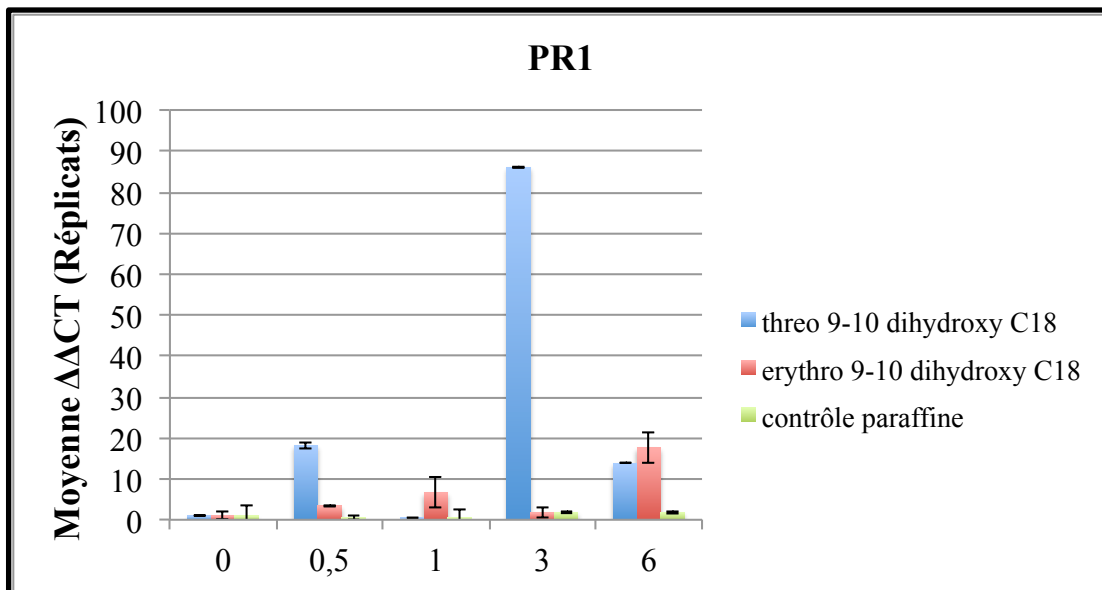


Figure 3.43 : Expression de *PR1* lors des traitement de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* par deux énantiomères de diol à C18 au cours du temps (en heures), (A) avec les acides gras de plusieurs longueurs de chaîne ; (B) avec les énantiomères de C18 uniquement.

L'expression de *PR1* est mesurée après les différents traitements sur des fleurs. On peut observer que les deux formes de C18 n'ont aucun effet sur l'expression de ce gène. En revanche pour les C16, la forme ω -hydroxylée induit l'expression 20 fois (**Figure 3.43A**). Il y

a donc un effet même s'il est plus faible que celui observé sur les feuilles (induction de 80 fois).

La forme erythro du C18 induit 5 fois l'expression de *PR1* ce qui est faible comparé à 20 fois dans les feuilles pour la même forme de C18 et 90 fois pour la forme thréo dans les feuilles (**Figure 3.43B**).

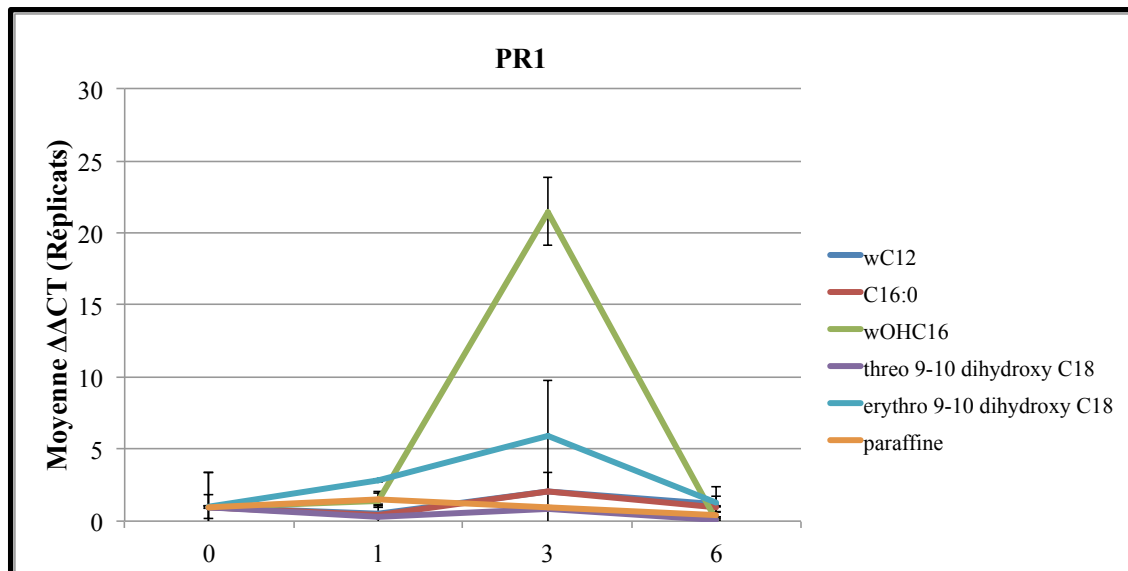
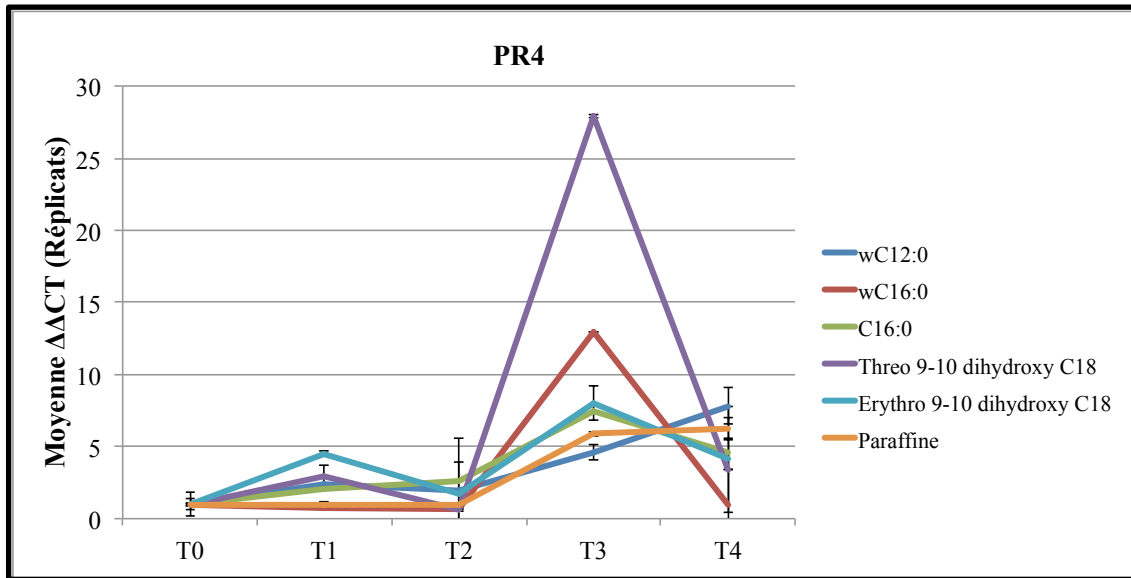


Figure 3.44 : Expression de *PR1* lors de traitements de fleurs d'*Arabidopsis thaliana* avec plusieurs formes d'acides gras libres au cours du temps (en heures) mesuré par RT-qPCR.

L'étude de l'expression de *PR4* dans les feuilles montre le même type de profil d'expression au cours du temps que *PR1* mais les inductions observées sont moins importantes. Cependant ce sont les même acides gras libres qui ont un effet, le C18 Thréo et le C16 ω -hydroxylé (**Figure 3.44**). Dans les fleurs, on voit peu d'induction de l'expression de *PR4* avec les différents traitements réalisés (**Figure 3.44**).

(A)



(B)

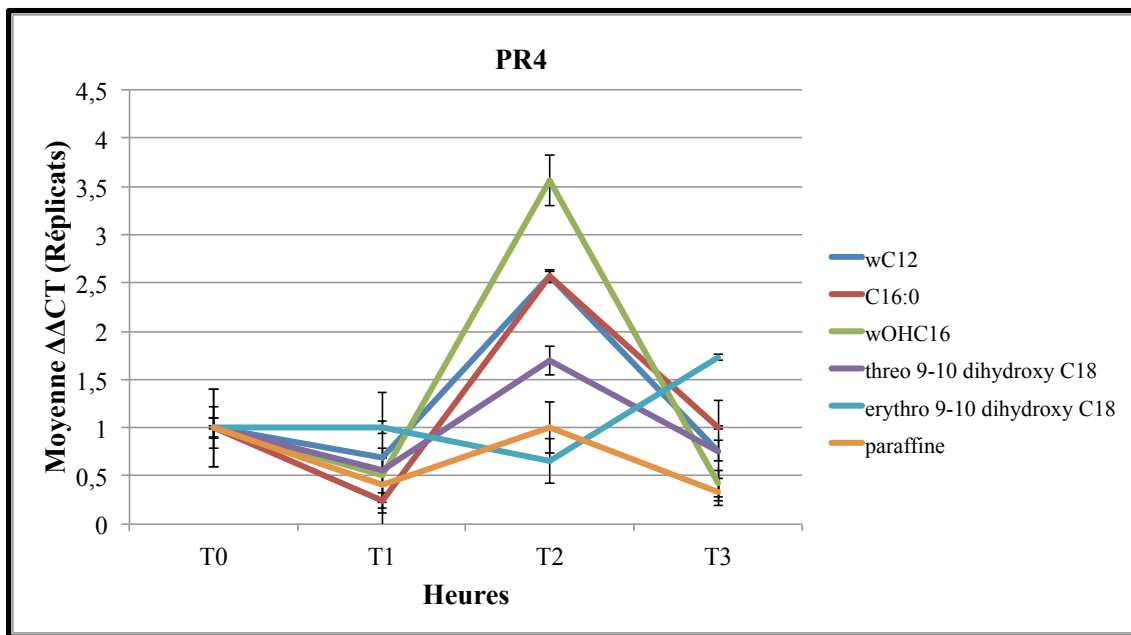


Figure 3.45 : Expression de *PR4* lors de traitement de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (A) ou de fleurs (B) avec plusieurs formes d'acides gras libres

Chapitre IV : Discussion

Chapitre IV : Discussion

Malgré une première mise en évidence en 1975 par Croteau et Kolattukudy, de l'existence des époxydes hydrolases (EHs) chez les plantes, le rôle physiologique de ces enzymes restait encore à déterminer. La purification et la caractérisation d'EH chez le soja (Blée et Schuber, 1992) ainsi que chez la pomme de terre (Stapleton *et al.*, 1994) et *Arabidopsis thaliana*, (Kiyosue *et al.*, 1994) n'ont pas permis de montrer leur implication dans la synthèse de la cutine suggérée par Croteau et Kolattukudy (1975a, b). Afin de tester l'hypothèse de leur participation dans la synthèse de la cutine, j'ai utilisé *Arabidopsis thaliana* comme modèle, mon étude s'est portée sur *AtEH1*, dont le gène est co-exprimé avec celui de *CYP77A4*, une époxygénase d'acides gras (Sauveplane *et al.*, 2009) et avec les gènes d'autres enzymes impliquées dans la synthèse de la cutine. Les EHs appartiennent à la famille des protéines α/β -hydrolase et possèdent une triade catalytique d'acides aminés conservés (Morisseau et Hammock, 2005). Notre analyse de séquences protéiques a permis de montrer que *AtEH1* contient cette triade catalytique conservée également mais ne contient pas le domaine N-terminal retrouvé chez les enzymes de mammifères portant une activité phosphatase (Newman *et al.*, 2003). Ces informations suggèrent que *AtEH1* est bien une EH. Une étude sur les EHs cytosoliques de plantes (Morisseau *et al.*, 2000) montre un schéma d'inhibition différent de celui des enzymes de mammifères ce qui reflète les différences de spécificité de substrat, confirmées par des études aux rayons X effectuées sur l'EH de pomme de terre (Mowbray *et al.*, 2006) qui ont révélé le fait que les EHs de la plante pourraient être très efficaces dans le métabolisme de substrats avec des substituants aliphatiques du cycle époxyde. Nous avons pu confirmer cette hypothèse et la conversion des acides 9,10-époxytétraïque et 12,13-époxyoctadéc-9-énoïque en leurs diols vicinaux correspondants par *AtEH1* nous a permis de caractériser cette enzyme comme nouvelle époxyde hydrolase. Les deux substrats de *AtEH1* sont des produits des réactions catalysées par *CYP77A4* (Sauveplane *et al.*, 2009) suggérant que *AtEH1* et *CYP77A4* pourraient être impliqués dans une même voie métabolique. Les substrats métabolisés par *AtEH1* soutiennent l'hypothèse que cette enzyme est impliquée dans la synthèse de la cutine.

Les enzymes impliquées dans la synthèse de la cutine appartiennent souvent à des familles dont les membres présentent des capacités catalytiques très similaires ou

redondantes, par exemple il y a 5 CYP86As et 8 GPATs chez *Arabidopsis thaliana*. Malgré ces redondances, les enzymes qui participent à la synthèse de la cutine ont souvent été identifiées grâce à l'analyse de mutants. L'analyse des mutants de *AtEH1* a permis de confirmer son implication dans la synthèse de la cutine. Plus précisément, dans les feuilles de ces mutants, la quantité d'acide 9,10,18-trihydroxy-octadécénoïque est considérablement diminuée par rapport au Col0 et l'acide 18-hydroxy-9,10-époxyoctadécénoïque s'accumule concomitamment. Dans les graines, la diminution de la quantité de l'acide 9,10,18-trihydroxy-octadécénoïque est accompagnée d'une augmentation de l'époxyde correspondant. Ces résultats sont en accord avec les capacités catalytiques d'*AtEH1* déterminées *in vitro*.

La mesure de l'expression d'*AtEH1* déterminée par RT-PCR a révélé son expression dans tous les organes testés (feuilles, sépales, pétales, pistils, siliques) également compatible avec un rôle dans la synthèse de la cutine qui couvre ces parties aériennes des plantes (Pollard *et al.*, 2008).

La présence d'une grande quantité de monomères différents dans la cutine reflète la complexité du processus de synthèse de la cutine (substrats et enzymes). Les enzymes clé (cytochrome P450, GPAT, LACS) dans cette voie sont localisées dans le RE. Les réactions catalysées par ces enzymes (ω -hydroxylation, activation de CoA et transfert d'acyle respectivement) pourraient être ordonnées de différentes manières pour produire des acylglycérols ω -hydroxylés, l'élément basique des esters glycérolipidiques (Pollard *et al.*, 2008). *AtEH1* pourrait également entrer dans les différentes voies à différents endroits. En effet, des études biochimiques réalisées avec *Vicia sativa* (Pinot *et al.*, 1992) ont montré que l'acide 9,10,18-trihydroxystéarique peut être généré soit par l' ω -hydroxylation du diol correspondant, soit par l'hydrolyse du cycle oxiran de l'époxy-hydroxy dérivé. Ceci suggère que *AtEH1* pourrait intervenir avant ou après l' ω -hydroxylase. Comme pour les autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de cutine, la nature exacte du substrat *in vivo* d'*AtEH1* (c'est-à-dire, acide gras libre, acide gras activé avec CoA ou liée au glycérol) reste à établir. Le substrat naturel de *AtEH1* semble cependant plutôt être un acide gras libre qu'un acide gras estérifié comme un glycérolipide ou un acyl-CoA puisque le méthyl ester de l'acide 9,10-époxy-stéarique n'est pas substrat d'*AtEH1*.

La question de la localisation de la voie de biosynthèse des monomères reste encore à déterminer et il est intéressant de comprendre comment une molécule aliphatique est

substrat d'une enzyme cytosolique. Certaines enzymes clés de la voie de synthèse de la cutine sont localisées dans le RE, c'est pourquoi l'hypothèse selon laquelle cette voie a lieu dans le RE était fortement soutenue. Cependant, certaines enzymes membranaires ont leur site actif dans le cytosol. C'est le cas des GPATs (Yang *et al.*, 2012) ou des cytochromes P450s (Bassard *et al.*, 2012). De plus, la localisation de AtEH1 décrite dans ce travail de thèse ainsi que DCR (qui appartient à la famille des acyltransférases, Defective Cuticular Ridges) qui sont localisées dans le cytosol (Panikashvili *et al.*, 2009) soutient l'hypothèse que cette synthèse pourrait avoir lieu dans le cytosol. Les interactions protéines-protéines et protéines-membranes doivent être d'une importance primordiale pour la synthèse des monomères de la cutine. En effet, de telles interactions sont caractéristiques des métabolons, qui sont des complexes d'enzymes qui interviennent séquentiellement dans le métabolisme (Srere, 1985). Dans le métabolisme des plantes, les cytochrome P450s sont impliqués dans la nucléation des métabolons et interagissent également avec les protéines cytosoliques qui sont associées au RE (Ralston et Yu, 2006; Bassard *et al.*, 2012). Le RE étant à la fois dynamique et remodelé en continu, ces interactions sont facilitées (Griffing 2010). AtEH1 pourrait être localisée près du RE et participer à la synthèse des monomères de cutine grâce à de telles interactions.

Les époxydes et les diols vicinaux des acides gras à C18 sont des composants majeurs de la cutine et subérine des plantes (Holloway et Deas, 1973). Par exemple, les acides 18-hydroxy-9,10-époxyoctadécanoïque et 9,10,18-trihydroxyoctadécanoïque représentent environ 50% des monomères de la cutine chez le blé (*Triticum aestivum*) (Matzke et Riederer, 1990). Chez *Arabidopsis thaliana*, les acides gras époxydés et poly-hydroxylés sont des monomères mineurs dans la composition de la cutine comparés aux quantités retrouvées de monomères ω -hydroxylés ou aux acides α , ω -dicarboxyliques (Bonaventure *et al.*, 2004). Cependant dans ce travail, nous avons montré qu'ils sont présents dans les graines et les feuilles et que AtEH1 participent à leur formation.

Le rôle de la cutine chez les plantes a été beaucoup étudié pour son rôle de barrière contre les mouvements d'eau, des solutés ou encore des gaz (Pollard *et al.*, 2008 ; Schreiber, 2010 ; Nawrath *et al.*, 2013; Barberon *et al.*, 2016). Le retard de germination des graines des lignées ko pour *AtEH1* dans les conditions de stress osmotique observés dans ce travail pourrait indiquer qu'il y a une modification dans l'assemblage du polymère de cutine présent dans le tégument de la graine (Molina *et al.*, 2008) de l'embryon (Moussu *et al.*, 2013) et de l'endosperme (De Giorgi *et al.*, 2015). Ce changement pourrait également être la conséquence

de la diminution de la teneur en acides gras trihydroxylés ou pourraient être dûs à l'accumulation des acides gras époxydés. L'augmentation de la perméabilité de cuticule de plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* ayant une cutine modifiée a déjà été décrite (Li *et al.*, 2007). L'hypothèse selon laquelle le polymère de cutine du tégument de la graine / endosperme est affecté est renforcée par l'observation de l'augmentation de perméabilité des graines de mutants pour *AtEHI* par rapport au *Col0*. En revanche, la perméabilité au bleu de toluidine n'est pas modifiée par la disparition presque complète de l'acide 9,10,18-trihydroxy-octadécénoïque dans la cutine des feuilles des mutants pour *AtEHI* (données non présentées). La modification du polymère peut également rester sans effet sur la perméabilité (Compagnon *et al.*, 2009). Ces résultats montrent que ce qui caractérise les propriétés du polymère de cutine est un processus complexe.

L'architecture de la cutine dépend des liaisons esters formées grâce aux acides gras hydroxylés. La cutine de différentes plantes a été analysée afin d'étudier la structure du polymère et ceci a permis de montrer que la majorité des groupements hydroxyles primaires sont estérifiés (Deas et Holloway, 1977; Kolattukudy, 1977). Les hydroxylations secondaires des monomères en C16 sont également impliquées dans des liaisons ester secondaires (Deas et Holloway, 1977; Kolattukudy, 1977). Graça et Lamosa, 2010 ont utilisé de l'ESI-MS/MS couplée à de la RMN 1D et 2D afin d'étudier et de comparer différentes cutines de plantes enrichies en C16 et C18 ou par un mélange de C16 / C18. Leur travail a permis de montrer que la cutine comporte plutôt une structure de dendrimère (**Figure 1.3**) lorsqu'elle est enrichie en C18 et plutôt sous forme de réseaux lorsqu'elle est enrichie en C16. Les études de RMN ont permis de mettre en évidence la rigidité de la cutine grâce aux liaisons esters secondaires qui permettent d'obtenir ce réseau ramifié (Zlotnik-Mazori et Stark 1988; Garbow et Stark 1990). Les diols vicinaux de C18 produits par *AtEHI* peuvent jouer un rôle majeur dans le renforcement de la cutine par la formation de liaisons esters secondaires.

Pendant mon travail de thèse, nous avons identifié *AtEHI* et démontré son rôle dans la biosynthèse de la cutine. Nous avons également caractérisé *CYP77B1* comme étant capable d'époxyder les acides gras *in vitro*. Son rôle physiologique reste à déterminer mais il est vraisemblable que l'époxydation d'acides gras soit sa réelle fonction. Ceci est suggéré par le fait que cette enzyme et *CYP77A4* dont on connaît l'implication dans la biosynthèse de la cutine semblent redondantes. En effet, chez le mutant KO pour une des deux enzymes l'expression de l'autre est stimulée par rapport à *Col0*. *AtEHI* et *CYP77B1* représentent de

nouveaux outils pour comprendre les propriétés de barrière de la cutine et en manipulant leurs expressions nous pourrions étudier les effets des modifications de la composition de la cutine sur le développement de la plante et la résistance des plantes au stress biotiques et abiotiques, ceci en corrélation avec les résultats obtenus avec les traitements d'acides gras libres qui a montré que les diols de C18 joue un rôle dans l'induction de gènes impliqués dans les mécanismes de défense de la plante.

L'incorporation des diols d'acides gras dans la cutine pourrait jouer un rôle dans la résistance des plantes aux pathogènes et AtEH1 jouerait donc un rôle indirect dans ce processus. Prost *et al.*, (2005) ont démontré que les acides gras en C18 comportant des diols ont des activités antimicrobiennes. La cutine est considérée comme un réservoir d'oxylipines qui ont divers rôles biologiques (Reina-Pinto et Yephremov 2009). Sa dégradation par les cutinases est la première étape du processus d'infection (Carvahlo *et al.*, 1999) qui résulte en la libération de monomères de cutine, éléments clés dans les interactions plantes-pathogènes. En effet, l'étude réalisée lors de ma thèse sur l'effet des acides gras libres et leur perception par la plante a montré que les acides gras ω -hydroxylé et poly-hydroxylé peuvent être perçus par la plante et c'est également le cas dans d'autres études où ils agissent comme des signaux perçus par les cellules et induisant des mécanismes de défense (Schweizer *et al.*, 1996ab). Dans ces études, l'acide 9,10,18-trihydroxystéarique qui est le dérivé ω -hydroxylé de l'acide 9,10-dihydroxystéarique produit par AtEH1 est l'un des composés testé le plus efficace. Dans ce contexte, il est intéressant de souligner que l'acide 12,13-epoxy-octadec-9-enoïque, un substrat de AtEH1 inhibe l'allene oxide cyclase, une enzyme clé dans la synthèse de l'acide jasmonique (Ziegler *et al.*, 1997).

La caractérisation biochimique d'autres membres de la famille d'*AtEH1* est en cours. L'expression des différentes EHs dans des organes différents d'*Arabidopsis thaliana* suggère qu'il pourrait y avoir une redondance d'activité de ces enzymes mais à plusieurs endroits de la plante. De plus, il est intéressant de noter que dans la cutine des graines du mutant de *AtEH1*, l'acide 9,10,18-trihydroxy-octadécénoïque a diminué de seulement 20% par rapport au *Col0*, suggérant que d'autres EH(s) sont impliquées dans la formation de ce monomère. Des données préliminaires d'incubations *in vitro* des autres EHs montrent que 3 autres EHs chez *Arabidopsis thaliana* sont capables de métaboliser les mêmes substrats que AtEH1. Ainsi, il sera intéressant de déterminer quels autres EH(s) ont un rôle dans la synthèse du polymère de cutine et si elles interviennent à des endroits différents dans la plante.

Publications

Arabidopsis thaliana EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers

Emmanuelle Pineau^{1*}, Lin Xu^{2*}, Hugues Renault¹, Adrien Trolet¹, Nicolas Navrot¹, Pascaline Ullmann¹, Bertrand Légeret², Gaëtan Verdier¹, Fred Beisson² and Franck Pinot¹

¹Université de Strasbourg, CNRS, IBMP UPR 2357, F-67000 Strasbourg, France; ²Institute of Biosciences and Biotechnologies, CEA-CNRS-Aix Marseille Université, UMR 7265, LB3M, F-13108 Cadarache, France

Summary

Author for correspondence:

Franck Pinot

Tel: +33 367 15 52 71

Email: franck.pinot@ibmp-cnrs.unistra.fr

Received: 9 February 2017

Accepted: 22 March 2017

New Phytologist (2017)

doi: 10.1111/nph.14590

Key words: abiotic stress, *Arabidopsis thaliana*, cutin, epoxide hydrolase, resistance, vicinal diol.

- Epoxide hydrolases (EHs) are present in all living organisms. They have been extensively characterized in mammals; however, their biological functions in plants have not been demonstrated.
- Based on *in silico* analysis, we identified AtEH1 (At3g05600), a putative *Arabidopsis thaliana* epoxide hydrolase possibly involved in cutin monomer synthesis. We expressed AtEH1 in yeast and studied its localization *in vivo*. We also analyzed the composition of cutin from *A. thaliana* lines in which this gene was knocked out.
- Incubation of recombinant AtEH1 with epoxy fatty acids confirmed its capacity to hydrolyze epoxides of C18 fatty acids into vicinal diols. Transfection of *Nicotiana benthamiana* leaves with constructs expressing AtEH1 fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP) indicated that AtEH1 is localized in the cytosol. Analysis of cutin monomers in loss-of-function *Ateh1-1* and *Ateh1-2* mutants showed an accumulation of 18-hydroxy-9,10-epoxyoctadecenoic acid and a concomitant decrease in corresponding vicinal diols in leaf and seed cutin. Compared with wild-type seeds, *Ateh1* seeds showed delayed germination under osmotic stress conditions and increased seed coat permeability to tetrazolium red.
- This work reports a physiological role for a plant EH and identifies AtEH1 as a new member of the complex machinery involved in cutin synthesis.

Introduction

Epoxide hydrolases (EHs) belong to the α/β -hydrolase fold family of enzymes and convert epoxides to vicinal diols via the addition of water (Morisseau & Hammock, 2005). They are present in all living organisms from microorganisms to invertebrates and mammals (reviewed in Morisseau, 2013). A few data illustrate their role in microorganisms. *Rhodococcus erythropolis* EH is essential for metabolism and assimilation of carbon sources (Van der Werf *et al.*, 1999) and some fungal EHs participate in the synthesis of mycotoxins (Bradshaw & Zhang, 2006). In invertebrates, most studies have focused on insect EHs and their role in the metabolism of xenobiotics as well as in the metabolism of hormones and pheromones (reviewed in Morisseau, 2013). EHs have been extensively studied in mammals, where they have been found in most organs of all species tested. Based on subcellular localization and substrate specificity, five distinct enzyme groups have been defined: microsomal EH (reviewed in Morisseau, 2013);

soluble or cytosolic EH (reviewed in Morisseau, 2013); cholesterol EH (Silvente-Poirot & Poirot, 2012); leukotriene A4 EH (Minami *et al.*, 1987); and hepxilin EH (Pace-Asciak & Lee, 1989). However, most research has focused on microsomal and cytosolic EHs. Induction of hepatic microsomal EH in rats and mice by a variety of foreign compounds suggests an involvement in xenobiotic metabolism (Morisseau & Hammock, 2005). The broad spectrum of substrates metabolized by the cytosolic enzyme also suggests a detoxifying function (Wixtrom & Hammock, 1985) but it also participates in metabolism of endogenous epoxides of fatty acids (FAs) that are hydrolyzed more efficiently than many other substrates (Morisseau, 2013).

Although an EH activity was described >40 yr ago in an apple (*Malus pumila*) skin homogenate (Croteau & Kolattukudy, 1975b), little information is available concerning these enzymes in plants. Cloning of cytosolic EHs from potato (*Solanum tuberosum*) (Stapleton *et al.*, 1994) and *Arabidopsis thaliana* (Kiyosue *et al.*, 1994) and X-ray structure determination of the potato enzyme (Mowbray *et al.*, 2006) showed that, similar to EHs from other organisms, plant EHs belong to the α/β -

*These authors contributed equally to this work.

hydrolase fold family of enzymes containing a conserved triad of catalytic amino acids (Morisseau & Hammock, 2005). They have also been described in soybean (*Glycine max*) (Arahira *et al.*, 2000), lemon (*Citrus jambhiri*) (Gomi *et al.*, 2003) and *Nicotiana benthamiana* (Wijekoon *et al.*, 2008). Despite this longstanding interest, the physiological role of EHs in plants is still unknown.

The above-mentioned first description of EH from apple took place in the context of cutin synthesis. Cutin together with waxes, polysaccharides and phenolics constitutes the cuticle, which forms the interface between the aerial part of the plant and its environment (Fernandez *et al.*, 2016). Cutin covers the outer surface of the outer primary wall of epidermal cells and is a key component of the cuticle in terms of barrier properties (Sadler *et al.*, 2016). The capacity to synthesize cutin and the related biopolymer suberin was acquired by plants during land colonization c. 450 million yr ago (Kolattukudy, 2001; Pollard *et al.*, 2008; Nawrath *et al.*, 2013; Dominguez *et al.*, 2015; Fich *et al.*, 2016). Both their lipophilic character and their chemical structures contribute to protecting plants from environmental stress factors that prevail in terrestrial ecosystems: they represent physical barriers against physiological, chemical and biological stresses such as ultraviolet light, exposure to negative water potential of the environment, atmospheric pollutants and infections by pathogens. Cutin is an insoluble glycerolipid polyester composed of oxygenated C16 and C18 FAs, dicarboxylic acids and glycerol linked together by ester bonds between a carboxyl head group of a monomer and a hydroxyl group of another monomer (Kolattukudy, 1981; Beisson *et al.*, 2012). Glycerol participates in cross-linkages between FAs (Graça *et al.*, 2002) and can contribute up to 65% of the total cutin monomers in *A. thaliana* leaves (Yang *et al.*, 2016). Suberin is another polyester characterized by the presence of substantial amounts of aromatics and very long chain FAs and is deposited as lamellae inside the primary cell wall close to the plasma membrane (Kolattukudy, 2001; Bernards, 2002; Pollard *et al.*, 2008; Nawrath *et al.*, 2013). Suberin can be found in the aerial parts of plants (wound suberin in the leaf epidermis and structural suberin in bark tissues and seed coats) but also in the underground parts of plants (root periderm and endodermis). In root tissues, as well as in seeds, suberin controls water and solute uptake and prevents their leakage in the rhizosphere (Ma & Peterson, 2003; Barberon *et al.*, 2016).

Studies of cutin architecture have suggested that there is reticulation and cross-linkage between linear chains (Pollard *et al.*, 2008; Fich *et al.*, 2016). The secondary hydroxyls found in C16 or C18 cutin monomers are key elements for the formation of this branched part of the cutin network as they form secondary ester bonds. The cytochrome P450 CYP77A6 is responsible for the hydroxylation at the C10 position of 16-hydroxypalmitic acid leading to the *in vivo* formation of 10,16-dihydroxypalmitic acid, a widespread cutin monomer in leaves of many species and the most abundant monomer in *A. thaliana* flowers (Li-Beisson *et al.*, 2009). C18 cutin monomers, which can represent up to 60% of the total cutin in some organs and species (Holloway & Deas, 1973), frequently carry an epoxide or a vicinal diol group at positions

C9 and C10. Enzymes responsible for epoxide and vicinal diol (also secondary hydroxyl) formation in cutin monomers have not been identified. In earlier work with extracts from spinach (*Spinacia oleracea*) and apple (*Malus pumila*), Croteau & Kolattukudy (1975a,b) proposed a pathway leading from 18-hydroxyoleic acid to 9,10,18-trihydroxystearic acid (Supporting Information Fig. S1), involving a cytochrome P450 capable of FA epoxidation, and an EH responsible for epoxide hydrolysis to vicinal diols. Still, this pathway remains to be demonstrated *in planta* in order to confirm a biological function for plant EHs. The aim of the present work was to assess EH participation in the production of vicinal diols in *A. thaliana* cutin.

Materials and Methods

Chemicals

Radiolabeled [1-¹⁴C]oleic acid (50 Ci mol⁻¹) was obtained from PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA, USA). [1-¹⁴C]9,10-epoxystearic acid was produced by epoxidation of [1-¹⁴C]oleic acid with 3-chloroperbenzoic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). [1-¹⁴C]12,13-epoxyoctadec-9-enoic acid was enzymatically synthesized by incubating linoleic acid with recombinant CYP77A4 as described in Sauveplane *et al.* (2009). The silylating reagent N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% trimethylchlorosilane (TMS) was obtained from Pierce (Rockford, IL, USA). NADPH was obtained from Sigma (Saint Louis, MO, USA). Thin layer plates (Silica Gel G60 F254; 0.25 mm) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Cloning procedures

The coding sequence of *AtEH1* (At3g05600) was cloned by PCR from cDNA derived from *Arabidopsis thaliana* ecotype (L.) Heynh. Columbia-0 flowers. *AtEH1* cDNA was amplified with Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) using the following conditions: initial denaturation for 30 s at 98°C, 30 thermal cycles (15 s at 98°C, 15 s at 61°C, and 1 min 45 s at 72°C), and final extension for 5 min at 72°C. The PCR product was cloned into the pYeDP60 vector (Pompon *et al.*, 1996) using *Bam*HI and *Kpn*I restriction sites.

For translational fusion of *AtEH1* with the enhanced green fluorescent protein (EGFP) protein, the coding sequence was PCR-amplified (Phusion High Fidelity PCR Master Mix) using the following conditions: initial denaturation for 30 s at 95°C, 30 thermal cycles (15 s at 95°C, 15 s at 58°C, and 1 min 45 s at 72°C), and final extension for 5 min at 72°C with the *attB*-containing primers *attB1*-EH1:GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCTTCATGGTGGACACTAGCTTAAC and *attB*-EH1:GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTA ATAAAAGATAAATACACTCACA; it was then cloned into the pDONR207 vector by BP clonase reaction (Thermo Fisher Scientific). The resulting pENTR vector was used to shuttle the *AtEH1* coding sequence into the pB7WGF2 and pK7WGF3 vectors by LR clonase reaction (Thermo Fisher Scientific),

generating the p35S:EH1:EGFP and p35S:EGFP:EH1 expression vectors, respectively.

Heterologous expression of *AtEH1* in yeast

For expression of the full-length *AtEH1* protein, we used a yeast expression system originally developed for the expression of P450 enzymes and consisting of plasmid pYeDP60 and *Saccharomyces cerevisiae* strain WAT11 (Pompon *et al.*, 1996). Yeast cultures were grown and *AtEH1* expression was induced as described in Pompon *et al.* (1996) from one isolated transformed colony. After growth, cells were harvested by centrifugation and manually broken with glass beads (0.45 mm diameter) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 600 mM sorbitol. The volume of buffer was proportional to the weight of the yeast pellet: 6 g was homogenized in *c.* 30 ml of buffer. The homogenate was centrifuged for 20 min at 10 000 *g*. The resulting supernatant was centrifuged for 1 h at 100 000 *g*. Before storing at -30°C , glycerol (30%) was added to the supernatant. All procedures for cytosolic fraction preparation were carried out at between 0 and 4°C . The pellet consisting of microsomal membranes was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA and 30% (v/v) glycerol with a Potter–Elvehjem homogenizer and stored at -30°C . The volume of resuspension buffer was proportional to the weight of the yeast pellet: microsomes extracted from 6 g of yeast were resuspended in 3 ml of buffer. All procedures for microsomal preparation were carried out at between 0 and 4°C . As a positive control for microsome viability, these procedures were also performed after transformation of yeast with pYeDP60 carrying the coding sequence of CYP94C1 (Kandel *et al.*, 2007).

Subcellular fractionation of *Nicotiana benthamiana*

Agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* were harvested and 2 g of each sample was ground in liquid nitrogen. The resulting powder was added to 6 ml of buffer A (250 mM sucrose, 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8, 10 mM EDTA, 10 mM ascorbic acid and 2 mM dithiothreitol) and homogenized before filtration through Miracloth (Merck, Basel, Switzerland). The homogenate was centrifuged for 20 min at 10 000 *g*. The resulting supernatant was centrifuged for 1 h at 100 000 *g*. Before storing at -30°C , glycerol (30%) was added to the supernatant. The remaining microsomal pellet was resuspended in 140 μl of buffer B (250 mM sucrose, 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8, 10 mM EDTA and 30% glycerol). All procedures for cytosolic and microsomal fraction preparation were carried out at between 0 and 4°C .

Enzyme activity

Incubations were performed in 5-ml glass tubes (VSM, Andeville, France). Radiolabeled substrate dissolved in ethanol (10 μl of 1 mM solution) was added to the tube and then ethanol was evaporated. Resolubilization of the substrate was confirmed by measuring the radioactivity of the incubation media. Enzymatic

activity of yeast-expressed *AtEH1* proteins was determined by following the formation rate of metabolites. The standard assay (0.1 ml) contained 20 mM sodium phosphate (pH 7.4) and radiolabeled substrate (100 μM). The reaction was initiated by the addition of the cytosolic fraction from yeast expressing *AtEH1* (0.4 mg of protein) and was stopped after 10 min by the addition of 20 μl of acetonitrile (containing 0.2% acetic acid). The reaction products were resolved by thin layer chromatography (TLC) (Silica Gel G60 F254; 0.25 mm; Merck, Darmstadt, Germany) as described in the next section.

Thin layer chromatography methods

Incubation medium was directly spotted on TLC plates. For separation of metabolites from residual substrate, TLC plates were developed with a mixture of diethyl ether : light petroleum (boiling point $40\text{--}60^{\circ}\text{C}$) : formic acid (50 : 50 : 1, v/v/v). The plates were scanned with a radioactivity detector (Raytest Rita Star, Straubenhardt, Germany). The silica corresponding to the radiolabeled metabolites were scraped with a razor blade into counting vials and quantified by liquid scintillation (Minaxi Tri-carb 4000; Packard Instrument Co. Inc., Downers Grove, IL, USA), or metabolites were eluted from the silica with 10 ml of diethyl ether, which was removed by evaporation, methylated with diazomethane, trimethylsilylated with BSTFA containing 1% (v/v) TMS (1 : 1, v/v) and subjected to GC-MS analysis.

GC-MS analysis of metabolites generated by *AtEH1*

GC-MS analysis was carried out on a gas chromatograph (Agilent 6890 Series, Wilmington, DE, USA) equipped with a 30-m capillary column with an internal diameter of 0.25 mm and a film thickness of 0.25 μm (HP-5MS). The gas chromatograph was coupled to a quadrupole mass spectrometer (Agilent 5973N). Mass spectra were recorded at 70 eV and analyzed as previously described (Eglinton *et al.*, 1968).

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana wild-type (WT) and transgenic lines described here derive from the Columbia-0 ecotype. *Ateh1-1* (SALK-053239) and *Ateh1-2* (SAIL-549A04) T-DNA insertion lines were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (Fig. S2). Plants were grown in a controlled growth chamber in standard horticultural soil with a 16 h : 8 h, light : dark regime at $19\text{--}21^{\circ}\text{C}$ and at a relative humidity of 60–80%. For axenic cultures of *A. thaliana*, seeds were wetted with 70% ethanol, surface-sterilized with a 25% commercial solution of sodium hypochlorite, rinsed three times with sterile water, and sown on Murashige and Skoog (MS) salt medium (Sigma, Steinheim, Germany) containing 1% sucrose. Plates were stored for 48 h at 4°C in the dark for stratification and then transferred to a controlled growth chamber with a 16 h 23°C : 8 h 21°C , light : dark regime.

To screen for homozygous *ko* (*knock-out*) mutants, seeds from *Ateh1-1* and *Ateh1-2* were grown to rosette stage. Genomic DNA

was extracted from rosette leaves of between 20 and 30 individual plants, and PCR was carried out to confirm homozygous plants (using primer pairs SALK-LBb1/RT-EH-R and RT-EH-F/RT-EH-R and Phusion High Fidelity PCR Master Mix in the following conditions: initial denaturation for 30 s at 95°C, 30 thermal cycles (15 s at 95°C, 15 s at 72°C, and 1 min 45 s at 72°C), and final extension for 5 min at 72°C. In order to confirm knock-out of gene expression, 1 µg of total RNA was extracted from the homozygous plants for cDNA synthesis. Subsequently, reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) (initial denaturation for 5 min at 70°C with oligo dT followed by Superscript III, and then 5 min at 25°C, 60 min at 42°C, and 15 min at 72°C) was performed to amplify the full-length coding region of *AtEH1* (primer pairs RT-EH-F/RT-EH-R; RT-EH-F: ATGCATGCACACAATCGCAACTA; RT-EH-R: CTA AAA GCTTTTGTGTTGTCCCGAAGCTT).

To evaluate the tolerance of the *Ateh1* and WT lines to osmotic stress during seed germination, seeds were sown on MS medium supplemented with 1% sucrose and 1% agar, in the absence or presence of 500 mM mannitol. The cumulative germination rate of seeds was analyzed. Three biological replicates were grown to measure percentage germination. Between 200 and 300 seeds for each replicate were examined under a microscope (Motic SMZ-168 Series; Motic, Hong-Kong, China).

For seed coat permeability tests, tetrazolium red dye assays were performed: dry *A. thaliana* seeds were incubated in an aqueous solution of 1% (w/v) tetrazolium red (2,3,5-triphenyltetrazolium) at 30°C for 4–48 h. Seeds were rinsed in water before imaging.

AtEH1 subcellular localization

For the transient overexpression of EGFP fusion proteins, expression vectors p35S:EH1:EGFP and p35S:EGFP:EH1 described earlier (in cloning procedures) were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LB4404 *Hv* before agroinfiltration of 4-wk-old *N. benthamiana* leaves as described previously (Bassard *et al.*, 2011). Constructs carrying the soluble mRFP1 marker and the viral silencing suppressor p19 (Shamloul *et al.*, 2014) were concurrently introduced into *N. benthamiana* leaves. The plasmid carrying a construct coding for the CYP51G1 40 N-terminal amino acids (membrane anchoring sequence plus hinge linking to globular part) fused to mRFP was used as an endoplasmic reticulum (ER) marker (Bassard *et al.*, 2012). Leaf disks were excised 3 d post-infiltration for confocal observation. Live imaging was performed using a Zeiss LSM780 laser scanning confocal microscope. Single section images were recorded using a Plan-Apochromat 40×/1.40 Oil DIC M27 objective lens (Bioaxial, Paris, France). EGFP and mRFP1 fluorescence was sequentially recorded using the excitation/emission wavelengths 488/495–555 nm and 561/565–615 nm, respectively.

For Western blots, proteins from the *N. benthamiana* cytosol or microsomes, corresponding to 25 mg fresh weight, were separated using 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane. The unreacted sites were blocked with 5% nonfat milk for 2 h at room temperature, then

the membrane was incubated with anti-GFP JL8 (1 : 10 000; Clontech, Mountain View, CA, USA), anti-RFP 6G6 (1 : 5000; ChromoTek, Planegg, Germany) or anti-UGPase (1 : 10 000; Agrisera, Vännäs, Sweden) for 2 h and with an HRP-conjugated (horseradish peroxidase) goat secondary antibody (1 : 10 000; IBMP, Strasbourg, France) for 1 h.

Cutin monomer analysis by GC-MS and LC-MS/MS

Analysis of cutin monomers was performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) as described previously (Jakobson *et al.*, 2016). Briefly, after delipidation of tissues, acid-catalyzed transmethylation was performed and the FA methyl esters were extracted, acetylated, dried, redissolved in heptane:toluene (1 : 1, v/v) and analyzed by GC-MS. In order to quantify cutin monomers originally containing epoxy groups, derivatized cutin monomer samples were also analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as follows. Dried derivatized monomers were redissolved in acetonitrile : isopropanol : 10 mM ammonium formate (65 : 30 : 5, v/v/v) and separated on an Ultimate RS 3000 UPLC system (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, CA, USA) on which was mounted a Phenomenex (Atlanta, GA, USA) C18 Kinetex column (2.1 × 150 mm; 1.7 µm) and which was connected to a quadrupole-time-of-flight (QTOF) 5600 mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with a duo-spray ion source. A binary gradient system of acetonitrile–water (60 : 40, v/v) and isopropanol–acetonitrile (90 : 10, v/v), both containing 10 mM ammonium formate, was used as eluents A and B, respectively. The elution was performed with a gradient; eluent B was increased from 7% to 97% in 26 min then maintained for 5 min; solvent B was decreased to 7% and then maintained for another 7 min for column re-equilibration. The flow rate was 0.3 ml min⁻¹. The column oven temperature was set at 45°C. The ion source was operated in positive mode. Epoxy monomers were identified based on mass accuracy peaks compared with theoretical masses and on the MS/MS fragment ions. Relative quantification was achieved with MULTIQUANT software (AB Sciex) on the basis of intensity values of the ammonium adducts of the different epoxy monomers. For identification of the position of the epoxy group, delipidated cell walls obtained from 25 mg of mature seeds were incubated overnight at 25°C with 1 mg of *Fusarium solani* cutinase (Petersen *et al.*, 1998) in 0.9% (w/v) NaCl and 100 mM Tris-HCl, pH 8. The mixture was then adjusted to pH 5 and free FAs were extracted with dichloromethane, dried and redissolved in acetonitrile : isopropanol : ammonium formate 10 mM (65 : 30 : 5, v/v/v). The free FA monomers were analyzed by LC-MS/MS in negative mode using the same LC conditions except that water–methanol (95 : 5, v/v) and methanol–isopropanol (95 : 5, v/v), both containing ammonium formate at a final concentration of 10 mM, were used as eluents A and B, respectively.

Phylogenetic analysis

AtEH1 homologous sequences were retrieved by BLASTp search in the Phytozome database (www.phytozome.net).

Transcriptome data from the 1kP project (www.onekp.com) was also mined through tBLASTN. The EH data set contains 135 sequences derived from 46 plant species. Protein sequences were handled with the SEAVIEW 4 software (Gouy *et al.*, 2010) and aligned using the embedded MUSCLE algorithm (Edgar, 2004). Ambiguous sites of the alignment were masked with GBLOCKS (Castresana, 2000) before phylogeny reconstruction. EH trees were built with a maximum likelihood approach implemented with the PHYML3.0 software (Guindon *et al.*, 2010) and using the LG model (Le & Gascuel, 2008). Both nearest neighbor interchange (NNI) and subtree pruning and regrafting (SPR) methods (Hordijk & Gascuel, 2005) were used. We tested tree branch support by running an approximate-likelihood test (Anisimova & Gascuel, 2006).

Results

Identification of an epoxide hydrolase, AtEH1, potentially involved in cutin biosynthesis

In order to identify EHs involved in cutin biosynthesis, we mined publicly available transcriptome data to identify putative EH genes co-expressed with cutin-related P450 genes using the CYPEDIA platform (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia>; Ehlting *et al.*, 2008). Through this approach, we found the *A. thaliana* gene *At3g05600* (*AtEH1*), which was coexpressed in the ‘organ and tissue’ data set with *CYP77A4*, a known FA epoxygenase (Sauveplane *et al.*, 2009), and *CYP86A8*, which is involved in cutin synthesis (Wellesen *et al.*, 2001). The catalytic amino acids identified in various characterized EHs are conserved in *AtEH1* (Fig. 1), in particular Asp 105 and His 303, which correspond to Asp 333 and His 523 from mouse EH that are

implicated in hydrolysis of the epoxide during catalysis (Pinot *et al.*, 1995). Thus, protein sequence analysis supported the hypothesis that *AtEH1* is an EH. It is noteworthy that *AtEH1* is missing the N-terminal domain of mammalian enzymes, resulting in a fairly small protein (331 aa) with a calculated mass of 37.2 kDa and a pI of 5.44.

AtEH1 is a soluble protein localized in the cytosol

As already mentioned, mammalian EHs are both cytosolic and microsomal (ER membrane-bound proteins) (Morisseau, 2013). Much less information is available concerning plant EHs, but both localizations have been reported based on enzymatic activity (Blée & Schuber, 1992; Pinot *et al.*, 1997; Sauveplane *et al.*, 2009). To determine if *AtEH1* was cytosolic or membrane-bound, subcellular localization of the protein was explored via transient expression of N-terminally or C-terminally EGFP-tagged *AtEH1* proteins in *N. benthamiana* leaves. As presented in Fig. 2, confocal observations showed that *AtEH1* behaved as a typical cytosolic protein when compared with control soluble mRFP (lanes a and b) and EGFP (lane c) and behaved differently from the ER membrane-bound CYP51 anchor (lanes d and e). This result was consistent regardless of the position of the EGFP tag. This finding was confirmed by subcellular fractionation and western blot analysis, showing that *AtEH1* occurrence is restricted to the cytosolic fraction (Fig. 3, lane 1).

Metabolism of 9,10-epoxystearic and 12,13-epoxyoctadec-9-enoic acids by recombinant *AtEH1*

To assess the EH capabilities of *AtEH1*, we first incubated radio-labeled 9,10-epoxystearic acid (Fig. 4e) with cytosol of yeast

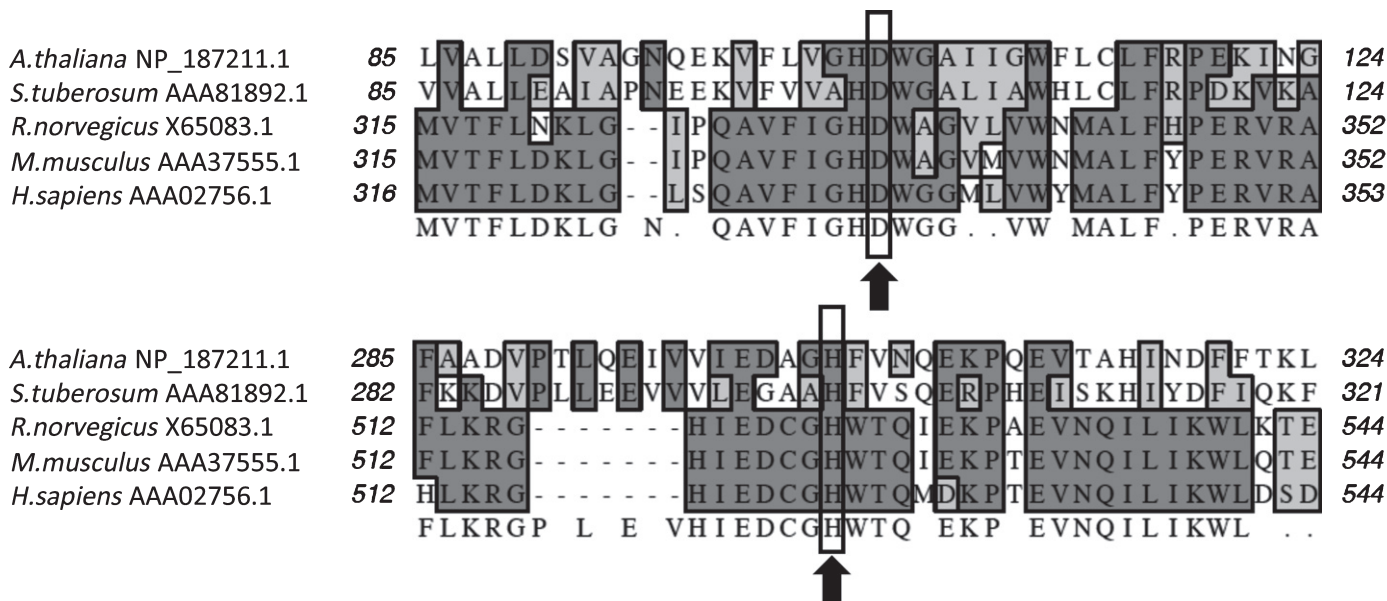


Fig. 1 CLUSTALW multiple alignment of the amino acid sequences of epoxide hydrolases (EHs) from *Arabidopsis thaliana* and other organisms. GenBank accession numbers are given. Conserved residues are framed. Catalytic amino acids identified in various characterized EHs, highlighted with arrows, are conserved in *EH1*.

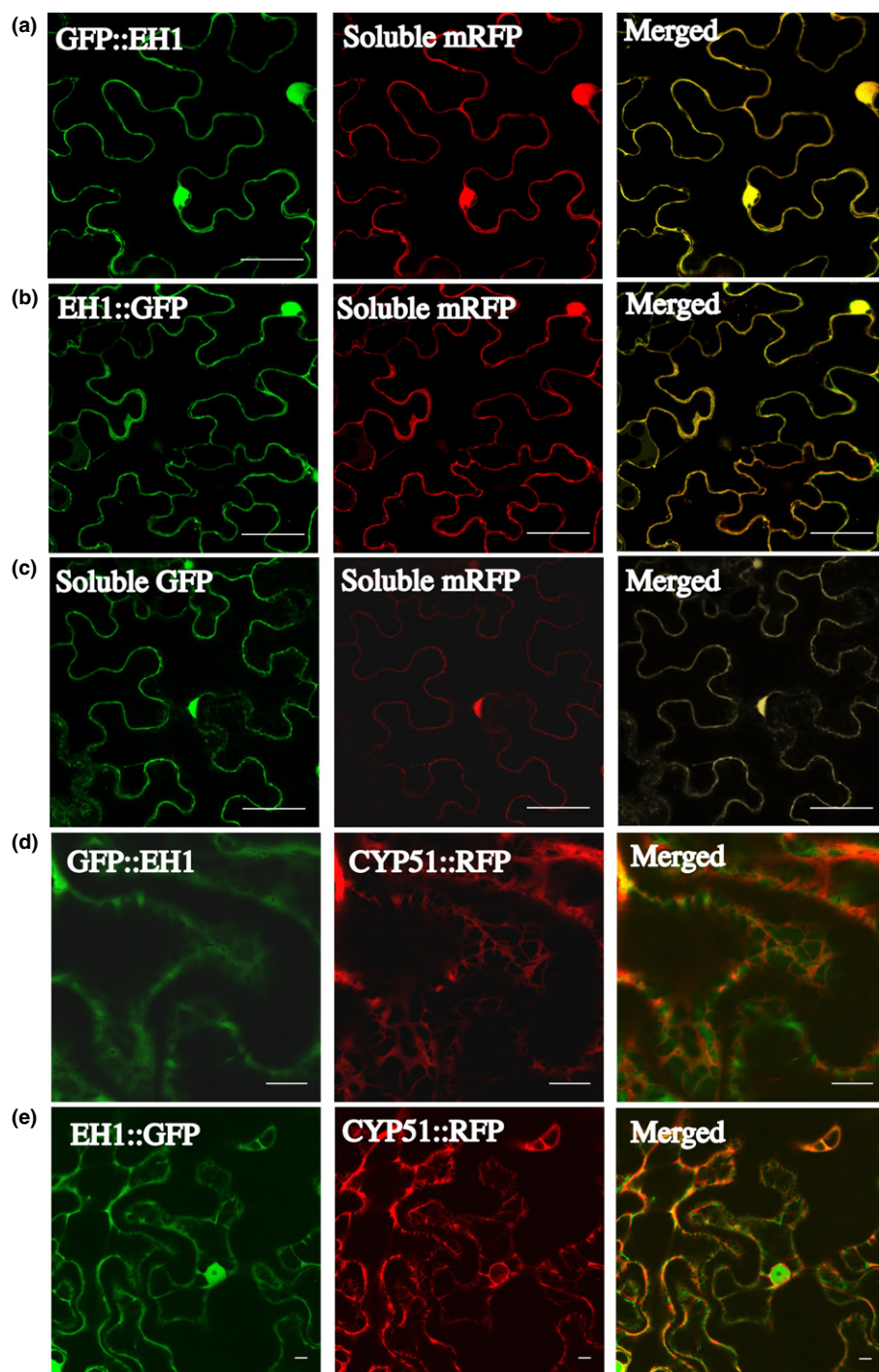


Fig. 2 Subcellular localization of *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1). Single section confocal images were collected 3 d after agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana* leaves. (a, d) AtEH1 N-terminally fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP) (GFP::EH1), (b, e) AtEH1 C-terminally fused to EGFP (EH1::GFP), and (c) EGFP alone. (a–c) Cytosol (soluble red fluorescent protein (RFP)) or (d, e) endoplasmic reticulum (CYP51::RFP) markers were concomitantly introduced. Bars, 10 μ M.

expressing AtEH1, and the reaction products were resolved by thin-layer radiochromatography (Fig. 4). Incubation was performed with the cytosolic fraction of yeast expressing AtEH1 (Fig. 4a), or with the cytosolic fraction of yeast transformed with an empty vector (Fig. 4b). After 20 min, a single major metabolite was formed (Fig. 4a, peak 1). It was not formed in an incubation with cytosol from yeast transformed with a void plasmid (Fig. 4b). Taken together, these results suggest that formation of the metabolite from peak 1 is attributable to the catalytic activity of AtEH1. Metabolite from this peak was purified, derivatized

and subjected to GC/MS analysis (see the Materials and Methods section). The mass spectrum of the derivatized metabolite 1 showed an ion at m/z (relative intensity; %) values of 73 (100%) ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$), 75 (24%) ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+ = \text{O}$), 443 ($M-31$) (loss of OCH₃ from methyl ester), 259 (65%) and 215 (66%) resulting from cleavage between two hydroxyls carrying the trimethylsilyl group generated after hydrolysis by the enzyme. This fragmentation pattern is characteristic of the derivative of 9,10-dihydroxystearic acid ($M = 474$). When the carboxyl function of 9,10-epoxystearic acid was blocked by a methyl, AtEH1 was

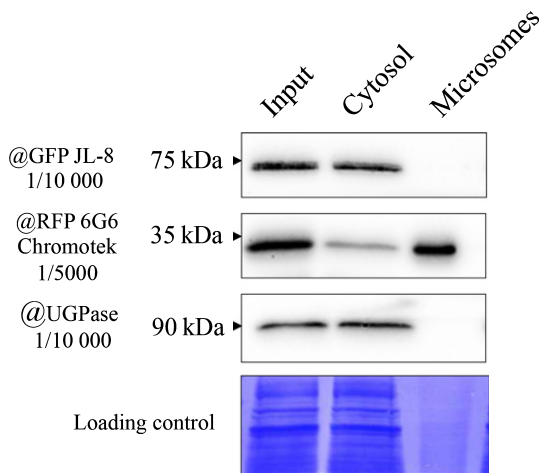
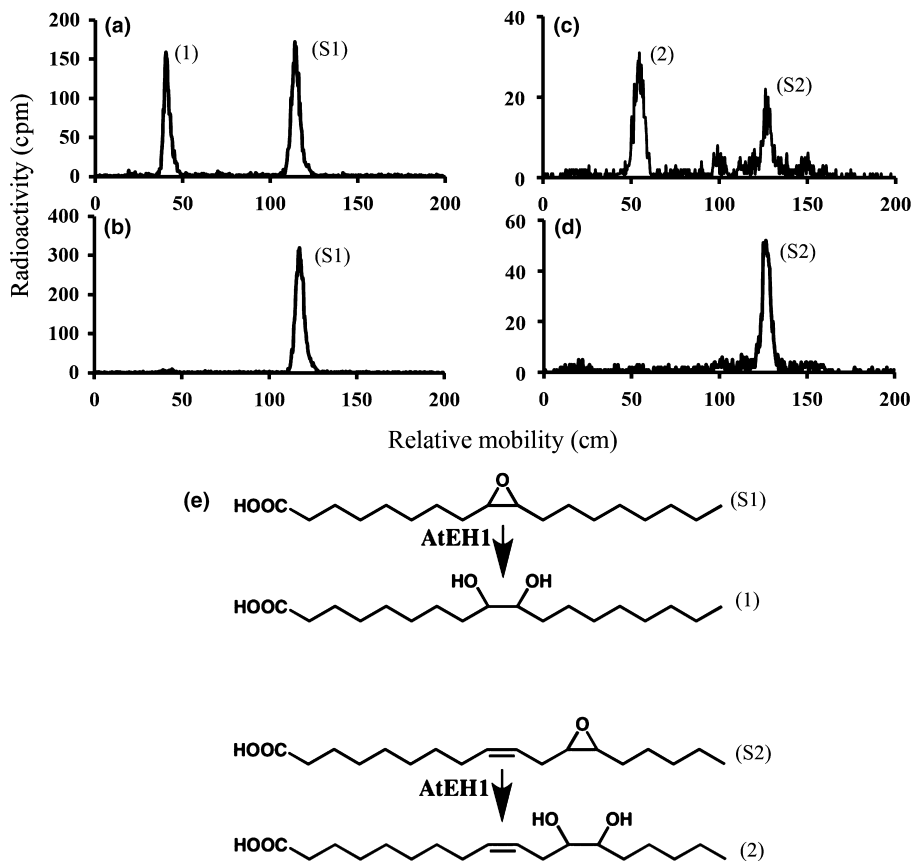


Fig. 3 Western blot analysis of *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1::green fluorescent protein (AtEH1::GFP) subcellular localization. Total cytosolic and microsomal proteins corresponding to 25 mg fresh weight of agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves were loaded and separated on a 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) gel and transferred to a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane. Lane 1, anti-GFP JL8; lane 2, anti-red fluorescent protein (RFP) 6G6; lane 3, anti-UGPase (Uridine glucose pyrophosphorylase; cytosol marker). A Coomassie blue-stained gel is shown as a loading control.

unable to catalyze the transformation of the epoxide to the corresponding diol (not shown). As shown in Fig. 4(c), a major polar metabolite (peak 2) was produced after incubation of 12,13-

Fig. 4 Radiochromatographic analysis by thin layer chromatography (TLC) of metabolites produced in incubations of 9,10-epoxystearic and 12,13-epoxyoctadec-9-enoic acids with cytosol from yeast expressing *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1). The cytosolic fraction (0.4 mg of proteins) was incubated with (a, b) 100 μ M [$1\text{-}^{14}\text{C}$] 9,10-epoxystearic acid or (c, d) 100 μ M [$1\text{-}^{14}\text{C}$] 12,13-epoxyoctadec-9-enoic acid at 27°C. Incubation was performed with (a, c) the cytosol of yeast expressing AtEH1 or (b, d) with the cytosol of yeast transformed with an empty vector. Reactions were stopped after 10 min by addition of 20 μ l of acetonitrile containing 0.2% acetic acid and directly spotted onto TLC developed in diethyl ether : light petroleum : formic acid (50 : 50 : 1, v/v/v). (a, b) Peak S1, 9,10-epoxystearic acid; peak 1, 9,10-dihydroxystearic acid. (c, d) Peak S2, 12,13-epoxyoctadec-9-enoic acid; peak 2, 12,13-dihydroxyoctadec-9-enoic acid. (e) Substrates and products: (S1) 9,10-epoxystearic acid; (1) 9,10-dihydroxystearic acid; (S2) 12,13-epoxyoctadec-9-enoic acid; (2) 12,13-dihydroxyoctadec-9-enoic acid.



epoxyoctadec-9-enoic acid (Fig. 4e), which is a product of a reaction catalyzed by CYP77A4 (Sauveplane *et al.*, 2009). This major polar metabolite was not produced with the cytosolic fraction of yeast transformed with an empty vector (Fig. 4d). The mass spectrum of this derivatized metabolite showed ions at m/z (relative intensity; %) values of 73 (100%) ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$) and 75 (28%) ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+ = \text{O}$). The mass spectrum also showed ions at 173 (60%) and 299 (22%) resulting from cleavage between two hydroxyls carrying the trimethylsilyl. This fragmentation pattern is characteristic of the derivative of 12,13-dihydroxyoctadec-9-enoic acid ($M = 472$). These data thus demonstrate that EH1 is an EH acting on 9,10-epoxystearic acid and on 12,13-epoxyoctadec-9-enoic acid.

No enzymatic activity was detected when incubations were performed with microsomes from transformed yeast, confirming the cytosolic localization of AtEH1 determined by confocal microscopy. Viability of microsomes was checked by measuring palmitic acid metabolism in microsomes of yeast transformed in parallel with a construct coding for CYP94C1 (Fig. S3).

AtEH1 is involved in the synthesis of C18 trihydroxy polyester monomers

In order to investigate the involvement of AtEH1 in cutin synthesis, we isolated T-DNA mutant lines homozygous for an insertion in *AtEH1* (Fig. S2a). In the insertional mutant lines *Ateh1-1* and *Ateh1-2*, transcripts were not detected when analyzed by RT-PCR (Fig. S2b), which confirmed that they were *ko* lines. The

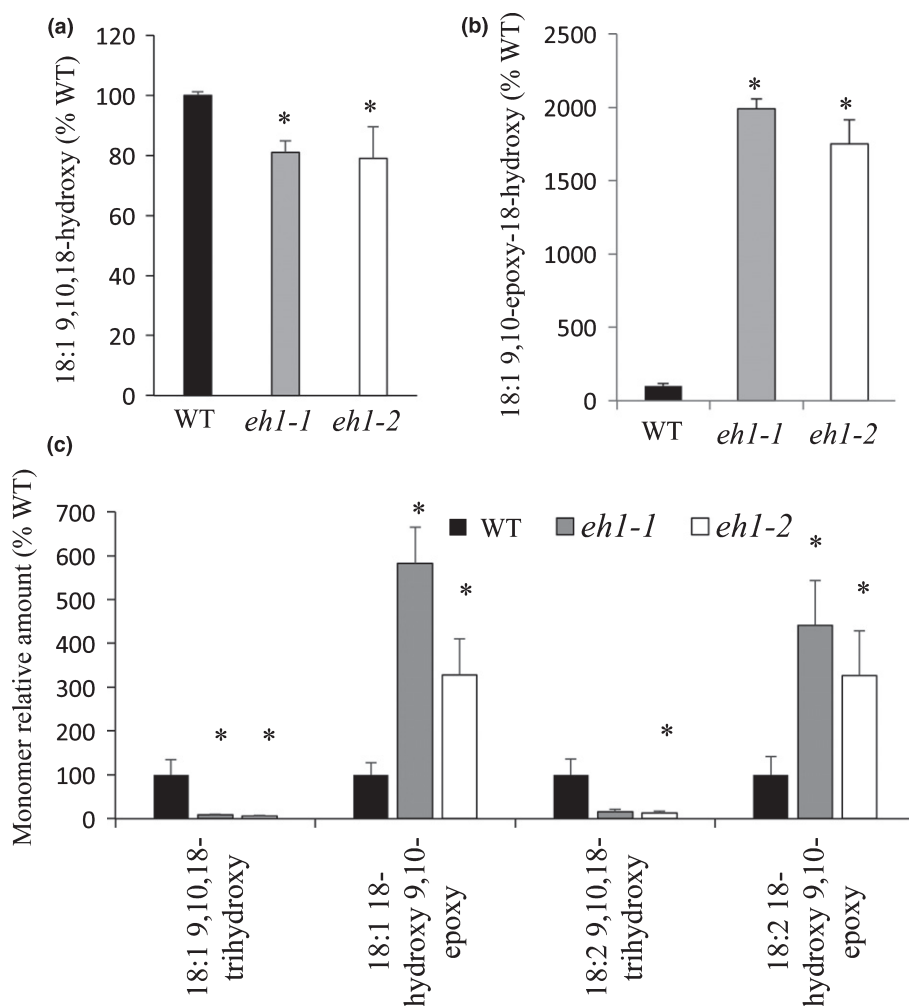


Fig. 5 Relative amounts of C18 epoxy and trihydroxy monomers in seeds and leaves of epoxide hydrolase1 (*eh1*) mutants. Relative amounts in seeds of (a) 18:1 9,10,18-hydroxy and (b) its expected precursor 18:1 9,10-epoxy-18-hydroxy. (c) Relative amounts in leaves of 18:1 and 18:2 9,10,18-trihydroxy monomers and their expected precursors (18-hydroxy-9,10-epoxy). Monomer amounts were determined relative to wild type (WT) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of derivatized cutin monomers prepared from seeds and leaves. The position of the epoxy was determined in a separate analysis of the free fatty acid monomers (see the Materials and Methods section). Data are means of three independent measurements. Asterisks (*) indicate statistically different from WT.

spatiotemporal pattern of *AtEH1* expression investigated by RT-PCR revealed very low expression in all the organs tested (Fig. S4). Publicly available *A. thaliana* transcriptome data sets (bar.utoronto.ca) showed higher expression of *AtEH1* in seeds (both seed coat and embryos) and to a lesser extent in some parts of flowers, which was corroborated by data from Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008). We therefore first analyzed the composition and content of polyesters in whole mature seeds of these *ko* lines by GC-MS. The only significant difference between *ko* and WT lines in the seed FA cutin monomers was a 20% reduction in 9,10,18-trihydroxy-octadecenoic acid in *ko* (Figs 5a, S5). Because small amounts of a putative epoxy FA could be detected on the GC chromatogram of *ko*, we decided to set up a more sensitive method based on LC-MS/MS to analyze the monomer extracts (see the Materials and Methods section). Analysis by this method revealed in *ko* a striking increase in the expected derivative for a C18:1 hydroxy-epoxy FA (Fig. 5b). In order to obtain information on the position of the epoxy group in this monomer, free fatty monomers with unopened epoxy rings were prepared from cell walls of WT and *ko* seeds digested with cutinase from *F. solani*, and were analyzed by LC-MS/MS. Based on exact mass, one C18:1 hydroxy-epoxy free FA monomer abundant in *ko* could be detected (Fig. S6). Its fragmentation pattern was

consistent with an 18-hydroxy-9,10-epoxyoctadecenoic acid, the expected precursor for a 9,10,18-trihydroxy-octadecenoic acid.

Analysis of leaf cutin monomers by LC-MS/MS allowed us to show that disruption of the gene coding for *AtEH1* led to an almost complete disappearance of 9,10,18-trihydroxy-octadecenoic acid and to a concomitant strong accumulation of the peak identified in seeds as 18-hydroxy-9,10-epoxyoctadecenoic acid (Fig. 5c). A 80% decrease in the other minor leaf monomer 9,10,18-trihydroxy-octadecadienoic acid with an accumulation of the corresponding 18-hydroxy-9,10-epoxyoctadecadienoic acid was also noted.

Seeds of *Ateh1* show delayed germination under hyperosmotic conditions and a higher permeability to dye

To investigate the function of *AtEH1* in seed physiology, we analyzed seed germination rates under standard and hyperosmotic conditions. Seeds of *Ateh1* were sown on MS medium in the absence or presence of mannitol (500 mM). On standard MS medium, seeds of *Ateh1* and WT lines both germinated at the same rate (Fig. 6a). Under stress conditions, germination of *Ateh1* seeds was delayed compared with WT seeds: after 2.5 d on MS, only 50% of *Ateh1* seeds had germinated when practically

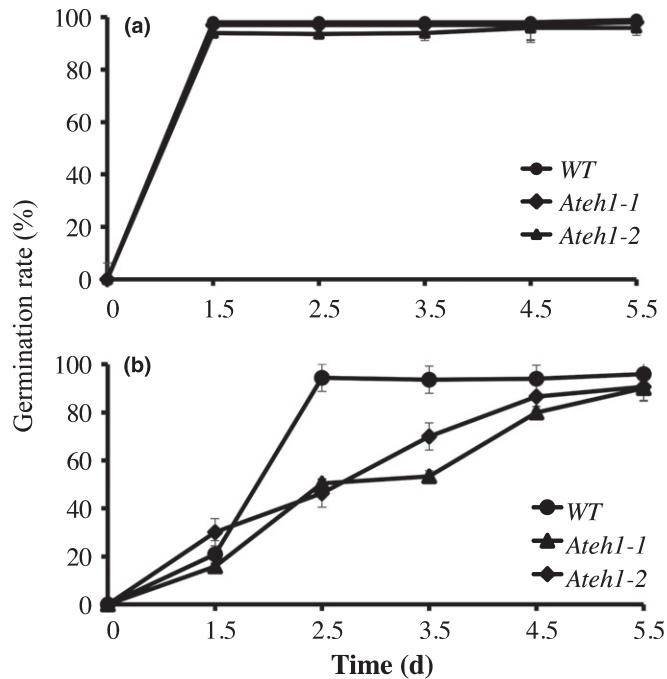


Fig. 6 Effect of osmotic stress on seed germination rate. Seeds of wild type or *Arabidopsis thaliana* epoxide hydrolase1 (*Ateh1*) were sown on (a) Murashige and Skoog (MS) medium or (b) MS medium supplemented with 500 mM mannitol. Germination rate was measured at different times after sowing. Data are means of three independent replicates, each of them performed with 200–300 seeds.

all WT seeds had germinated (Fig. 6b). This delay was not more visible after 5.5 d (Fig. 6b). To investigate the impact of *AtEH1* gene disruption on seed coat properties, the permeability of the seed coat of the mutants was studied using tetrazolium salt. As shown in Fig. 7, after staining for 24 h, *Ateh1-1* and *Ateh1-2* seed coats were significantly more permeable (Fig. 7b,c) to dye than were WT seed coats (Fig. 7a).

Evolutionary history of the EH family in land plants

EHs are widely distributed proteins, found in all kingdoms (Morisseau, 2013). We endeavored to reconstruct their evolutionary history in embryophytes to determine whether family diversification occurred in the course of land colonization. A set of 132 sequences derived from 43 land plant species, from bryophytes to angiosperms, were retrieved from genome and transcriptome databases based on their homology to the *AtEH1* protein. Already characterized EH sequences from mouse, human and rat were used as an outgroup to polarize the evolutionary scenario. The EH phylogeny overall matched systematics but also uncovered family diversification in recent phylogenetic groups (Fig. 8). Seven genes potentially encoding EHs are, for instance, present in *A. thaliana* (angiosperms) while only a single gene was found in the fully sequenced *Picea abies* genome (gymnosperms). Tree structure, however, suggests that an early duplication arose in the ancestor of seed plants, but one duplicate was lost in gymnosperms while being retained in angiosperms (the

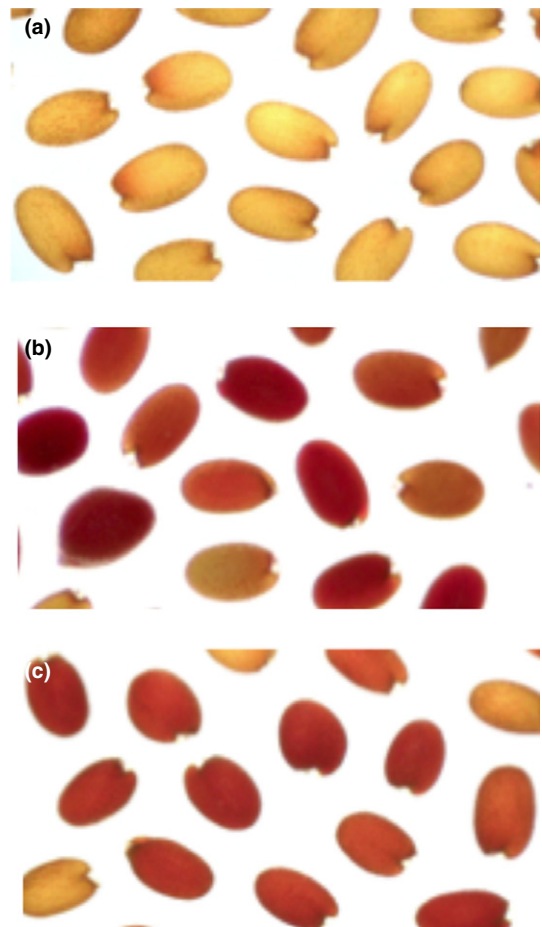


Fig. 7 Tetrazolium salt staining (24 h) of wild type versus *Arabidopsis thaliana* epoxide hydrolase1 (*Ateh1*) seeds. (a) Wild type; (b) *Ateh1-1*; (c) *Ateh1-2*.

AtEH6 clade). In the early-diverging land plants bryophytes and lycophytes, EH was typically present as a single-copy gene, as observed in the *Physcomitrella patens*, *Marchantia polymorpha* and *Selaginella moellendorffii* genomes (Fig. 8). Taken together, these observations indicate that EH proteins were conserved across land plant evolution and diversified in angiosperms, probably in support of the increased complexity of reproductive tissues.

Discussion

Despite a first description of EHs about four decades ago in the context of cutin synthesis (Croteau & Kolattukudy, 1975b), the physiological role of EHs in plants remains unknown. Subsequent purification and characterization of a soluble EH from soybean (Blée & Schuber, 1992) as well as cloning of soluble EHs from potato (Stapleton *et al.*, 1994) and *A. thaliana* (Kiyosue *et al.*, 1994), did not determine enzyme function, in particular whether EHs participate in cutin synthesis as suggested by Croteau & Kolattukudy (1975a,b).

To further investigate this role, we focused on the gene product of *At3g05600* annotated as a putative EH in TAIR (www.arabidopsis.org). This gene is coexpressed with *CYP77A4* from *A.*

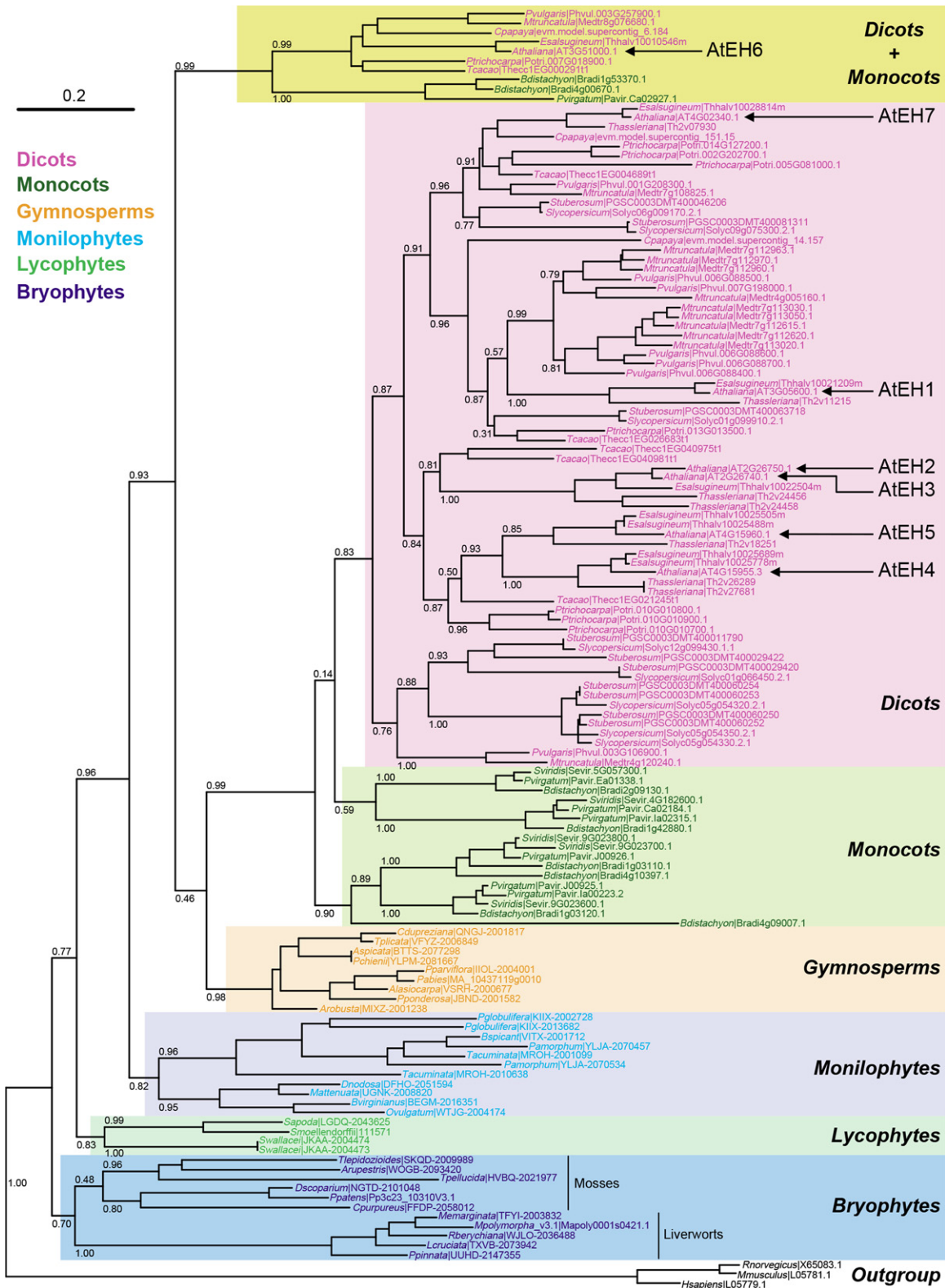


Fig. 8 Evolutionary history of the epoxide hydrolase (EH) protein family. A protein maximum likelihood tree depicting the phylogenetic relationships among the EH protein family is presented. The tree was built using 132 sequences derived from 43 species. Mouse, rat and human EHs were used as an outgroup. Phylogeny consistency was tested using approximate likelihood ratio tests (indicated on main branches). The bar indicates the number of substitutions per site.

thaliana, previously described as a gene coding for an FA epoxygenase (Sauveplane *et al.*, 2009). It is noteworthy that another member of this subfamily, CYP77A6 (Li-Beisson *et al.*, 2009), is involved in cutin synthesis. EHs belong to the α/β -hydrolase fold family of proteins and share a catalytic triad consisting of conserved amino acids (Morisseau & Hammock, 2005). We showed here by protein sequence analysis that AtEH1 contains this same conserved catalytic triad. This analysis also revealed that the N-terminal domain of mammalian enzymes carrying magnesium phosphatase activity (Newman *et al.*, 2003) is missing in AtEH1, in agreement with previous reports describing plant EHs (Mowbray *et al.*, 2006). As shown earlier (Fig. 1), AtEH1 possesses catalytic residues present in EHs from different origins, in particular from animals, suggesting a conserved catalytic mechanism. However, in a comparison study, Morisseau *et al.* (2000) showed that cytosolic EHs from *A. thaliana* and from potato displayed a pattern of inhibition different from mammalian enzymes. This probably reflects different substrate specificities, confirmed by X-ray studies performed on the potato enzyme (Mowbray *et al.*, 2006) which revealed that plant EHs might be very efficient in metabolizing substrates with aliphatic substituents of the epoxide ring. Conversion of 9,10-epoxystearic and 12,13-epoxyoctadec-9-enoic acids to their corresponding vicinal diols by recombinant AtEH1 confirmed this and allowed us to define AtEH1 as a new EH. Interestingly, both substrates are products of the reactions catalyzed by CYP77A4 (Sauveplane *et al.*, 2009), suggesting that AtEH1 and CYP77A4 might be involved in the same pathway. Furthermore, the chemical nature of the metabolized substrates (derivatives of FAs) supports the hypothesis of an involvement in cutin biosynthesis. The expression pattern of *AtEH1* determined by RT-PCR (Fig. S4) revealed its expression in all organs tested (leaves, sepals, petals, pistils and siliques), also consistent with a role in the synthesis of cutin, which covers these aerial parts of plants (Pollard *et al.*, 2008).

Enzymes involved in cutin synthesis often belong to families exhibiting very similar or redundant catalytic capabilities; for example, there are five CYP86As and eight Glycerol phosphate acyltransferases (GPATs) in *A. thaliana*. Despite these apparent redundancies, enzymes participating in cutin synthesis were previously identified based on analysis of *A. thaliana* mutants. For example, *A. thaliana* mutants carrying a modification in the coding sequence of CYP77A6 (Li-Beisson *et al.*, 2009) or in GPAT4 and GPAT8 (Li *et al.*, 2007) showed significant modification in the composition or content of the biopolyester compared with the WT. Cutin analysis in loss-of-function *Ateh1* mutants described here demonstrates the involvement of AtEH1 in this protective biopolyester synthesis. More precisely, in the leaves of these mutants, the amount of 9,10,18-trihydroxy-octadecenoic acid was drastically decreased compared with the WT and 18-hydroxy-9,10-epoxyoctadecenoic acid concomitantly accumulated. In seeds, the small reduction in the cutin monomer 9,10,18-trihydroxy-octadecenoic acid was accompanied by a 20-fold increase in the corresponding epoxide. These observations are in agreement with catalytic capabilities of AtEH1 determined *in vitro*.

The presence of a wide array of monomers in the cutin of *A. thaliana*, c. 30 FA derivatives (Franke *et al.*, 2005), reflects the complexity of the biosynthetic process (substrates and enzymes) involved. Key enzymes (cytochrome P450s, GPATs and long-chain acyl-CoA synthetase (LACS) in this pathway are localized in the ER. As reviewed by Pollard *et al.* (2008), reactions catalyzed by these enzymes (ω -hydroxylation, activation to CoA and acyl transfer, respectively) might be ordered in different ways to produce ω -hydroxylated-acylglycerols, the basic element of glycerolipid polyesters. Biochemical characterization of GPAT activity has shown that these acyltransferases are likely to act after the ω -hydroxylase P450s (Yang *et al.*, 2010). AtEH1 identified in this work is an additional enzyme which might also enter the various pathways at different points. Indeed, biochemical investigations performed with *Vicia sativa* (Pinot *et al.*, 1992) showed that 9,10,18-trihydroxystearic acid could be generated either through the ω -hydroxylation of the corresponding diol or via the hydrolysis of the oxiran ring of the epoxy-hydroxy derivative, meaning that the EH in question could act before or after the ω -hydroxylase cytochrome P450-dependent enzyme. The nature of the *in vivo* substrate of AtEH1 (i.e. free FA, FA activated with CoA or FA linked to glycerol) still remains to be established. In this context, our finding that the methyl ester of 9,10-epoxystearic acid was not an efficient substrate strongly suggests that a free FA rather than an esterified FA (glycerolipid or acyl-CoA) is the natural substrate. This raises the question of how such an aliphatic molecule can be a substrate for a cytosolic enzyme; it also raises the question of the location of the cutin monomer biosynthetic pathway. AtEH1 described here, as well as DCR (belonging to a family of acyltransferases, Defective in Cuticular Ridges) which is also involved in cutin synthesis (Panikashvili *et al.*, 2009), is located in the cytosol. Furthermore, GPATs (Yang *et al.*, 2012) and cytochrome P450s (Bassard *et al.*, 2012) have their active sites facing the cytosol. This strongly suggests that cutin monomer biosynthesis occurs in the cytosol. Protein–protein and protein–membrane interactions must be of primary importance for synthesis of cutin monomers. Such interactions are characteristic of metabolons, which are complexes of sequential metabolic enzymes (Srere, 1985). In plant metabolism, cytochrome P450s have been proposed to be involved in nucleation of metabolons and also to interact with cytosolic proteins, which are then partially associated with the ER (Ralston & Yu, 2006; Bassard *et al.*, 2012). These interactions are facilitated because the ER is dynamic and constantly being remodeled (Griffing, 2010). AtEH1 might participate in the synthesis of cutin monomers via such an interaction, which would relocalize it closer to the ER.

Epoxides and corresponding vicinal diols of C18 FAs can be major components of plant cutins and suberins (Holloway & Deas, 1973). For example, 18-hydroxy-9,10-epoxyoctadecanoic and 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acids represent c. 50% and 4%, respectively, of cutin monomers in the cutin of the wheat (*Triticum aestivum*) caryopse (Matzke & Riederer, 1990). In *A. thaliana*, epoxyhydroxy FAs have been suggested to be present in very minor proportions in polyesters compared with ω -hydroxyacids and α,ω -dicarboxylic acids (Bonaventure *et al.*,

2004). We have shown here that they are indeed present in seed and leaf polyesters and we have identified an EH involved in their conversion to trihydroxy FAs. The role of biopolyesters in plants as barriers to control the movement of water, solutes and gases is well documented (Pollard *et al.*, 2008; Schreiber, 2010; Nawrath *et al.*, 2013; Barberon *et al.*, 2016). The delay of germination of seeds of *ko* lines for AtEH1 in osmotic stress conditions observed in the present report (Fig. 6) could result from a modification of the polyester layers present in the seed coat integuments (Molina *et al.*, 2008), the embryo (Moussu *et al.*, 2013) and/or the endosperm (De Giorgi *et al.*, 2015). It should be also noted that the change could be caused by the decrease in trihydroxy FAs or the accumulation of the epoxy FAs. An increase in cuticle permeability in transgenic *A. thaliana* plants with increased polyester content has been noted before (Li *et al.*, 2007). The hypothesis that the seed coat/endosperm polyesters are affected is strengthened by the observation that the permeability of *Ateh1* seeds is increased compared with WT (Fig. 7). However, despite the almost complete disappearance of 9,10,18-trihydroxy-octadecenoic acid in leaf cutin caused by disruption of the gene coding for AtEH1, we did not notice any modification in water or in toluidin blue permeability (data not shown). Cutin composition varies among organs and species (Fich *et al.*, 2016) and leaf cutin mainly contains the dicarboxylic acid form of C18:2 (Yang *et al.*, 2016), and therefore 9,10,18-trihydroxy-octadecenoic acid might not be essential for leaf cutin properties. Alteration of biopolymer composition without an effect on permeability has already been observed (Compagnon *et al.*, 2009). These results show that what drives biopolyester properties as barriers is a complex process requiring further investigation.

The architecture of cutin is built upon hydroxy FAs bound together via ester bonds. After chemical labeling of free or esterified hydroxyls, cutin of different plants was analyzed and the results show that practically all primary hydroxyls are esterified (Deas & Holloway, 1977; Kolattukudy, 1977). This is in agreement with proposed cutin models (Kolattukudy, 1981; Pollard *et al.*, 2008; Fich *et al.*, 2016). Secondary hydroxyls carried by C16 monomers are also involved in secondary ester bonds (Deas & Holloway, 1977; Kolattukudy, 1977). Graça & Lamosa (2010), using ESI-MS/MS (electrospray ionization) followed by one- (1D) and two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) techniques, studied and compared C16 and C18 monomer-enriched cutin or cutin made up of a mixture of C16 and C18. Their work showed that cutin is constructed of linear chains when enriched in C18, or forms a highly branched network when C16 is dominant. Solid-state NMR studies highlight the rigidity in cutin resulting from secondary esters in this branched network (Zlotnik-Mazori & Stark, 1988; Garbow & Stark, 1990). Similar to C16 monomers carrying in-chain hydroxyls, C18 vicinal diols produced by AtEH1 might participate in cutin reinforcement by forming secondary ester bonds.

In the present work, we identified AtEH1 and demonstrated its role in cutin biosynthesis. AtEH1 represents a new tool that can be used to understand the barrier properties of cutin and, through manipulation of AtEH1 expression, we will continue to investigate the effects of cutin modifications on both plant

development and plant resistance to biotic and abiotic stress. The biochemical characterization of other members of this family is in progress. Interestingly, in the seed cutin of the knockout mutant, 9,10,18-trihydroxy-octadecenoic acid was decreased by only 20% compared with the WT, suggesting that another EH(s) is involved in the formation of this monomer. Thus, it will be interesting to determine which other EH(s) has a role in cutin synthesis.

Acknowledgements

E.P. was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. French Agence Nationale pour la Recherche (Contract BIOEPOXY ANR-12-BSV5-0024-02 to F.B. and F.P.) provided post-doctoral fellowships to G.V. and L.X. H.R. acknowledges the support of the French Agence Nationale pour la Recherche for the PHENOWALL ANR-10-BLAN-1528 project. F.B. also thanks the European Union Regional Developing Fund (ERDF), the Région Provence Alpes Côte d'Azur, the Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche (French Ministry of Research) and the CEA for funding the LC-MS/MS equipment of the HélioBiotec platform.

Author contributions

E.P., L.X., F.B., H.R. and F.P. conceived, planned and designed the research. E.P., N.N. and P.U. conducted cloning and heterologous expression of AtEH1. E.P., A.T. and H.R. performed sub-cellular localization in confocal experiments. L.X. and G.V. isolated the loss-of-function mutants. L.X. and B.L. prepared and analyzed cutin. H.R. performed the phylogenetic analysis. F.P. wrote the manuscript which was subsequently edited by F.B., H.R. and N.N.

References

- Anisimova M, Gascuel O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology* 55: 539–552.
- Arahira M, Nong VH, Udaka K, Fukasawa C. 2000. Purification, molecular cloning and ethylene-inducible expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *European Journal of Biochemistry* 267: 2649–2657.
- Barberon M, Vermeer JE, De Bellis D, Wang P, Naseer S, Andersen TG, Humbel BM, Nawrath C, Takano J, Salt DE *et al.* 2016. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell* 164: 447–459.
- Bassard JE, Mutterer J, Duval F, Werck-Reichhart D. 2011. A novel method for monitoring the localization of cytochromes P450 and other endoplasmic reticulum membrane associated proteins: a tool for investigating the formation of metabolons. *FEBS Journal* 279: 1576–1583.
- Bassard JE, Richert L, Geerinck J, Renault H, Duval F, Ullmann P, Schmitt M, Meyer E, Mutterer J, Boerjan W *et al.* 2012. Protein–protein and protein–membrane associations in the lignin pathway. *Plant Cell* 24: 4465–4482.
- Beisson F, Li-Beisson Y, Pollard M. 2012. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 1–9.
- Bernards MA. 2002. Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80: 227–240.

- Blée E, Schuber F. 1992. Occurrence of fatty acid epoxide hydrolases in soybean (*Glycine max*). Purification and characterization of the soluble form. *Biochemical Journal* 282: 711–714.
- Bonaventure G, Beisson F, Ohlrogge J, Pollard M. 2004. Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with Arabidopsis epidermis: occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1,18-dioate as the major component. *Plant Journal* 40: 920–930.
- Bradshaw RE, Zhang S. 2006. Biosynthesis of dothistromin. *Mycopathologia* 162: 201–213.
- Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552.
- Compagnon V, Diehl P, Benveniste I, Meyer D, Schaller H, Schreiber L, Franke R, Pinot F. 2009. CYP86B1 is required for very long chain w-hydroxyacid and a, b-dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant Physiology* 150: 1831–1843.
- Croteau R, Kolattukudy PE. 1975a. Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers. Enzymatic epoxidation of 18-hydroxyoleic acid to 18-hydroxy-cis-9,10-epoxystearic by a particulate preparation from spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 170: 61–72.
- Croteau R, Kolattukudy PE. 1975b. Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers. Enzymatic hydration of 18-hydroxy-cis-9,10-epoxystearic acid to three 9,10,18-trihydroxystearic acid by a particulate preparation from apple (*Malus pumila*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 170: 72–81.
- De Giorgi J, Piskurewicz U, Loubery S, Utz-Pugin A, Bailly C, Mène-Saffrané L, Lopez-Molina L. 2015. An endosperm-associated cuticle is required for Arabidopsis seed viability, dormancy and early control of germination. *PLoS Genetics* 17: e1005708.
- Deas AH, Holloway PJ. 1977. The intermolecular structure of some plant cutins. In: Tevini M, Lichtenthaler HK, eds. *Lipids and lipids polymer in higher plants*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 293–299.
- Dominguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A. 2015. Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends in Plant Science* 20: 551–558.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Eglinton G, Hunneman D, McCormick A. 1968. Gas chromatography-mass spectrometry studies of long-chain hydroxy acids III. The mass spectra of the methyl esters TMS ethers of aliphatic hydroxy acids. A facile method of double bond location. *Organic Mass Spectrometry* 1: 593–611.
- Ehltling J, Sauveplane V, Olry A, Ginglinger J-F, Provart NJ, Werck-Reichhart D. 2008. An extensive (co)-expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 8: 47.
- Fernandez V, Guzman-Delgado P, Graça J, Santos S, Gil L. 2016. Cuticle structure in relation to chemical composition: re-assessing the prevailing model. *Frontiers in Plant Science* 7: 427.
- Fich EA, Segerson NA, Rose JKC. 2016. The plant polyester cutin: biosynthesis, structure and biological roles. *Annual Review of Plant Biology* 67: 207–233.
- Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L. 2005. Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues. A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66: 2643–2658.
- Garbow JR, Stark RE. 1990. Nuclear magnetic relaxation studies of plant polyester dynamics. 1. Cutin from limes. *Macromolecules* 23: 2814–2819.
- Gomi K, Yamamoto H, Akimitsu K. 2003. Epoxide hydrolase: a mRNA induced by the fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush). *Plant Molecular Biology* 53: 189–199.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221–224.
- Graça J, Lamosa P. 2010. Linear and branched poly(w-hydroxyacid) esters in plant cutins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9666–9674.
- Graça J, Schreiber L, Rodrigues J, Pereira H. 2002. Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* 61: 205–215.
- Griffing LR. 2010. Networking in the endoplasmic reticulum. *Biochemical Society Transaction* 38: 747–753.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307–321.
- Holloway PJ, Deas AHB. 1973. Epoxyoctadecanoic acids in plant cutins and suberins. *Phytochemistry* 12: 1721–1735.
- Hordijk W, Gascuel O. 2005. Improving the efficiency of SPR moves in phylogenetic tree search methods based on maximum likelihood. *Bioinformatics* 21: 4338–4347.
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P. 2008. Genevestigator V3: a reference expression database for the Meta-analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 2008: article ID 420747.
- Jakobson L, Lindgren LO, Verdier G, Laanemets K, Brosché M, Beisson F, Kollist H. 2016. BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in Arabidopsis. *New Phytologist* 211: 614–626.
- Kandel S, Sauveplane V, Compagnon V, Franke R, Millet Y, Schreiber L, Werck-Reichhart D, Pinot F. 2007. Characterization of a methyl jasmonate and wounding responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation *in vitro*. *FEBS Journal* 274: 5116–5127.
- Kiyosue T, Beetham JK, Pinot F, Hammock BD, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. Isolation and characterization of a cDNA that encodes a soluble epoxide hydrolase from *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Journal* 6: 259–269.
- Kolattukudy PE. 1977. Lipid polymers and associated phenols, their chemistry, biosynthesis, and role in pathogenesis. *Recent Advances in Phytochemistry* 77: 185–246.
- Kolattukudy PE. 1981. Structure, Biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology* 32: 539–567.
- Kolattukudy PE. 2001. Polyesters in higher plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 71: 1–49.
- Le SQ, Gascuel O. 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1307–1320.
- Li Y, Beisson F, Koo AJB, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J. 2007. Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 18339–18344.
- Li-Beisson Y, Pollard M, Sauveplane V, Pinot F, Ohlrogge J, Beisson F. 2009. Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 22008–22013.
- Ma F, Peterson CA. 2003. Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany* 81: 405–421.
- Matzke K, Riederer M. 1990. The composition of the cutin of the caryopses and leaves of *Triticum aestivum* L. *Planta* 182: 461–466.
- Minami M, Ohno S, Kawasaki H, Radmark O, Samuelsson B, Jörnvall H, Shimizu T, Seyama Y, Suzuki K. 1987. Molecular cloning of a cDNA coding for human leukotriene A4 hydrolase. Complete primary structure of an enzyme involved in eicosanoid synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 262: 13873–13876.
- Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M. 2008. Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 53: 437–449.
- Morisseau C. 2013. Role of epoxide hydrolase in lipid metabolism. *Biochimie* 95: 91–95.
- Morisseau C, Beetham JK, Pinot F, Debernard S, Newman JW, Hammock BD. 2000. Cress and potato soluble epoxide hydrolases: purification, biochemical characterization and comparison to mammalian enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378: 321–332.
- Morisseau C, Hammock BD. 2005. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 311–333.
- Moussu S, San-Bento R, Galletti R, Creff A, Farcot E, Ingram G. 2013. Embryonic cuticle establishment: the great (apoplastic) divide. *Plant Signaling and Behavior* 8: e27491.
- Mowbray SL, Elfström LT, Ahlgren KM, Andersson CE, Widersten M. 2006. X-ray structure of potato epoxide hydrolase sheds light on substrate specificity in plant enzymes. *Protein Science* 15: 1628–1637.
- Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L. 2013. Apoplastic diffusion barriers in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* 11: e0167.

- Newman JW, Morisseau C, Harris TR, Hammok BD. 2003. The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100: 1558–1563.
- Pace-Asciak CR, Lee WS. 1989. Purification of hepoxilin epoxide hydrolase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 264: 9310–9313.
- Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, Aharoni A. 2009. The Arabidopsis DCR encoding a soluble BAHD Acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. *Plant Physiology* 151: 1773–1789.
- Petersen SB, Jonson PH, Fojan P, Petersen EI, Neves-Petersen MT, Hansen S, Ishak RJ, Hough E. 1998. Protein engineering the surface of enzymes. *Journal of Biotechnology* 66: 11–26.
- Pinot F, Bosch H, Salaün J-P, Durst F, Mioskowski C, Hammock BD. 1997. Epoxide hydrolase activities in the microsomes and the soluble fraction from *Vicia sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 35: 103–110.
- Pinot F, Grant DF, Beetham J, Parker AG, Bohran B, Landt S, Jones AD, Hammock BD. 1995. Molecular and biochemical evidence for the involvement of the Asp-333-His-523 pair in the catalytic mechanism of soluble epoxide hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* 270: 7968–7974.
- Pinot F, Salaün J-P, Bosch H, Lesot A, Mioskowski C, Durst F. 1992. ω -hydroxylation of Z⁹-octadecenoic, Z⁹,10-epoxystearic and 9,10-dihydroxystearic acids by microsomal cytochrome P450 systems from *Vicia sativa*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 184: 183–193.
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* 13: 236–246.
- Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P. 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology* 272: 51–64.
- Ralston L, Yu O. 2006. Metabolons involving plant cytochrome P450. *Phytochemical Review* 5: 459–472.
- Sadler C, Schroll B, Zeisler V, Wassmann F, Franke R, Schreiber L. 2016. Wax and cutin mutants of Arabidopsis: quantitative characterization of the cuticular transport barrier in relation to chemical composition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1861: 1336–1344.
- Sauveplane V, Kandel S, Kastner PE, Ehlting J, Compagnon V, Werck-Reichhart D, Pinot F. 2009. Arabidopsis thaliana CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants. *FEBS Journal* 276: 719–735.
- Schreiber L. 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* 15: 546–553.
- Shamloul M, Trusa J, Mett V, Yusibov V. 2014. Optimization and utilization of Agrobacterium-mediated transient protein production in *Nicotiana*. *Journal of Visualized Experiments* 86: e51204.
- Silvente-Poirot S, Poirot M. 2012. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current Opinion In Pharmacology* 12: 693–703.
- Srere PA. 1985. The metabolon. *Trends Biochemical Sciences* 10: 109–110.
- Stapleton A, Beetham JK, Pinot F, Garbarino JE, Rockhold DR, Hammock BD, Belknap WR. 1994. Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from potato. *Plant Journal* 6: 251–258.
- Van der Werf MJ, Swarts HJ, de Bondt JA. 1999. Rhodococcus erythropolis DCL14 contains a novel degradation pathway for limonen. *Applied Environmental Microbiology* 65: 2092–2102.
- Wellesen K, Durst F, Pinot F, Benveniste I, Nettesheim K, Wisman E, Steiner-Lange S, Saedler H, Yephremov A. 2001. Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid ω -hydroxylation in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 9694–9699.
- Wijekoon CP, Goodwin PH, Hsiang T. 2008. The involvement of two epoxide hydrolase genes, *NbEH1.1* and *NBEH1.2*, of *Nicotiana benthamiana* in the interaction with *Colletotricum destructivum*, *Colletotricum orbiculare* or *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Functional Plant Biology* 35: 1112–1122.
- Wixtrom RN, Hammock BD. 1985. Methodological aspects of drug metabolizing enzymes. In: Zakim D, Vessey DA, eds. *Biochemical pharmacology and toxicology, vol. 1*. New York, NY: John Wiley & Sons, 1–93.
- Yang W, Pollard M, Li-Beisson Y, Feig M, Ohlrogge J. 2010. A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 12040–12045.
- Yang W, Pollard M, Li-Beisson Y, Ohlrogge J. 2016. Quantitative analysis of glycerol in dicarboxylic acid-rich cutins provides insights into Arabidopsis cutin structure. *Phytochemistry* 130: 159–169.
- Yang W, Simpson JP, Li-Beisson Y, Beisson F, Pollard M, Ohlrogge JB. 2012. A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in Arabidopsis: substrate specificity, sn-2 preference, and evolution. *Plant Physiology* 160: 638–652.
- Zlotnik-Mazori T, Stark RE. 1988. Nuclear magnetic-resonance studies of cutin, an insoluble plant polyester. *Macromolecules* 21: 2412–2417.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information tab for this article:

Fig. S1 Proposed pathway leading from 18-hydroxyoleic acid to 9,10,18-trihydroxystearic acid (Croteau & Kolattukudy, 1975a,b).

Fig. S2 AtEH1 locus and mutant verification.

Fig. S3 Radiochromatographic analysis by TLC of metabolites produced in incubations of palmitic acid with microsomes of yeast expressing CYP94C1.

Fig. S4 AtEH1 gene expression in organs of *Arabidopsis thaliana*.

Fig. S5 Composition of seed polyesters in *Ateh1*.

Fig. S6 MS/MS spectrum of a fatty acid compound with an exact mass corresponding to a C18:1 hydroxy-epoxy free fatty acid.

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any Supporting Information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

ARTICLE

Received 16 Sep 2016 | Accepted 24 Jan 2017 | Published 8 Mar 2017

DOI: 10.1038/ncomms14713

OPEN

A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants

Hugues Renault^{1,2,3,4}, Annette Alber^{1,5}, Nelly A. Horst², Alexandra Basilio Lopes⁶, Eric A. Fich⁷, Lucie Kriegshauser¹, Gertrud Wiedemann², Pascaline Ullmann¹, Laurence Herrgott¹, Mathieu Erhardt¹, Emmanuelle Pineau¹, Jürgen Ehltling⁵, Martine Schmitt⁶, Jocelyn K.C. Rose⁷, Ralf Reski^{2,3,4,8} & Danièle Werck-Reichhart^{1,3,4}

Lignin, one of the most abundant biopolymers on Earth, derives from the plant phenolic metabolism. It appeared upon terrestrialization and is thought critical for plant colonization of land. Early diverging land plants do not form lignin, but already have elements of its biosynthetic machinery. Here we delete in a moss the P450 oxygenase that defines the entry point in angiosperm lignin metabolism, and find that its pre-lignin pathway is essential for development. This pathway does not involve biochemical regulation via shikimate coupling, but instead is coupled with ascorbate catabolism, and controls the synthesis of the moss cuticle, which prevents desiccation and organ fusion. These cuticles share common features with lignin, cutin and suberin, and may represent the extant representative of a common ancestor. Our results demonstrate a critical role for the ancestral phenolic metabolism in moss erect growth and cuticle permeability, consistent with importance in plant adaptation to terrestrial conditions.

¹University of Strasbourg, Institute of Plant Molecular Biology, Centre National de la Recherche Scientifique, 12 rue du Général Zimmer, 67000 Strasbourg, France. ²Faculty of Biology, Chair of Plant Biotechnology, University of Freiburg, Schaenzlestrasse 1, 79104 Freiburg, Germany. ³University of Strasbourg Institute for Advanced Study, 5 allée du Général Rouvillois, 67000 Strasbourg, France. ⁴Freiburg Institute for Advanced Studies, University of Freiburg, Albertstraße 19, 79104 Freiburg, Germany. ⁵Department of Biology & Centre for Forest Biology, University of Victoria, British Columbia, Canada V8P 5C2. ⁶Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR CNRS 7200, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France. ⁷Plant Biology Section, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA. ⁸BIOSS - Centre for Biological Signalling Studies, 79104 Freiburg, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.W.-R. (email: werck@unistra.fr) or to R.R. (email: ralf.reski@biologie.uni-freiburg.de).

Land plants evolved from charophycean freshwater green algae around 450 Ma (refs 1,2). Key challenges associated with terrestrialization would have included increased biomechanical stresses, desiccation, rapid temperature fluctuations and higher light intensity, particularly in the ultraviolet range. Colonization of land would therefore have required major metabolic adaptations in the form of ultraviolet screens, antioxidants and precursors for structural biopolymers to resist desiccation but to allow gas exchange between the plant and the environment to ensure proper photosynthesis. Three types of complex hydrophobic extracellular biopolymers are generally described as contributing to permeability control and water transport in the vegetative tissues of vascular plants, the evolution of which was likely guided by similar selective pressures: cutin, a lipid-derived component of the cuticle on aerial plant surfaces; suberin, which results from co-polymerization of lipid and phenolic derivatives and which regulates water movement in roots; and lignin, which is synthesized from phenolic precursors via the phenylpropanoid pathway and which reinforces secondary cell walls to enhance long-distance water transport and erect growth^{3–5}. The metabolism of phenolic compounds was therefore likely a critical innovation for land colonization and, subsequently, the evolution and radiation of vascular plants through the development of lignified tissues^{6,7}. Lignin-like polymers were recently identified in algae^{8,9}, and phenylalanine/tyrosine ammonia lyases able to perform the first deamination step required for the synthesis of lignin precursors (that is, monolignols) from aromatic amino acids are present in algae and microorganisms¹⁰. However, orthologs of the next enzymes reported to frame the phenolic pathway in seed plants have not been found in algae, although they are present in bryophytes (mosses, liverworts and hornworts), the extant relatives of the earliest diverging land plants^{6,11,12}, which played a major role in Earth's oxygenation¹³. Mosses do not have true vasculature and are considered to be non-lignified plants¹⁴, but current perspectives suggest the possibility of a pre-lignin pathway arising in early non-vascular plants during the first stages of the transition from water to land³.

To address this idea, we investigated the function of a moss cytochrome P450 enzyme, in the CYP98 family, the homologue of which in flowering plants (angiosperms) catalyses the first irreversible step committed to the biosynthesis of the major monolignols. CYP98 enzymes from angiosperms catalyse the *meta*-hydroxylation of the phenolic ring of the phenylpropane C5-C3 unit of *p*-coumaric acid^{15–17} (Fig. 1). The substrate for this *meta*-hydroxylation reaction, resulting in the formation of a caffeoyl derivative, is not free *p*-coumaric acid, but an ester of shikimic acid^{17,18}. This implies a coupling, in angiosperms, of monolignols production to the plastidial shikimate pathway that forms aromatic amino acids¹⁹. CYP98 inactivation in the model angiosperm *Arabidopsis thaliana* results in a severe suppression of growth and fertility^{16,20}.

We show here that deletion of the single copy of CYP98 present in the genome of the model moss *Physcomitrella patens* prevents the moss gametophore development and cuticle formation. Our phenolic profiling indicates that the moss pre-lignin pathway mainly leads to the formation of soluble caffeoyl-threonic acids, whereas free caffeic acid or other caffeic acid conjugates cannot be detected. Accordingly, PpCYP98 catalyses the formation of caffeoyl-threonic acids *in vitro*. We show that the cuticle impermeability is strongly decreased in the Δ PpCYP98 mutants and can be restored together with plant growth by addition of caffeic acid. Our results thus demonstrate an essential role of the moss ancestral phenolic metabolism for plant erect growth and cuticle impermeability. These results are consistent with its proposed importance in plants terrestrialization.

Results

PpCYP98 expression in developing gametophore and sporophyte. A single-copy CYP98 gene is present in the genome⁶ of the moss *P. patens* (PpCYP98; CYP98A34; Pp3c22_19010V3.1). Based on a transcriptome atlas²¹, the PpCYP98 gene is mostly expressed in above-ground haploid gametophytic and diploid sporophytic tissues (Supplementary Fig. 1). An assessment of the pattern of expression of PpCYP98 as determined after insertion of the *uidA* reporter gene encoding a β -glucuronidase (GUS) protein downstream of the PpCYP98 gene in transgenic moss lines (Supplementary Fig. 2) confirmed the transcriptome data, and revealed prominent expression in erect aerial organs (Fig. 2a–d; Supplementary Fig. 2). The highest PpCYP98 expression was observed in developing gametophores (Fig. 2a–c) and newly emerged and elongating phyllids (leaf-like structures; Fig. 2d), reproductive organs (gametangia: male antheridia and female archegonia), embryos and developing sporophytes including immature spores (Supplementary Fig. 2). Low levels of expression were also detected in the haploid filamentous protonema growing in direct contact with the wet substrate (Fig. 1b; Supplementary Fig. 1).

PpCYP98 prevents organ fusion. Three independent Δ PpCYP98 deletion lines were generated (Supplementary Fig. 3) and showed no evidence of altered growth of the protonema filaments (Fig. 2e,f; Supplementary Fig. 4), but consistently exhibited aborted gametophore formation, associated with evidence of organ fusion, thereby precluded from forming gametangia and from sexual reproduction (Fig. 2g–j). Similar phenotypes have been observed in mutants of seed plants that are impaired in biosynthesis of the lipid biopolymer, cutin^{22,23}.

PpCYP98 controls the formation of caffeoyl-threonic acids.

Comparing profiles of soluble phenolic compounds extracted from the gametophores, we observed a complete absence in the mutant of several major compounds present in the wild type (WT; Fig. 3a). Based on mass and induced fragmentation patterns, the missing compounds were identified as isomers of caffeoyl-threonic acid (Fig. 3b; Supplementary Fig. 5, Supplementary Table 1). Other major phenolic compounds with slightly altered abundances in the mutant were subsequently assigned *p*-coumaroyl-threonic structures (Fig. 3b; Supplementary Fig. 6, Supplementary Table 1). This suggested that *p*-coumaroyl-threonic acid might undergo CYP98-dependent *meta*-hydroxylation in moss. To test this hypothesis, the enzyme was expressed in yeast (Supplementary Fig. 7) and was shown to convert chemically synthesized *p*-coumaroyl-2-threonic and *p*-coumaroyl-4-threonic acid substrates (Supplementary Note 2) into caffeoyl-2-threonic and caffeoyl-4-threonic acids, respectively (Fig. 3c).

Neither caffeic acid nor caffeoyl-shikimate/quinate was detected in moss crude extracts (Supplementary Table 1; Supplementary Fig. 8). To identify other potential caffeoyl derivatives in the extract, the latter was submitted to acid hydrolysis before liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)/MS analysis, but no trace of caffeoyl residues was found in the mutant (Fig. 3d; Supplementary Table 2). PpCYP98 deletion thus abolished the formation of free and bound caffeic acid.

PpCYP98 is required for the moss cuticle formation. The organ fusion phenotype of the Δ PpCYP98 mutant suggested impaired formation of the cuticle. This was further indicated by greatly increased surface permeability of the mutant gametophore to toluidine blue stain, compared with WT (Fig. 4a, Supplementary

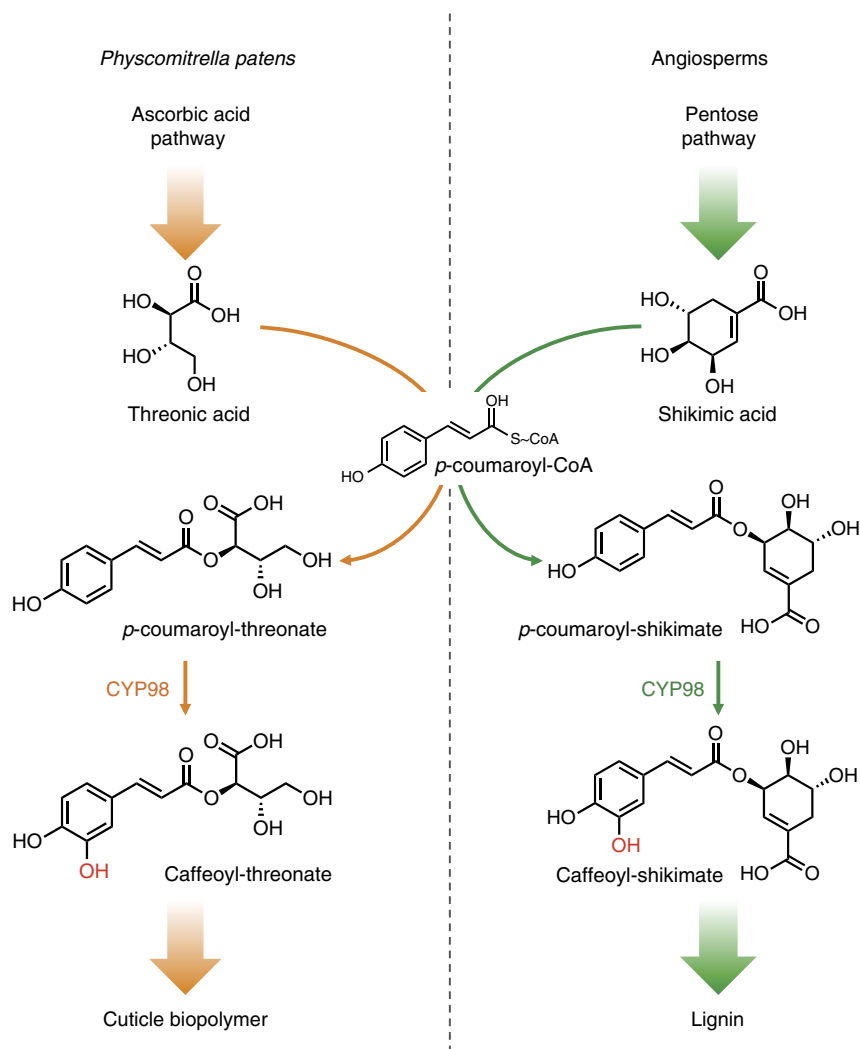


Figure 1 | The hydroxycinnamoyl-shikimate pathway in angiosperms and the *P. patens* hydroxycinnamoyl-threonate pathway established in this study.

The figure shows *p*-coumaroyl-2-threonate as PpCYP98 substrate, but *p*-coumaroyl-4-threonate is also converted by the enzyme. The *p*-coumaroyl-shikimate molecule is drawn according to the structure experimentally determined by Levsh *et al.*³⁹.

Fig. 9), and by transmission electron microscopy, which revealed perturbation of the integrity of the mutant cuticle (Fig. 4b). The composition of the biopolymer, cutin, the main constituent of cuticle, was therefore investigated. A recent study described the presence of a high proportion of phenolic residues in the cutin of *P. patens*²⁴. Consistent with our observations, the cutin of the $\Delta PpCYP98$ mutant was devoid of caffeate residues (Fig. 4c) and, strikingly, also showed a substantial decrease in native and oxygenated C16 and C18 fatty acids monomers. This decrease in fatty acid content did not reflect fatty acid hydroxylase activity of the *PpCYP98* enzyme, which we determined did not catalyse C16 palmitic acid oxygenation (Supplementary Fig. 10). We therefore inferred that caffeic acid, or its derivatives, plays a key role in the cell-wall anchoring or structure of the cutin polymer in *P. patens*, or contributes to its regulation. Consistent with this hypothesis, addition of caffeic acid to the growth medium of the $\Delta PpCYP98$ mutant partially restored both plant growth and impermeability of the cuticle to toluidine blue (Fig. 4d,e; Supplementary Fig. 11).

Discussion

Taken together, the free phenolic and polymer analyses indicate that caffeic acid derivatives are the major products of the phenolic metabolism in the moss *P. patens*. Our data also demonstrate that

this moss ‘pre-lignin’ pathway is crucial for the formation of a cuticular biopolymer and that caffeic acid production is a limiting factor in its biosynthesis. Unexpectedly, the substrate for the *meta*-hydroxylation reaction to form caffeic acid does not appear as free *p*-coumaric acid or *p*-coumaroyl-shikimate, but rather as *p*-coumaroyl-threonate. Threonic acid is a product of ascorbate catabolism^{25,26} and so we conclude that the formation of caffeic acid in moss is coupled to the hexose-derived ascorbate pathway, rather than the plastidial pentose phosphate-derived shikimate pathway, as is reported for vascular plants (Fig. 1). The importance of ascorbate has been revealed by the conservation of three different biosynthesis pathways in *P. patens*²⁷. Stresses, including light and desiccation, are likely to regulate the formation of this biopolymer, and possibly the cuticle caffeic acid content, thereby increasing its antioxidant and ultraviolet-screening properties. The composition of the moss cuticle, namely its associating oxygenated phenolics and fatty acids, is more reminiscent of the polyester suberin than of cutin from seed plants⁵. It clearly confers surface protection and impermeability, and is also likely to contribute to the erect growth and rigidity of the moss gametophore. It may in particular contribute to the rigidity of the gametophore phyllid sheets, which are formed from a single-cell layer²⁴. It has been hypothesized that cutin and suberin might share a common evolutionary origin⁴. Our data

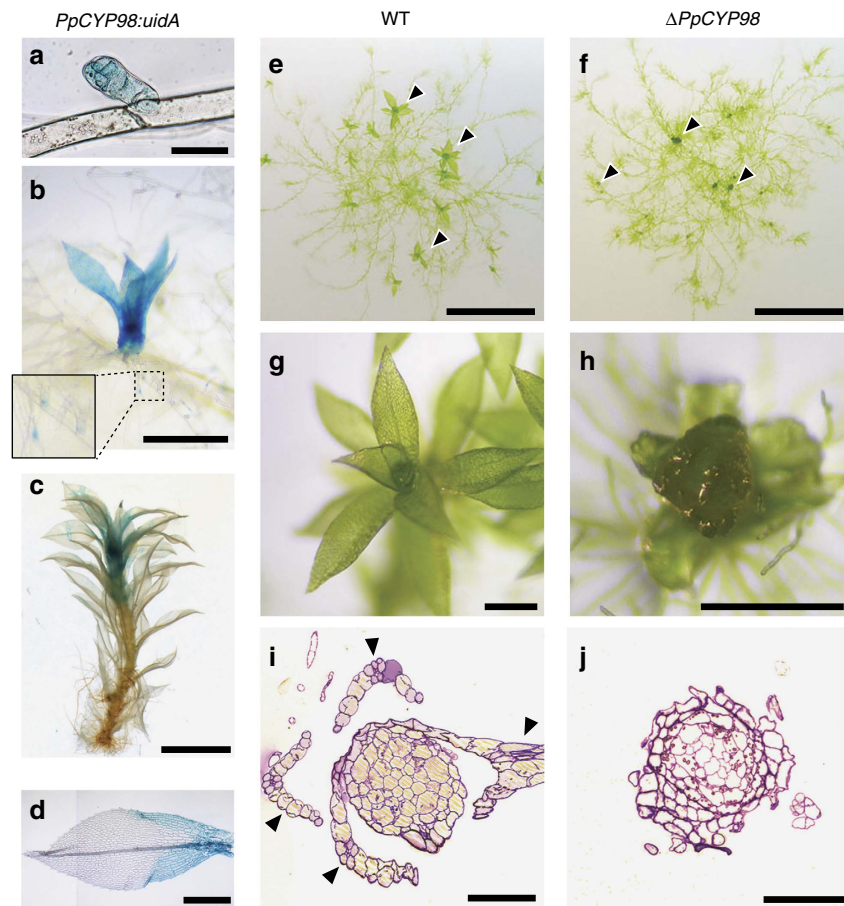


Figure 2 | *PpCYP98* is essential for *P. patens* gametophore development. (a–d) GUS staining pattern in *PpCYP98:uidA* lines indicated a prominent expression in developing gametophores. (a) Bud (emerging gametophore). Scale bar, 50 μm . (b) Young gametophores. Scale bar, 0.5 mm. (c) One-month-old gametophore. Scale bar, 2 mm. (d) Apical leaf from 1-month-old gametophore (joined pictures). No GUS staining is visible in the midrib. Scale bar, 0.5 mm. (e–j) $\Delta PpCYP98$ mutants fail to develop normal gametophores. (e, f) Six-week-old colonies grown on agar plates. Arrowheads indicate gametophores. Scale bars, 5 mm. (g–h) Close-up views of gametophores. Scale bars, 0.5 mm. (i, j) Toluidine blue-stained cross section of gametophores. Arrowheads indicate phyllids in the WT. Scale bars, 0.1 mm.

suggest that the lipid–phenolic matrix present in *P. patens* may constitute an extant representative of the common ancestor of the suberin, cutin and lignin polymers that have been described associated with highly differentiated vegetative tissues in more recently diverged plant lineages. This ancestral structure was presumably critical for the plant transition from water to land, and suggest new strategies for engineering biopolymers to enhance stress tolerance in vascular plants.

Methods

Plant material and growth conditions. *P. patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. strain Grandsen⁶ was cultured in liquid or on solid Knop medium²⁸ supplemented with 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ H_3BO_3 , 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ MnSO_4 , 15 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ZnSO_4 , 2.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ KI , 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Na_2MoO_4 , 0.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$ CuSO_4 and 0.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$ CoCl_2 . Medium was solidified with 12 g l^{-1} purified agar (OXOID, Thermo Scientific). Plants were kept at 23 $^\circ\text{C}$ under 16/8 h day/night cycle, light intensity set to 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and liquid cultures were upheld under constant agitation for proper aeration. Protonema material was grown in liquid cultures and maintained by weekly tissue disruption and subculturing. Gametophores were propagated on agar plates. In some cases, gametophores liquid cultures were established by soft tissue disruption (~5 s) of individual gametophores. Sporophyte formation was induced in agar plate-grown gametophores by reducing day length and temperature as reported before²⁹.

Generation of transgenic lines. To generate the $\Delta PpCYP98$ knockout mutants, two 750 bp genomic regions were PCR-amplified from *P. patens* genomic DNA and assembled with the *nptII* selection cassette into a PCR-linearized pGEM-T vector via GIBSON cloning³⁰ (Supplementary Fig. 3, Supplementary Table 3 for primers).

The *PpCYP98* disruption construct was excised from the vector backbone by *Bam*HI digestion, using restriction sites introduced during PCR. Twenty-five microgram of linearized construct were used for PEG-mediated transfection of *P. patens* protoplast³¹. Transformants were selected on Knop plates supplemented with 25 mg l^{-1} geneticin (G418).

For *PpCYP98:uidA* reporter lines, two 800 bp genomic regions framing the *PpCYP98* STOP codon were PCR-amplified from *P. patens* genomic DNA and assembled with the *uidA* reporter gene into a PCR-linearized pGEM-T vector via GIBSON cloning³⁰ (Supplementary Fig. 2, Supplementary Table 3). A linker DNA sequence was introduced during PCR to limit GUS protein hindrance on *PpCYP98* activity (Supplementary Fig. 2). The *PpCYP98:uidA* construct was excised from the vector backbone by *Eco*RI digestion, using restriction sites introduced during PCR. Twenty-five micrograms of linearized construct were used for transfection of *P. patens* protoplast³¹. The *PpCYP98:uidA* construct does not harbour a selection cassette and was therefore co-transfected with the pRT101 plasmid³² containing the *nptII* selection cassette. Transformants were selected on Knop plates supplemented with 25 mg l^{-1} geneticin (G418).

Molecular characterization of transgenic lines. Following the selection process, a previously established direct-PCR protocol³³ was implemented to identify transformants with proper genomic integration of the DNA construct. Briefly, one gametophore or 2–3 protonema filaments were incubated for 15 min at 45 $^\circ\text{C}$ in a DNA extraction buffer (9.1 g l^{-1} Tris-HCl pH 8.8, 2.6 g l^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 ml l^{-1} Tween 20). PCR reactions were performed with the Phire II polymerase (Thermo Scientific) and 2.5 μl of the DNA extract in 15 μl reaction. Both 5' and 3' integrations were verified using appropriate PCR strategy and primers (Supplementary Figs 2 and 3, Supplementary Table 3).

$\Delta PpCYP98$ lines identified by direct-PCR were further validated at the molecular level by conventional PCR with reverse transcription (Supplementary Fig. 3C). To this end, total RNA was isolated from ~8 mg of lyophilized 3-day-old

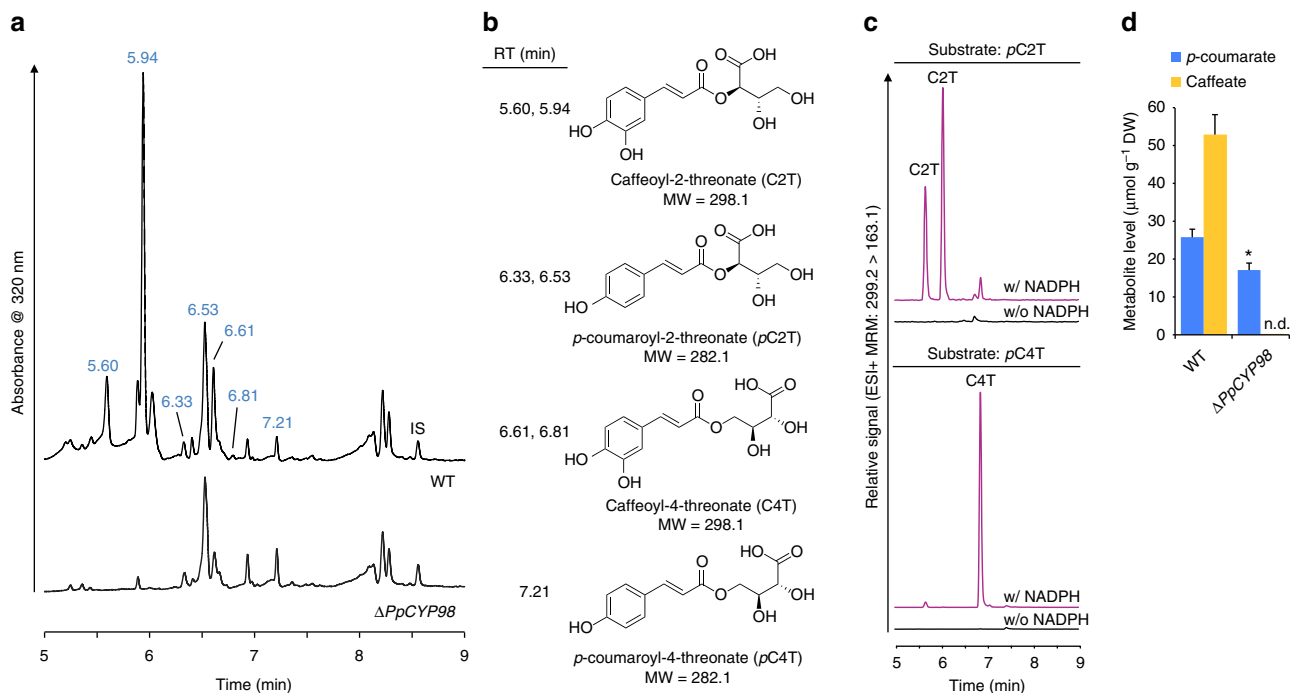


Figure 3 | PpCYP98 is a phenolic ring meta-hydroxylase and uses esters of threonic acid as substrates. (a) Ultraviolet chromatogram showing the absence of major peaks in the $\Delta PpCYP98$ mutant gametophore crude extract. IS, internal standard (morin). (b) Names and structures of molecules at the indicated retention times (RT). (c) PpCYP98-dependent conversion of *p*-coumaroyl-2-threonate (pC2T) and *p*-coumaroyl-4-threonate (pC4T) esters into corresponding caffeoyl threonate esters (C2T and C4T). Control reactions without NADPH were concurrently analysed. Molecules were detected using dedicated multiple reaction monitoring (MRM) methods. Note that two caffeoyl-2-threonate isomers are produced from the two *p*-coumaroyl-2-threonate isomers present in the synthetic substrate, shown in Supplementary Fig. 6. (d) Acid hydrolysis of crude extracts demonstrates the total absence of caffeate in gametophores of the $\Delta PpCYP98$ mutants. Results are the mean + standard error from three independent biological samples for WT and three independent mutant lines. Asterisk indicates a significant difference between mutants and WT (P -value = 0.037; two-tailed Student's *t*-test for samples of unequal variance).

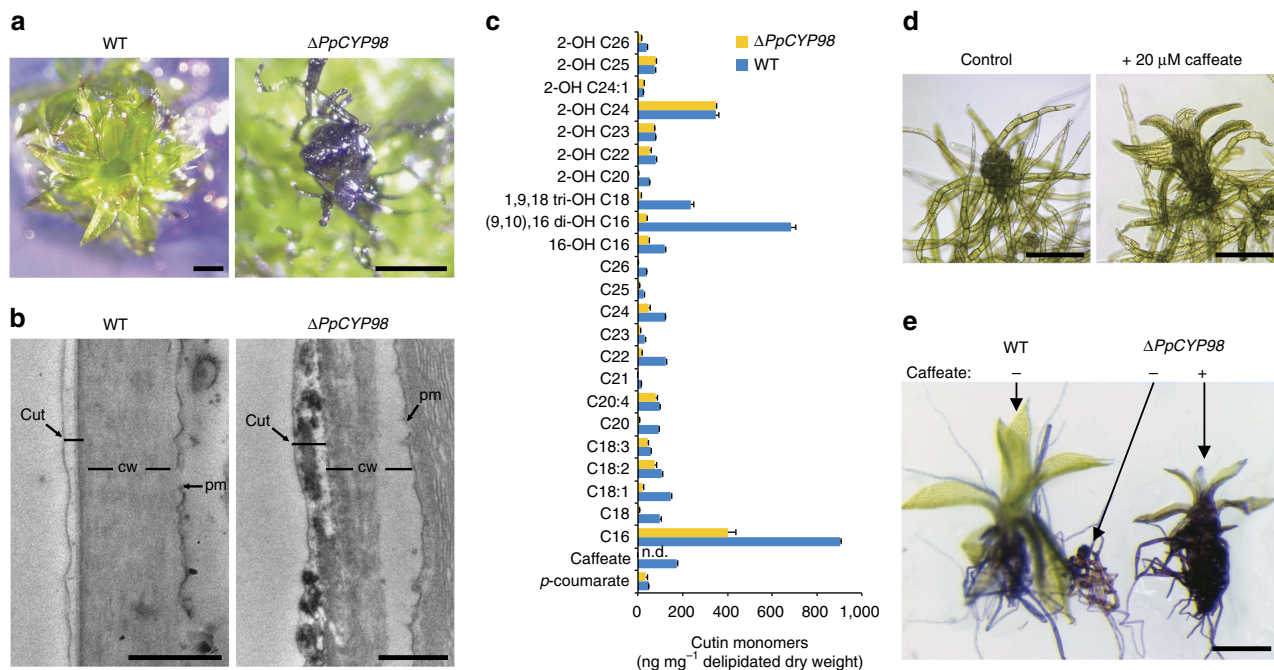


Figure 4 | PpCYP98 produces cutin caffeoyl units and is critical for cutin formation in *P. patens*. (a) Toluidine blue permeability staining indicates a cuticle defect in the $\Delta PpCYP98$ mutant gametophore. Scale bars, 0.5 mm. (b) Transmission electron micrographs of the phyllid outer cell surface showing alteration of the $\Delta PpCYP98$ mutant cuticle layer. cut, cuticle; cw, cell wall; pm, plasma membrane. Scale bars, 0.5 μ m. (c) Comparative analysis of WT and mutant cutin gametophore composition. Results are the mean + standard error from three independent biological samples for WT and three independent mutant lines for the mutant. n.d., not detected. (d) Exogenous caffeate supply (20 μ M) restores growth of the $\Delta PpCYP98$ mutant gametophore. Scale bars, 0.2 mm. (e) Exogenous caffeate (20 μ M) supply restores cuticle impermeability to toluidine blue of the mutant phyllids. Scale bar, 0.5 mm.

protonema material using TriReagent (Sigma-Aldrich). Twenty micrograms of RNA were treated with 5U of RQ1 DNaseI (Promega) and subsequently purified with the Nucleospin RNA clean-up XS kit (Macherey-Nagel). One microgram of DNaseI-treated RNA was reverse-transcribed with oligo(dT)₂₃V and the Superscript III enzyme (Thermo Scientific) in 20 µl reaction. *PpCYP98* transcripts were amplified from 1 µl of cDNA using the Phire II polymerase (Thermo Scientific) in 20 µl reaction. The constitutively expressed *L21* gene (Pp1s107_181V6.1), encoding a 60S ribosomal protein, was used as reference gene.

The number of $\Delta PpCYP98$ lines was narrowed down after transcript analysis; remaining lines were subjected to transgene copy analysis by quantitative PCR as described before³⁴. Genomic DNA was isolated using a protocol adapted from Edwards *et al.*³⁵. Briefly, nucleic acids were extracted from 5 mg of 3-day-old lyophilized protonema material with 500 µl of lysis buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) and thorough agitation. Nucleic acids were purified by addition of a 500 µl of a phenol:chloroform (1:1) solution (pH 8.0) followed by a precipitation with sodium acetate and isopropanol. DNA pellets were washed with 75% ethanol before solubilization in a 5 mM Tris pH 8.5 solution. Samples were further treated with a RNase A/T1 mix (Thermo Scientific) to remove RNA. DNA was re-purified with a phenol:chloroform step as described above. Typical yields were ~0.5 µg DNA per mg of dry plant material. Quantitative PCR reactions were run on a LightCycler 480 II device (Roche) in 10 µl comprising 1 ng genomic DNA reaction, 250 nM of each primer and 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche). Reactions were performed in triplicate and crossing points were determined using the manufacturer software. Both the 5'- and 3'-homologous regions were targeted using specific primers (Supplementary Fig. 3, Supplementary Table 3). The single-copy gene *PpCLF* (Pp1s100_146V6.1) was amplified using two primer pairs and served as an internal standard for input amount normalization. Transgene copy number was determined by comparing relative values of the tested genomic segment in transgenic lines with those of the WT. Three $\Delta PpCYP98$ lines with a single transgene copy (Supplementary Fig. 3) were kept for subsequent phenotypic and metabolic analyses.

GUS staining. Plant tissues were vacuum infiltrated with X-Gluc solution (1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide, 100 mM sodium phosphate and pH 7.0) and incubated at 37 °C for 24 h. The samples were fixed in 5% v/v formaldehyde, 5% v/v acetic acid, 100 mM sodium phosphate and pH 7.0 for 30 min. Chlorophyll was extracted with an ethanol series (30, 50, 70 and 100%).

Recombinant proteins production in yeast and enzyme assays. Procedures were adapted from Liu *et al.*³⁶. Coding sequence of the *P. patens PpCYP98* gene was optimized for yeast expression (sequences available in Supplementary Note 1) and synthesized by GeneCust Europe (Dudelange, Luxembourg) with addition of *Bam*HI and *Kpn*I restriction sites at the 5' and 3' termini, respectively. *Bam*HI/*Kpn*I sites were used for subcloning CDS into the yeast expression plasmid pYeDP60.

The *Saccharomyces cerevisiae* strain WAT11, expressing the *ATRI* cytochrome P450 reductase from *Arabidopsis thaliana* under the control of the galactose-inducible promoter *GAL10-CYC1* (ref. 37), was transformed with the pYeDP60:PpCYP98 plasmid and selected on minimum SGI medium (1 g l⁻¹ bactocasmino acids, 7 g l⁻¹ yeast nitrogen base, 20 g l⁻¹ glucose and 40 mg l⁻¹ L-tryptophan). Isolated colonies were chosen for initiating SGI liquid cultures and were grown for 18 h at 28 °C under 160 r.p.m. agitation. Ten millilitres of SGI culture were used to inoculate 200 ml of YPGE medium (10 g l⁻¹ bactopeptone, 10 g l⁻¹ yeast extract, 5 g l⁻¹ glucose and 3% ethanol by volume). Following a 30 h growth period at 28 °C under 160 r.p.m. agitation, production of recombinant proteins was induced by supplementing the growth medium with 10 ml of 200 g l⁻¹ sterile galactose solution. Proteins production phase was performed at 20 °C for 16 h.

Yeast cells were harvested by centrifugation at 7,500g for 10 min at 4 °C, washed with TEK buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM KCl) and resuspended in 2 ml of TES buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 600 mM sorbitol) supplemented with 5 mM 2-mercaptoethanol and 10 g l⁻¹ bovine serum albumin, fraction V (buffer A). Cell suspensions were transferred to 50 ml conical tubes and homogenized with 0.5 mm glass beads by handshaking five times for 1 min. Beads were washed twice with 30 ml of buffer A. Cell debris and remaining glass beads were removed from the pooled lysates by a 20 min centrifugation step at 7,500g and 4 °C. Supernatants were filtered on Miracloth (22–25 µm pore size, Calbiochem, MD, USA) and microsomal fractions were purified by differential centrifugation (100,000g, 4 °C, 1 h). Pelleted microsomes were resuspended in TEG buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 30% glycerol by volume) with a Potter-Elvehjem homogenizer. Microsomes preparations containing PpCYP98 recombinant proteins were stored at -20 °C until processing.

Enzyme assays were performed in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 100 µM substrate, 10 pmol of PpCYP98 recombinant enzyme and 500 µM NADPH in a final volume of 200 µl. Reactions were initiated by addition of the NADPH, incubated at 28 °C in the dark for 30 min and terminated with 1/10 50% acetic acid and 4/10 acetonitrile. Microsomal membranes were spun down by centrifugation (13,000g, 10 min, 4 °C). Reaction products were analysed from

supernatants by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)-MS/MS as described below.

Metabolic profiling of *Physcomitrella patens*. Protonema material was harvested 3 days after tissue disruption. Gametophores grown in liquid medium were harvested 1 month after the last disruption and 1 week after medium change. *P. patens* tissues were collected by pouring the culture onto a sieve (100 µm pore size) and were thoroughly rinsed with distilled water, quickly blotted on paper towel and finally snap-frozen in liquid nitrogen. Tissues were lyophilized overnight before grinding with 5 mm steel balls and a Tissuelyser II (Qiagen) operated at 30 Hz for 2 min.

Metabolites were extracted with a previously described methanol:chloroform:water protocol³⁸. Briefly, 400 µl of methanol containing 10 µM morin as an internal standard were added to 10 mg of lyophilized ground plant material. After agitation at 1,500 r.p.m. for 1 h, 200 µl of chloroform were added and samples were shaken for five additional minutes. Phase separation was induced by adding 400 µl of ultra-pure water followed by vigorous agitation and centrifugation (15,000g, 4 °C, 15 min). Supernatants were transferred to clean microtubes and constituted the crude extracts. To hydrolyse ester bonds of hydroxycinnamic acid conjugates, 250 µl of crude extract were dried under reduced pressure. Dry residues were resuspended in a 50% methanol solution containing 2 N HCl and 2.5 mg ml⁻¹ ascorbic acid as an antioxidant. Acid hydrolysis was performed at 80 °C for 2 h.

Metabolites separation and detection were carried out on an Acquity UPLC (Waters corp.) coupled to a photodiode array detector (Waters corp.) and a Quattro Premier XE tandem-mass spectrometer (Waters corp.) equipped with an electrospray ionization source. Ten microliters of extract were injected onto a UPLC BEH C18 column (100 × 2.1 mm, 1.7 µm; Waters) outfitted with a pre-column and operated at 35 °C. Metabolites chromatography was performed at a 0.35 ml min⁻¹ flow rate with a mixture of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B) according to the following programme: initial, 98% A; 11.25 min, 0% A, curve 8; 12.75 min, 0% A, curve 6; 13.50 min, 98% A, curve 6; 15 min, 98% A. Nitrogen was used as the drying and nebulizing in-source gas. The nebulizer gas flow was set to 50 l h⁻¹, and the desolvation gas flow was set to 900 l h⁻¹. The interface temperature was set to 400 °C, and the source temperature to 135 °C. Capillary voltage was set to 3.4 kV. Data acquisition and analysis were performed with the MassLynx v4.1 software (Waters corp.). Metabolites were ionized in positive mode and detected using dedicated multiple reaction monitoring methods (Supplementary Table 4). The QuanLynx module of MassLynx was executed to integrate peaks and to report corresponding areas. Peak areas were normalized to plant dry weight and internal standard level (morin), leading to relative levels. External calibration curves of authentic standards were employed for the absolute quantification of hydroxycinnamic acid after acid hydrolysis.

In vitro assay for palmitic acid conversion. The radiolabelled substrate was dissolved in ethanol that was evaporated before the addition of microsomal fraction into the glass tube. Resolubilization of the substrates was confirmed by measuring the radioactivity of the incubation media. The standard assay (0.1 ml) contained 20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 1 mM NADPH, radiolabelled substrate (100 µM) and 35 µl of microsomal fraction. The reaction was initiated by the addition of NADPH and was done in a bathwater 20 min at 27 °C under agitation. Incubation media were directly spotted on thin layer chromatography (TLC) plates. For separation of metabolites from residual substrate, TLC plates were developed with a mixture of diethyl ether/light petroleum (boiling point, 40–60 °C)/formic acid (50:50:1, v/v/v). The plates were scanned with a radioactivity detector (Raytest Rita Star).

Transmission electron microscopy. Samples were fixed overnight in 2% glutaraldehyde and were then treated for 2 h with 2% uranyl acetate 2% (w/v) and then stained with osmium tetroxide 0.1% (v/v) in 150 mM phosphate buffer, pH 7.2. Samples were dehydrated through an ethanol series and infiltrated with EPON812 medium grade resin (Polysciences). Polymerization was allowed for 48 h at 60 °C. Ultrathin sections (70 microns) were cut using an ultracut E microtome (Reichert) and collected on grids coated with formvar (electron microscopy sciences (EMS)). Samples were visualized with a Hitachi H-7500 electron microscope operating at 80 kV.

Permeability test. Tissue permeability was assessed by immersing plants into a 0.05% toluidine blue solution for 2 min. Samples were subsequently thoroughly washed with distilled water until the washing solution was clear.

Cutin monomers analysis. Cutin monomers analysis was performed on the same plant material as used for metabolic analysis (that is, lyophilized gametophores grown in liquid medium). For each sample, ~200 mg of ground, lyophilized moss tissue was added to a pre-weighed 40 ml glass vial for processing. The tissue was delipidated by extensive washing with a series of solvents, each containing 0.01% butylated hydroxytoluene, as follows.

A total of 40 ml of isopropanol pre-heated to 85 °C was added to each sample and incubated at 85 °C for 15 min, then after cooling to room temperature, the samples were shaken at 250 r.p.m. for 1 h and centrifuged at 1,500g for 5 min to pellet most of the tissue. The supernatant was removed with a glass Pasteur pipette and filtered through a paper filter (Whatman #1) to collect the suspended tissue particles, which were then scraped off the paper and added back to the sample vial. Three more washes (agitation, centrifugation and filtering) were performed, adding 30 ml of room temperature isopropanol each time. The tissue was then washed with the following series of solvents: 2:1 chloroform: methanol (repeated once), 1:2 chloroform: methanol, 1:1 chloroform: methanol, 1:2 chloroform: methanol, pure methanol. The samples were agitated with each of these solvents at 250 r.p.m. for at least 2 h and up to overnight, with centrifugation and filtration (as described above) after each wash. The tissue was then dried under a stream of nitrogen for 20 min and freeze dried overnight. The vial was weighed to determine the dry, delipidated tissue weight.

A total of 8 ml of reaction media (12:3:5 methanol: methyl acetate: 25% sodium methoxide) and 100 µg of each of pentadecalactone and heptadecanoate (internal standards) were added to each sample, and the mixture was then heated at 60 °C overnight to depolymerize the cutin. The samples were then cooled to room temperature and 16 ml dichloromethane, 2 ml glacial acetic acid and 4 ml 0.9% NaCl in 100 mM Tris (pH 8.0) was added to each and vortexed to mix. Two phases were separated by centrifugation for 2 min at 1,500g. The lower phase was transferred to a new vial and 14 ml of 0.9% NaCl in 100 mM Tris (pH 8.0) was added and mixed by vortexing. Two phases were again separated by centrifugation (2 min at 1,500g) and the lower phase was transferred to a new vial, while the upper phase was discarded. Roughly 0.5 g of anhydrous sodium sulfate added to remove any residual water, and the solution then filtered through a paper filter (Whatman #1) into a clean vial.

An aliquot of each cutin sample was dried by heating at 40 °C under a stream of nitrogen, then derivatized with 50 µl each of pyridine and BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) for 10 min at 90 °C, dried again by heating under nitrogen, and resuspended in 100 µl chloroform. The samples were analysed by gas chromatography (GC) using an Agilent GC 6850 with a Flame Ionization Detector. Compounds were identified based on a comparison of retention times with standards and also by performing GC-mass spectrometry (MS) using an Agilent GC 6890 coupled to a JEOL GC MATE II mass spectrometer. Cutin levels were normalized to the internal standards and the dry, delipidated tissue weights.

Chemical complementation. For the chemical complementation of the $\Delta PpCYP98$ plants, caffeic acid (Sigma-Aldrich) was solubilized in absolute ethanol to prepare 100 mM stock solutions. Freshly prepared stock solutions were added to liquid cultures 14 days after the last disruption to a final concentration of 20 µM. After 14 days the medium was exchanged for fresh medium containing caffeic acid. Gametophore development was assessed after 14 and 28 days cultivation in presence of caffeic acid. Control cultures containing 0.05% ethanol were run in parallel.

Chemical synthesis of *p*-coumaroyl-threonate esters. Detailed procedures are available in Supplementary Note 2.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon request. The transgenic moss lines described in this study are deposited in the International Moss Stock Center (<http://www.moss-stock-center.org/>) with the accession numbers IMSC 40805-40814.

References

- Kenrick, P. & Crane, P. R. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**, 33–39 (1997).
- Bowman, J. L. Walkabout on the long branches of plant evolution. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 70–77 (2013).
- Weng, J. K. & Chapple, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.* **187**, 273–285 (2010).
- Fich, E. A., Segerson, N. A. & Rose, J. K. The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**, 207–233 (2016).
- Beisson, F., Li-Beisson, Y. & Pollard, M. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 329–337 (2012).
- Rensing, S. A. *et al.* The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64–69 (2008).
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. & Fernie, A. R. The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 123–152 (2013).
- Martone, P. T. *et al.* Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Curr. Biol.* **19**, 169–175 (2009).
- Sorensen, I. *et al.* The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *Plant J.* **68**, 201–211 (2011).
- Barros, J. *et al.* Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis. *Nat. Plants* **2**, 16050 (2016).
- Nelson, D. & Werck-Reichhart, D. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J.* **66**, 194–211 (2011).
- Xu, Z. *et al.* Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics* **10**(Suppl 11): S3 (2009).
- Lenton, T. M. *et al.* Earliest land plants created modern levels of atmospheric oxygen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 9704–9709 (2016).
- Ligrone, R., Duckett, J. G. & Renzaglia, K. S. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 795–813 (2000).
- Franke, R. *et al.* Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* **30**, 47–59 (2002).
- Franke, R. *et al.* The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **30**, 33–45 (2002).
- Schoch, G. *et al.* CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 36566–36574 (2001).
- Coleman, H. D., Park, J. Y., Nair, R., Chapple, C. & Mansfield, S. D. RNAi-mediated suppression of *p*-coumaroyl-CoA 3'-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 4501–4506 (2008).
- Schoch, G. A. *et al.* The meta-hydroxylation step in the phenylpropanoid pathway: a new level of complexity in the pathway and its regulation. *Environ. Chem. Lett.* **4**, 127–136 (2006).
- Abdulrazzak, N. *et al.* A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth. *Plant Physiol.* **140**, 30–48 (2006).
- Ortiz-Ramirez, C. *et al.* A transcriptome atlas of *Physcomitrella patens* provides insights into the evolution and development of land plants. *Mol. Plant* **9**, 205–220 (2016).
- Sieber, P. *et al.* Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell* **12**, 721–738 (2000).
- Javelle, M., Vernoud, V., Rogowsky, P. M. & Ingram, G. C. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol.* **189**, 17–39 (2011).
- Buda, G. J. *et al.* An ATP binding cassette transporter is required for cuticular wax deposition and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **25**, 4000–4013 (2013).
- Green, M. A. & Fry, S. C. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**, 83–87 (2005).
- Debolt, S., Melino, V. & Ford, C. M. Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Ann. Bot.* **99**, 3–8 (2007).
- Mueller, S. J. *et al.* Quantitative analysis of the mitochondrial and plastid proteomes of the moss *Physcomitrella patens* reveals protein macrocompartmentation and microcompartmentation. *Plant Physiol.* **164**, 2081–2095 (2014).
- Reski, R. & Abel, W. O. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* **165**, 354–358 (1985).
- Hohe, A., Rensing, S. A., Mildner, M., Lang, D. & Reski, R. Day length and temperature strongly influence sexual reproduction and expression of a novel MADS-box gene in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biol.* **4**, 595–602 (2002).
- Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345 (2009).
- Hohe, A. *et al.* An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss, *Physcomitrella patens*. *Curr. Genet.* **44**, 339–347 (2004).
- Girke, T., Schmidt, H., Zahringer, U., Reski, R. & Heinz, E. Identification of a novel delta 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **15**, 39–48 (1998).
- Schween, G., Fleig, S. & Reski, R. High-throughput-PCR screen of 15,000 transgenic *Physcomitrella* plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **20**, 43–47 (2002).
- Horst, N. A. *et al.* A single homeobox gene triggers phase transition, embryogenesis and asexual reproduction. *Nat. Plants* **2**, 15209 (2016).
- Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1349 (1991).
- Liu, Z. *et al.* Evolutionary interplay between sister cytochrome P450 genes shapes plasticity in plant metabolism. *Nat. Commun.* **7**, 13026 (2016).
- Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F. & Pompon, D. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* **272**, 19176–19186 (1997).
- Renault, H. *et al.* The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biol.* **10**, 20 (2010).

39. Levsh, O. *et al.* Dynamic conformational states dictate selectivity toward the native substrate in a substrate-permissive acyltransferase. *Biochemistry* **55**, 6314–6326 (2016).

Acknowledgements

D.W.-R., R.R. and H.R. acknowledge the support of the Freiburg Institute for Advanced Studies (FRIAS) and the University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS) to the METABEVO project. D.W.-R. and H.R. also acknowledge support of the Agence Nationale de la Recherche to the LabCom TerpFactory. Support to J.K.C.R. was provided by grants from the US National Science Foundation's Plant Genome Research Program (IOS-1339287) and by the Agriculture and Food Research Initiative Competitive Grants Program (2011-67013-19399) of the US Department of Agriculture's National Institute of Food and Agriculture. E.A.F. was supported by a fellowship from NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada). A.A. acknowledges funding by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada in the framework of the Collaborative Research and Training Experience Program 'Working on Walls' and from the Collège Doctoral Européen. R.R. acknowledges funding by the Excellence Initiative of the German Federal and States governments (EXC 294). N.A.H. is grateful for the support from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's 7th Framework Programme (FP7/2007-2013) under REA Grant Agreement 289217. L.K. and E.P. acknowledge the support of the French Ministry of Education and Research for PhD funding. We thank Dr F. Pinot (IBMP, Strasbourg) for providing the CYP704B1 chromatograms. This paper reflects only the author's views and the European Union is not liable for any use that may be made of the information contained herein.

Author contributions

H.R., D.W.-R. and R.R. conceived the study. H.R. planned the experiments. H.R. performed cloning and metabolic analyses, generated transgenic lines and characterized their phenotype. A.A. performed *in vitro* enzyme assays under the supervision of PU and contributed to the identification of the metabolites and reaction products. N.A.H. performed GUS assays and chemical complementation of mutant lines. A.B.L.

synthesized chemicals under the supervision of M.S.; G.W. contributed to transgenic lines production. E.P. tested *in vitro* fatty acid metabolism. E.A.F. performed cutin analysis under the supervision of J.K.C.R.; L.K. contributed to gene expression analysis. L.H. contributed to enzyme production. M.E. performed microscopy analyses. H.R. ensured data analysis and visualization. H.R. and D.W.-R. wrote the initial draft, which was subsequently edited by R.R., J.K.C.R., M.S., J.E., A.A. and N.A.H. Funding was provided by D.W.-R., R.R., J.K.C.R. and J.E.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

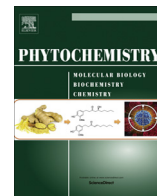
How to cite this article: Renault, H. *et al.* A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nat. Commun.* **8**, 14713 doi: 10.1038/ncomms14713 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017



Sequential oxidation of Jasmonoyl-Phenylalanine and Jasmonoyl-Isoleucine by multiple cytochrome P450 of the CYP94 family through newly identified aldehyde intermediates



Emilie Widemann^a, Bernard Grausem^a, Hugues Renault^a, Emmanuelle Pineau^a, Clément Heinrich^b, Raphaël Lukan^a, Pascaline Ullmann^a, Laurence Miesch^b, Yann Aubert^a, Michel Miesch^b, Thierry Heitz^{a,*}, Franck Pinot^{a,*}

^aDépartement Réseaux Métaboliques chez les Végétaux, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR 2357 du Centre National de la Recherche Scientifique, conventionné avec l'Université de Strasbourg, 67083 Strasbourg Cedex, France

^bLaboratoire de Chimie Organique Synthétique, Unité Mixte de Recherche 7177, Université de Strasbourg, 67008 Strasbourg Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2014

Received in revised form 26 June 2015

Accepted 29 June 2015

Available online 9 July 2015

Keywords:

Cytochrome P450

Hormone turnover

Signaling

Stress

Oxidation

Metabolomics

Jasmonic acid

ABSTRACT

The role and fate of Jasmonoyl-Phenylalanine (JA-Phe), an understudied conjugate in the jasmonate pathway remain to be unraveled. We addressed here the possibility of JA-Phe oxidative turnover by cytochrome P450s of the CYP94 family. Leaf wounding or fungal infection in *Arabidopsis* resulted in accumulation of JA-Phe, 12-hydroxyl (12OH-JA-Phe) and 12-carboxyl (12COOH-JA-Phe) derivatives, with patterns differing from those previously described for Jasmonoyl-Isoleucine. *In vitro*, yeast-expressed cytochromes P450 CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 differentially oxidized JA-Phe to 12-hydroxyl, 12-aldehyde and 12-carboxyl derivatives. Furthermore, a new aldehyde jasmonate, 12CHO-JA-Ile was detected in wounded plants. Metabolic analysis of CYP94B3 and CYP94C1 loss- and gain-of-function plant lines showed that 12OH-JA-Phe was drastically reduced in *cyp94b3* but not affected in *cyp94c1*, while single or double mutants lacking CYP94C1 accumulated less 12COOH-JA-Phe than WT plants. This, along with overexpressing lines, demonstrates that hydroxylation by CYP94B3 and carboxylation by CYP94C1 accounts for JA-Phe turnover *in planta*. Evolutionary study of the CYP94 family in the plant kingdom suggests conserved roles of its members in JA conjugate homeostasis and possibly in adaptive functions. Our work extends the range and complexity of JA-amino acid oxidation by multifunctional CYP94 enzymes in response to environmental cues.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cytochrome P450 enzymes (P450s) represent up to 1% of the total genes in many plant species (Nelson and Werck-Reichhart, 2011). For example, *Arabidopsis*, poplar, rice and grape possess 246, 312, 356 and 457 P450s, respectively (reviewed in Mizutani and Ohta, 2010). In comparison, the human genome encodes 57 P450s (Nebert et al., 2013). Although DNA sequencing allows precise numbering and sorting in these plant species, the physiological roles of the majority of P450s remain to be established. Mizutani and Ohta (2010) reported that in *Arabidopsis* less than 30% of the

P450s have a characterized function. The multiplicity of P450s in a single plant species is thought to result from environmental adaptation. Plants are sessile organisms and rely on a battery of chemicals for survival. They have developed a highly complex metabolic network using the diversified catalytic properties of the P450s (Nelson, 2006). Induction of plant P450 expression by numerous factors supports the hypothesis of their participation in plant adaptation (Pinot et al., 1998; Kandel et al., 2005; Kandel et al., 2007; Kastner et al., 2010).

P450s are important players in plant hormone homeostasis. Many of these membrane-bound catalysts are involved in the biosynthesis or inactivation of various hormonal compounds (Mizutani and Ohta, 2010), as recently demonstrated for jasmonates (reviewed in Koo and Howe, 2012). Jasmonates are lipid-derived phytohormones that regulate plant growth and response to biotic and abiotic stresses (Fonseca et al., 2009a; Wasternack and Kombrink, 2010; Acosta and Farmer, 2010;

* Corresponding authors at: IBMP-CNRS UPR 2357, Metabolic Networks Department, F-67084 Strasbourg Cedex, France (T. Heitz), IBMP-CNRS UPR 2357, Metabolic Networks Department, F-67083 Strasbourg Cedex, France (F. Pinot).

E-mail addresses: thierry.heitz@ibmp-cnrs.unistra.fr (T. Heitz), franck.pinot@ibmp-cnrs.unistra.fr (F. Pinot).

Wasternack and Hause, 2013). During the last decade jasmonate synthesis and regulation have been increasingly investigated and these processes are now well documented (Acosta and Farmer, 2010; Wasternack and Hause 2013). In *Arabidopsis*, CYP74A1 plays a key role in the early steps of jasmonate synthesis. This atypical P450 is an allene oxide synthase that catalyses dehydration of the 13-hydroperoxide of linolenic acid to yield an unstable C18 allene oxide (Stumpe and Feussner, 2006). A major breakthrough was the discovery of JAR1, a jasmonic acid-amino acid synthetase able to conjugate jasmonic acid to isoleucine and to other amino acids (Staswick and Tiryaki, 2004). Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile) was later identified as the endogenous bioactive jasmonate bearing hormonal properties (Thines et al., 2007; Fonseca et al., 2009b). The mechanisms of JA-Ile regulation of jasmonate responses are well documented (Katsir et al., 2008a). Briefly, under low JA-Ile levels, jasmonate ZIM-domain (JAZ) repressor proteins prohibit transcription of jasmonate-responsive genes by blocking transcription factors (e.g. MYC2). In the presence of JA-Ile, the Coronatine-Insensitive 1 (COI1) receptor interacts with JAZ proteins and directs their ubiquitination and degradation by the 26S proteasome, leading to de-repression of target genes. In contrast, until recently, metabolic turnover or inactivation of JA-Ile was poorly understood. Three independent reports described *Arabidopsis* CYP94B3 as a JA-Ile hydroxylase responsible for 12OH-JA-Ile accumulation after wounding (Koo et al., 2011; Kitaoka et al., 2011; Heitz et al., 2012). CYP94B3 can also catalyse carboxylation of JA-Ile but a second member of CYP94 family, CYP94C1, is the major enzyme involved in this latter reaction (Heitz et al., 2012). Minor involvement of CYP94B1 in JA-Ile catabolism was also recently reported (Koo et al., 2014). A second catabolic pathway proceeds through cleavage of the JA-Ile conjugate by the amido-hydrolases IAR3 and ILL6 and significantly impacts hormone homeostasis (Widemann et al., 2013). We recently showed that these JA-Ile catabolic pathways also operate upon microbial challenge; for example, CYP94B3 and CYP94C1 shape the JA profile triggered upon infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* and attenuate defense/resistance responses (Aubert et al., 2015).

So far, the JA-Ile conjugate has been the focus of most research in this area; however it is likely that other jasmonoyl-amino acids are involved in jasmonate-related hormonal regulation. This hypothesis is supported by the broad substrate specificity of JAR1 enzyme, which is able to conjugate about half of the existing amino acids to JA *in vitro*, with varying efficiency (Staswick and Tiryaki, 2004). The potential biological properties and homeostasis of these JA-amino acid conjugates have not yet been extensively explored. These compounds have not all been detected in *Arabidopsis* seedlings, likely because they might be present in specific organs, development stage or environmental conditions. A few conjugates have been reported for their particular occurrence or biological properties. For example, in rice, JA-Phe elicits strongly the biosynthesis of the flavonoid phytoalexin sakuranetin (Tamogami et al., 1997). JA-Trp has been described as an auxin inhibitor (Staswick, 2009), causing agravitropic root growth. In the wild species *Nicotiana attenuata*, JA-Gln accumulates strongly upon wounding, to even higher levels than JA-Ile (Wang et al., 2007), and JA-Tyr is an abundant conjugate in broad bean (*Vicia faba*) flowers (Kramell et al., 2005). In a general survey, JA-Phe was shown to belong to a set of JA-amino acid conjugates which accumulate in wounded *Arabidopsis* leaves (Koo et al., 2009). Its exact biological properties in this species are unknown, but Fonseca et al. (2009b) have shown that JA-Phe can induce JA responses in a root inhibition assay. JA-Phe is thus a potential regulator that justifies additional analysis. The occurrence of such a diverse JA-amino acid repertoire in different plant sources suggests the existence of metabolic clearance mechanisms to control their abundance and/or biological activity. Kitaoka et al. (2014) have shown

recently that JA-Phe is a substrate of CYP94B3, but the full complement of oxidized derivatives produced as well as the contribution of other JA-amino acid oxidases were not investigated. CYP94 genes appear to be well conserved among plant species (Koo and Howe, 2012), but very little biochemical data are available so far on enzymes from such diverse plants (Pinot and Beisson, 2011), so that the three characterized *Arabidopsis* CYP94 proteins remain relevant models to further study the oxidative action of CYP94 on JA-amino acid substrates.

The present report describes extensive analysis of JA-Phe metabolism by three members of the AtCYP94 family that were previously characterized as JA-Ile oxidases. Yeast-expressed recombinant CYP94B1, CYP94B3, CYP94C1 enzymes were able to generate *in vitro* a specific blend of derivatives, differing in their oxidation status at C12 carbon, and bearing hydroxyl to carboxylic functions. Consistently, JA-Phe and its oxidized forms accumulated in *Arabidopsis* leaves after wounding as well as upon infection by the fungus *Botrytis cinerea*. Over-expressor and KO lines were used to decipher distinct roles of CYP94s enzymes in the maintenance of JA-Phe homeostasis. In addition, we show that CYP94-mediated catalysis generates the formation of an intermediate aldehyde form of JA-Phe. With JA-Ile as substrate, 12CHO-JA-Ile was also formed, and this previously overlooked aldehyde was found to accumulate in wounded leaves. The possible biological significance of the multiple oxidation steps of jasmonoyl-amino acids is discussed and we hypothesize that due to an unusually low substrate specificity, members of CYP94 family might be involved in the general metabolism of jasmonate conjugates, providing a metabolic control of hormonal activity. A phylogenetic analysis of the CYP94 family has been performed in order to investigate the presence and importance of its members in the plant kingdom. This analysis shows a highly dynamic evolution, likely reflecting adaptive functions.

2. Results

2.1. Phylogenetic analysis of the CYP94 family in flowering plants

We mined genomic data available in the Phytozome 10.1 database through BLASTp analysis using *Arabidopsis* CYP94C1 sequence as bait. Consistent with previously published data (Koo and Howe, 2012), this search failed to identify any relevant CYP94 homolog in the six referenced algae genomes. First traces of homologous sequences were found in the basalmost group of land plants (i.e. Bryophytes), with two putative CYP94 genes present in the moss *Physcomitrella patens*, suggesting that the emergence of the family was instrumental to the adaptation to terrestrial conditions. To reconstruct the evolutionary history of the CYP94 family in angiosperms, we implemented a maximum likelihood (ML) method using 136 CYP94 sequences derived from 15 different flowering plant species, including the previously characterized CYP94A1 from *Vicia sativa* (Pinot et al., 1998). To polarize the evolutionary scenario, sequences from the two *P. patens* CYP94 homologs were added to the analysis. ML tree structure indicates early duplication events that took place prior to the split of Monocots and Dicots, giving rise to two major clades clustering CYP94D and CYP94E on one hand, and CYP94A, CYP94B and CYP94C on the other hand (Fig. 1). This organization is consistent with the fact that based on *Arabidopsis* biochemical and genetic analysis (Heitz et al., 2012), JA-Ile oxidation activity is associated with the CYP94B and CYP94C subclades, while enzymes of the CYP94D subclades do not metabolize JA-Ile (E. Widemann and Y. Aubert, unpublished). This phylogenetic survey indicates that CYP94B and CYP94C enzymes are widespread across plant species and that new characteristics of such enzymes inferred from

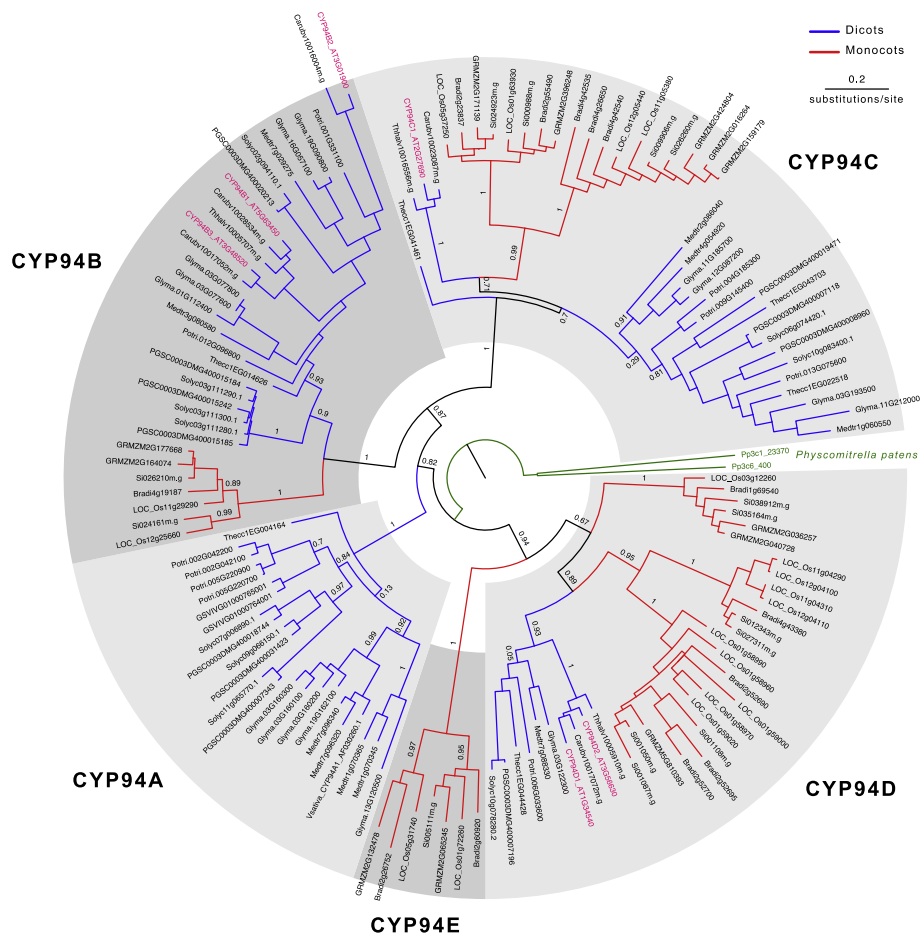


Fig. 1. Phylogeny of the CYP94 family in Angiosperms. Protein maximum likelihood tree was built using 138 sequences derived from 16 different plant species. Tree was rooted on the *Physcomitrella patens* branch and drawn to scale. Values from approximate likelihood-ratio tests are indicated on main branches. *Arabidopsis thaliana* CYP94 family members are highlighted in pink. Accession number is given for each CYP94 homolog. Bradi, *Brachypodium distachyon*; Carub, *Capsella rubella*; Glyma, *Glycine max*; GRMZM, *Zea mays*; GSVIV, *Vitis vinifera*; LOC_Os, *Oryza sativa*; Medtr, *Medicago truncatula*; PSGC, *Solanum tuberosum*; Potri, *Populus trichocarpa*; Si, *Setaria italica*; Solyc, *Solanum lycopersicum*; Thecc, *Theobroma cacao*; Thhalv, *Eutrema salsugineum*; Vsativa, *Vicia sativa*. Sequences are available in [Supplementary Information S1](#). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Arabidopsis studies may reflect conserved features of JA-amino acid oxidation in plants.

2.2. Catalytic properties of CYP94C1, CYP94B1 and CYP94B3

To test the capacity of CYP94 enzymes to oxidize JA-Phe, CYP94C1 was first analyzed because it displayed previously the highest activity in the yeast system with JA-Ile, generating two oxidation products (Heitz et al., 2012). *In vitro* incubations of JA-Phe with microsomes of recombinant yeast expressing CYP94C1 were performed. Incubation media was extracted and metabolites were resolved by LC-MS/MS analysis. A NADPH-dependent peak detected in SCAN mode was observed at 8.63 min (Supplementary Fig. S1). The ion spectra extracted from the NADPH-dependent peak observed in SCAN, in positive as well as in negative mode, are presented in Supplementary Fig. S2. The parent ions corresponding to predicted oxidation products 12OH-JA-Phe ($m/z = 373$) and 12COOH-JA-Phe ($m/z = 387$) were readily detected in these spectra. By investigating ions found in the mass spectrum of the 8.63 min peak, we also detected the formation of an additional compound that had the characteristics of the aldehyde 12CHO-JA-Phe (Figs. 2C and 3). Aldehyde function in this compound was confirmed using a methoxamination derivatization procedure recently adapted to jasmonates and that allows to discriminate compounds differing by the number of carbonyl

functions (Widemann et al., 2015). Multiple Reaction Monitoring (MRM) mass transitions were optimized for each of these compounds (see Experimental section), and allowed for sensitive and specific detection of underivatized 12OH-JA-Phe, 12CHO-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe in incubation media (Fig. 2B–D, for structures, see Fig. 3). None of these metabolites were formed in absence of NADPH (Fig. 2F–H) or in incubations performed with microsomes prepared from yeast transformed with a void plasmid (Fig. 2J–L), ensuring that they originated from enzymatic reaction catalyzed by CYP94C1. With the exception of 12COOH-JA-Phe not produced in incubation with CYP94B1 (Fig. 4D), these oxidized metabolites were also formed, only in presence of NADPH, by CYP94B1 (Fig. 4B and C) and by CYP94B3 (Fig. 4J–L). They were not formed with microsomes from yeast transformed with a void plasmid (data not shown).

The occurrence of 12CHO-JA-Phe intermediate prompted us to re-investigate detailed catalysis of JA-Ile by the 3 CYP94 enzymes. We incubated microsomes from yeast transformed with either CYP94B1, CYP94B3 or CYP94C1 with JA-Ile and conducted LC-MS/MS analysis to assess its production. As presented in Fig. 5, the JA-Ile-derived aldehyde was indeed formed by the three CYP94 members, only in presence of NADPH, as attested by full-scale y-axis representation.

Finally, we incubated all 3 enzymes with either substrate, and compared MRM signal for the 3 respective oxidation products

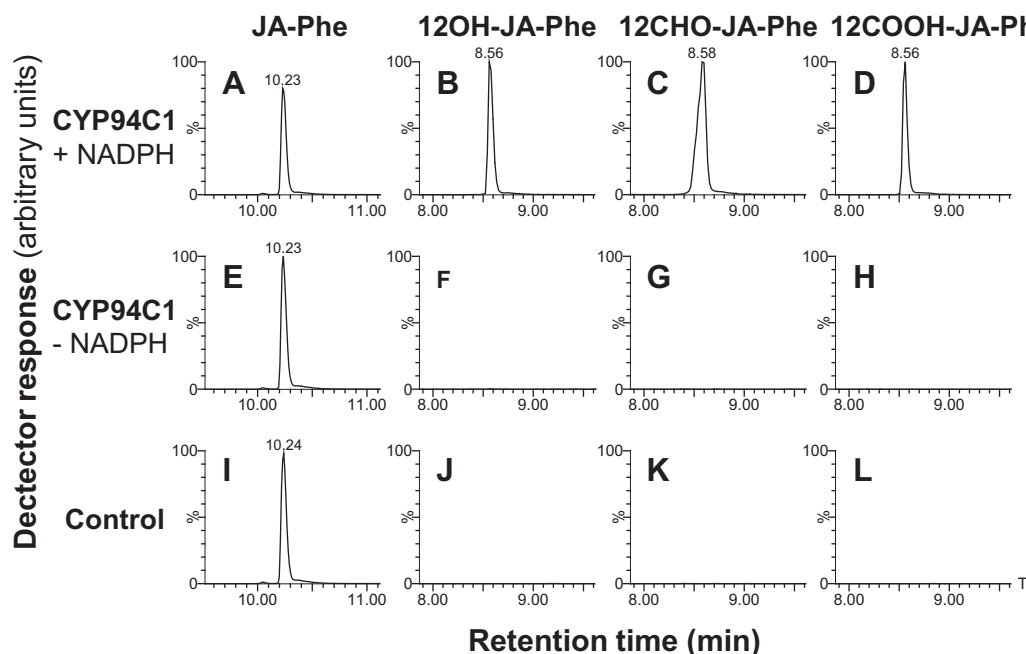


Fig. 2. UPLC-MS/MS analysis of metabolites produced by CYP94C1 with JA-Phe. JA-Phe was incubated with microsomes of yeast expressing CYP94C1 in presence (panels A–D) or in absence (panels E–H) of NADPH. Control incubations were also performed in presence of NADPH with microsomes of yeast transformed with a void plasmid (panels I–L). JA-Phe (100 μ M) and microsomes (0.4 mg protein) were incubated for 20 min at 27 $^{\circ}$ C. Residual substrate (JA-Phe) and metabolites (12OH-JA-Phe, 12CHO-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe) were identified by LC-MS/MS based on their retention times and detection in multiple reaction monitoring.

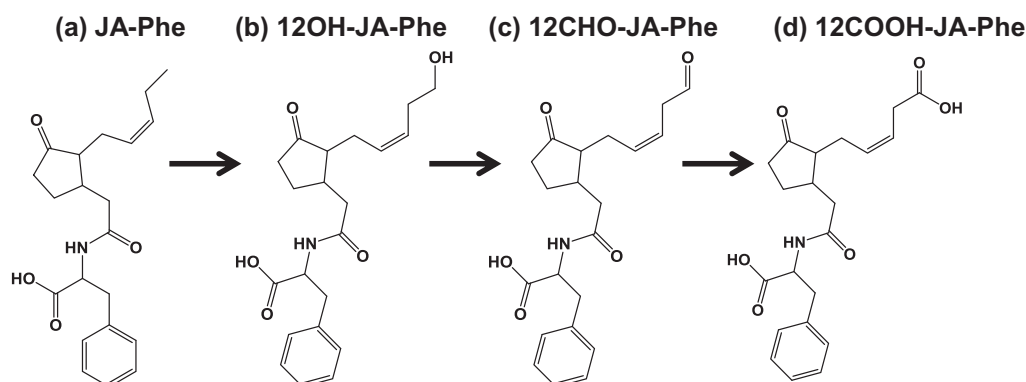


Fig. 3. Structures of (a) Jasmonoyl-Phenylalanine, (b) 12-Hydroxy-Jasmonoyl-Phenylalanine; (c) 12-Oxo-Jasmonoyl-Phenylalanine and (d) 12-Carboxy-Jasmonoyl-Phenylalanine.

(Supplementary Fig. S3). Due to different detector responses and absence of synthetic standards for some of the compounds, particularly the aldehydes, graphs can only be interpreted semi-quantitatively, by comparing areas in a given panel. The data show that the closely related CYP94B1 and CYP94B3 mostly produce hydroxyl derivatives of JA-Phe (Supplementary Fig. S3A) and JA-Ile (Supplementary Fig. S3B) *in vitro*, whereas CYP94C1 readily catalyzed the formation of carbonyl (aldehyde) and carboxyl derivatives.

2.3. JA-Phe, JA-Ile and their oxidized derivatives accumulate in wounded leaves

In order to determine whether JA-Phe and its oxidized derivatives accumulate post-wounding in Arabidopsis leaves, mechanical damage was inflicted with forceps, mimicking attacks by herbivorous insects. Leaves were harvested at different times post-wounding and extracted for jasmonate content determination

by LC-MS/MS analysis. As shown in Fig. 6A, JA-Phe accumulated rapidly and steadily increased until 4 h post-wounding. This pattern is distinct from that of JA-Ile which is more transient, reaching a maximum 1 h post-wounding before decreasing (Fig. 6B and Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013). Production of these two jasmonoyl-amino acids also differed in terms of quantity, JA-Ile being approximately 2 orders of magnitude more abundant than JA-Phe (Fig. 6A and B). One hour post-wounding, 12OH-JA-Phe (Fig. 6C) and 12COOH-JA-Phe (Fig. 6G) began to accumulate, and increased with the same patterns as similar JA-Ile derivatives (Fig. 6D and H). In addition to the expected 12OH-JA-Ile (Fig. 6D) and 12COOH-JA-Ile (Fig. 6H) accumulation of 12CHO-JA-Ile (Fig. 6F) was also observed. The corresponding aldehyde of JA-Phe remained just above background levels (Fig. 6E). As mentioned above, level of JA-Phe measured post-wounding is much lower than the one of JA-Ile. Aldehydes being unstable compounds, it is conceivable that level of 12CHO-JA-Phe originating from JA-Phe was present at detection threshold.

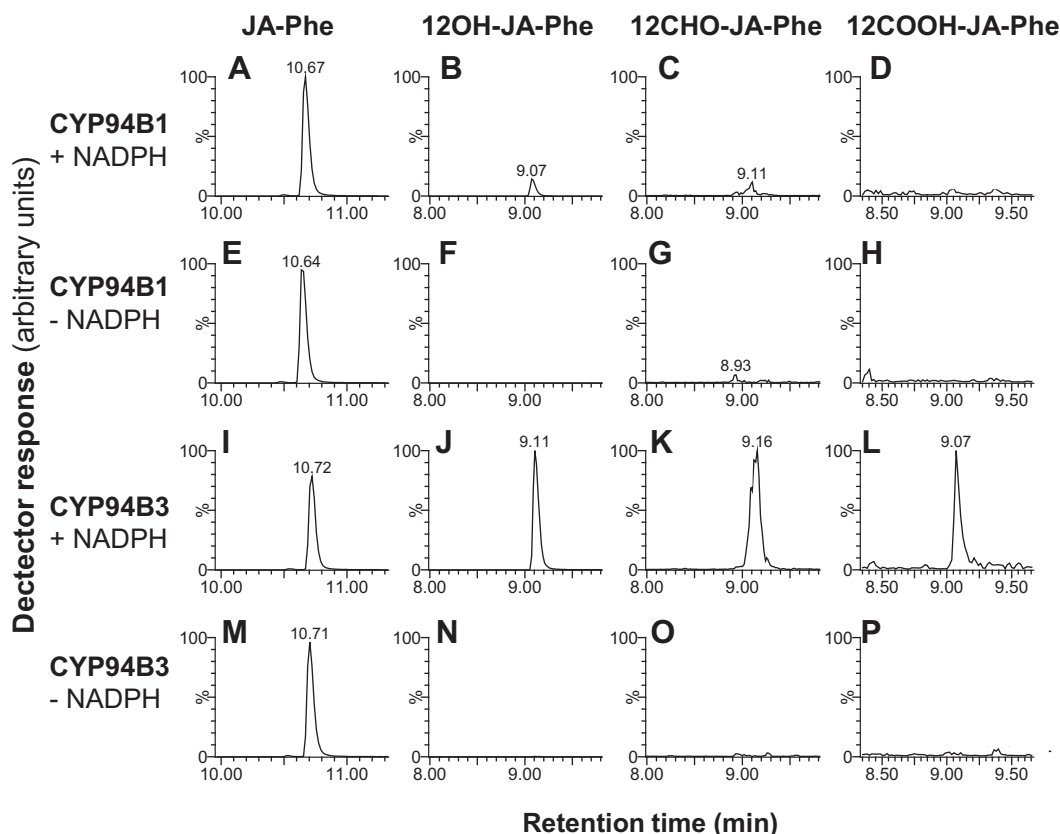


Fig. 4. UPLC-MS/MS analysis of metabolites produced by CYP94B1 and CYP94B3 with JA-Phe. JA-Phe was incubated with microsomes of yeast expressing CYP94B1 in presence (panels A–D) or in absence (panels E–H) of NADPH and with microsomes of yeast expressing CYP94B3 in presence (panels I–L) or in absence (panels M–P) of NADPH. JA-Phe (100 μ M) and microsomes (0.4 mg protein) were incubated for 20 min at 27 °C. Residual substrate (JA-Phe) and metabolites (12OH-JA-Phe, 12CHO-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe) were identified by LC-MS/MS based on their retention times and detection in multiple reaction monitoring.

After wounding we determined 3 nmol/g FW of JA-Ile (Fig. 6B) which correspond ca. to a concentration of 3 μ M and in the case of JA-Phe a concentration of 20 nM can be estimated (Fig. 6A). These have been determined in total leaves, at the wounding site we can assume that the jasmonoyl concentration is much higher and closer to what was used *in vitro* (100 μ M) for enzymatic measurements.

2.4. CYP94B3 and CYP94C1 are responsible for the *in vivo* production of oxidized derivatives of JA-Phe and JA-Ile after wounding

To determine if CYP94B3 and CYP94C1 contribute to JA-Phe oxidation in plants, we wounded WT plants along with a series of mutants: *cyp94c1* and *cyp94b3* single mutants carrying a T-DNA insertion, *cyp94b3c1* double mutant and two lines over-expressing either CYP94C1 (C1-OE) or CYP94B3 (B3-OE) under the cauliflower mosaic virus 35S promoter (Heitz et al., 2012). Compared to WT plants, the level of 12OH-JA-Phe was drastically reduced in *cyp94b3* and not affected in *cyp94c1* (Fig. 7A). The minor role of CYP94C1 in 12OH-JA-Phe accumulation is also supported by similar levels of this compound in *cyp94b3c1* and *cyp94b3* mutants (Fig. 7A). While CYP94C1 overexpression is sufficient to boost full oxidation of JA-Phe to COOH-JA-Phe, a similar excess of 12COOH-JA-Phe in the B3-OE line (Fig. 7B, 2h) may arise from oxidation by native CYP94C1 of an excess of 12OH-JA-Phe produced by transgenic CYP94B3. As expected from *in vitro* results, mutants lacking CYP94C1 (*cyp94c1* and *cyp94b3c1*) accumulated much less 12COOH-JA-Phe than WT plants (Fig. 7B).

The CYP94B3- and CYP94C1-dependence of post-wounding accumulation of 12CHO-JA-Ile levels *in planta* was examined

genetically. Its accumulation detected in WT plants (Fig. 8B) was nearly abolished in *cyp94b3* and *cyp94b3c1* mutants but less affected in *cyp94c1* (Fig. 8B). This, together with the fact that formation of 12OH-JA-Ile is drastically affected in these mutants (Fig. 8A), suggests that the aldehyde formed *in vivo* mainly originates from 12OH-JA-Ile produced by CYP94B3. Four hours post-wounding, both lines overexpressing CYP94B3 or CYP94C1 contained less aldehyde than WT plants. This might be explained by its further oxidation into 12COOH-JA-Ile.

2.5. JA-Phe and its oxidized derivatives accumulate during infection by *Botrytis cinerea*

Next, JA-Phe oxidation was investigated upon infection with the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*, a pathosystem that was recently shown to trigger intense jasmonate metabolism (Aubert et al., 2015). Infected leaves were harvested 3 days post-inoculation when large necrotic lesions are visible, prior to metabolite extraction for JA-Phe, 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe analysis. These compounds were below detection limit in non-infected leaves (data not shown). As shown in Fig. 9A–C, in WT plants the 3 conjugates were accumulated in infected plants, JA-Phe levels being about 3-fold higher than 4 h post-wounding. JA-Phe levels (Fig. 9A) were not statistically affected in CYP94B3- or CYP94C1-deficient plants but a reduction by ca. 50% in B3-OE or C1-OE lines was indicative that JA-Phe turnover is boosted in these latter plants. Compared to WT infected leaves, accumulation of the hydroxyl derivative 12OH-JA-Phe (Fig. 9B) was undetectable in *cyp94b3c1* while both OE lines exhibited an increased 12OH-JA-Phe content. The most oxidized 12COOH-JA-Phe

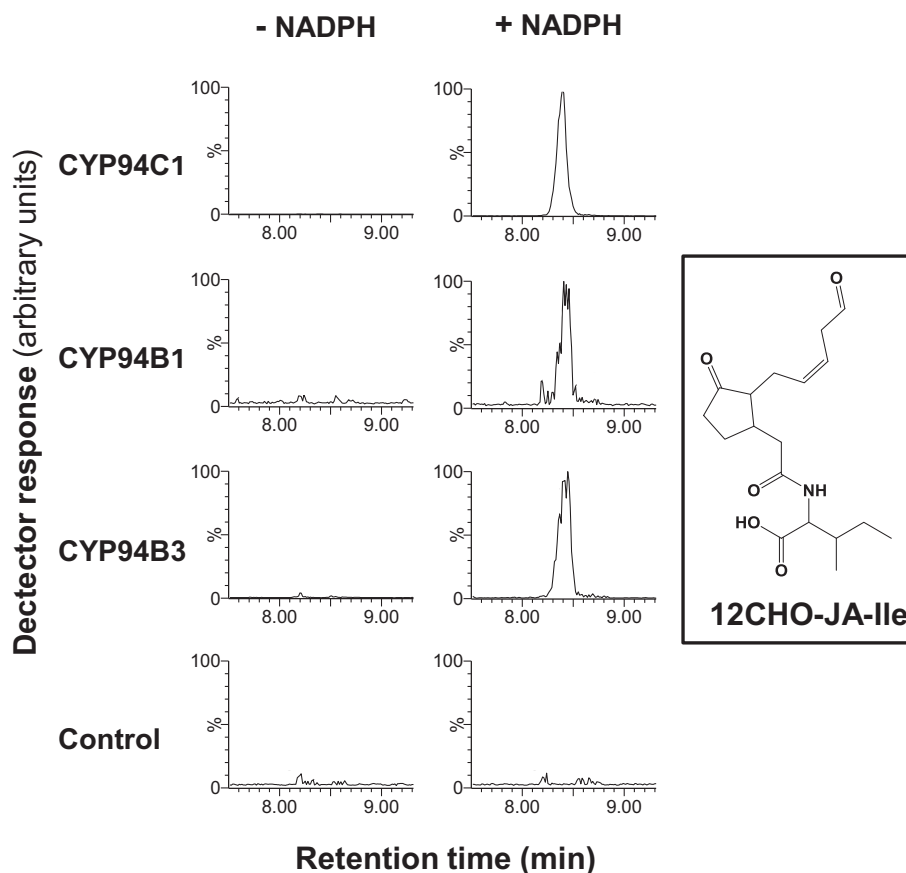


Fig. 5. UPLC-MS/MS analysis of 12CHO-JA-Ile produced by CYP94C1, CYP94B1 and CYP94B3. JA-Ile (100 μ M) was incubated with microsomes of transformed yeast in presence (right column) or in absence (left column) of NADPH. Microsomes (0.4 mg protein) were incubated with JA-Ile (100 μ M) for 20 min at 27 $^{\circ}$ C. 12CHO-JA-Ile was identified by LC-MS/MS.

hyperaccumulated in C1-OE plants (Fig. 9C, note log10 scale) and was not detected in *cyp94c1* and *cyp94b3c1*.

3. Discussion and conclusion

Understanding the strategies used by plants to survive land colonization ca. 400 million years ago has always been a challenging task for biologists. During the last two decades, a tremendous amount of efforts devoted to this task have focused on P450 enzymes. Hormone level control is of primary importance in this adaptation. In this context, P450s play a crucial role and have been shown to be involved in synthesis and catabolism of major hormones (Mizutani and Ohta, 2010). For example, involvement of at least 10 P450s belonging to 5 distinct subfamilies in metabolism of brassinosteroid in *Arabidopsis* illustrates the key roles of P450s in maintenance of hormone homeostasis (Nomura and Bishop, 2006).

JAs are mainly associated with plant defence but essential roles have also been described in developmental processes (Wasternack and Hause, 2013). JAs all originate from jasmonic acid whose biosynthesis, properties and mechanism of action have been extensively studied. However, knowledge on jasmonate catabolism and inactivation remains fragmentary. The oxidative action of CYP94 enzymes on JA-Ile represents a unique model of hormone catabolism/inactivation because it operates specifically on a bioactive amino acid conjugate. Similar control mechanisms may exist for other conjugates and more efforts are needed to expand our knowledge on the diversity of JA-amino acid enzymatic turnover.

The set of JA conjugates accumulating may comprise storage or transport forms as well as genuine regulators. The work presented here focused on JA-Phe, a conjugate described in several plant species. Previous indications are in favor of a biological importance of this molecule (Staswick and Tiriyaki, 2004; Fonseca et al., 2009b; Koo et al., 2009). Kitaoka et al. (2014) have attempted to associate JA-Phe hydroxylation by CYP94B3 with loss of biological activity in a classical root inhibition assay, but evidence was limited, pointing to the need of alternative physiological readouts. In pull-down assays, JA-Phe failed to mediate interaction of COI1 with JAZ1 or JAZ3, an event underlying JA-Ile signaling (Thines et al., 2007; Katsir et al., 2008b). It is conceivable that for biological activity, as proposed by Thines et al. (2007), JA-Phe promotes interaction of COI1 with other members of the JAZ family or even activate other perception systems.

In the context of stress responses, different accumulation patterns after wounding (Fig. 6) supports distinct roles for JA-Ile and JA-Phe. This hypothesis is corroborated by the higher accumulation of JA-Phe and its oxidized derivatives after *Botrytis* infection (Fig. 9), which suggests a potential involvement of JA-Phe in responses to pathogens. Formation of oxidized derivatives likely reflects the necessity for the plant to maintain a precise JA-Phe balance.

Based on previous characterization of CYP94 as JA-Ile oxidases (Heitz et al., 2012), capacity of three members of the CYP94 family to metabolize JA-Phe was investigated. *In vitro* biochemical investigation (Figs. 1 and 3) revealed the differential capabilities of CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 to oxidize this conjugate, further extending initial data by Kitaoka et al. (2014). The combination of

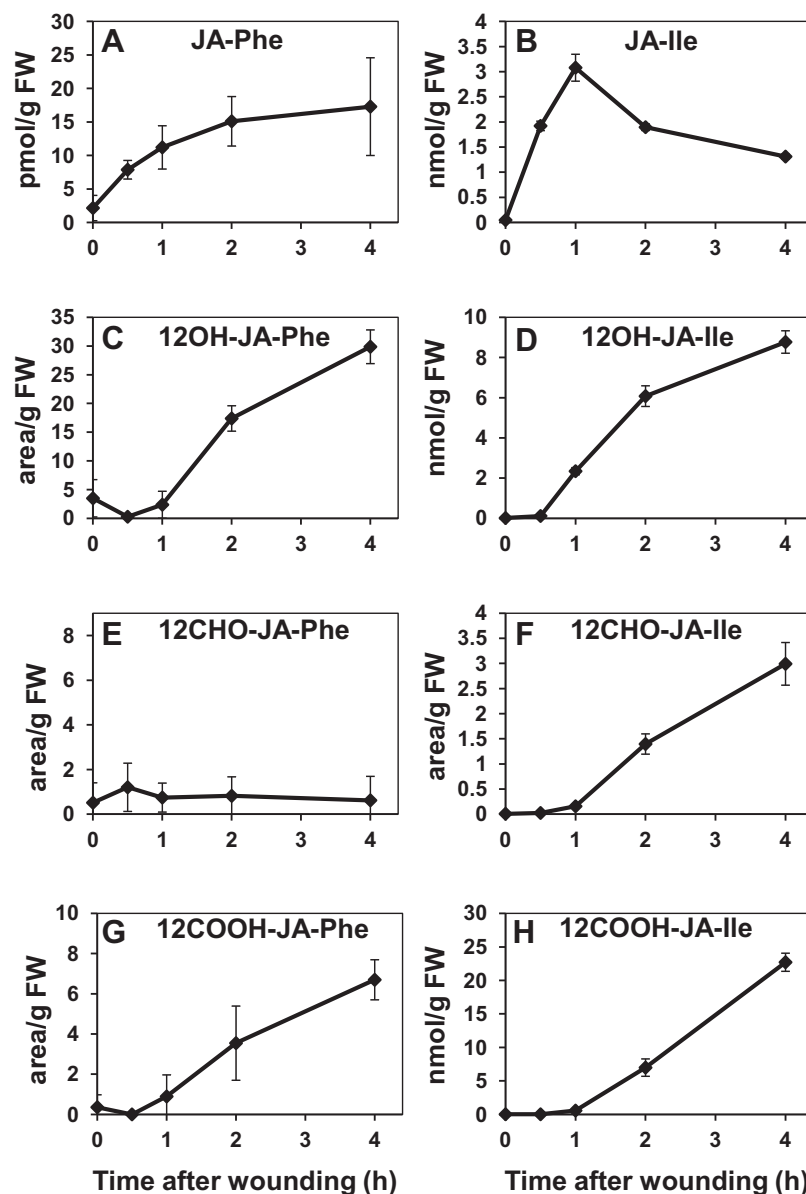


Fig. 6. Accumulation of JA-Phe, JA-Ile and their oxidized derivatives in wounded leaves. Leaves of 6–7 weeks-old *Arabidopsis* were wounded with forceps, harvested at different times post-wounding and analyzed for jasmonate content by LC-MS/MS. JA-Phe and its oxidized derivatives levels are represented in left panels; JA-Ile and its oxidized derivatives levels are represented in right panels. Levels are expressed in area/g fresh weight when no standards were available. Data are mean \pm S.E. from three biological samples.

various enzymatic assays and genetic analysis of CYP94B3- and CYP94C1-misexpressing plant lines highlighted a situation reminiscent of the action of these enzymes on JA-Ile. CYP94B1 and CYP94B3 are mainly devoted to hydroxylation of JA-Phe, whereas CYP94C1 is more dedicated to carboxylation. The dominant action of CYP94C1 on JA-Phe turnover in response to *B. cinerea* infection is supported by the preferential expression of this gene upon fungal infection (Aubert et al., 2015).

Generally, a simple hydroxylation of the active hormone is sufficient to suppress its activity, such as in the cases of abscisic acid 8-hydroxylation by CYP707A2 (Millar et al., 2006) or inactivation of brassinosteroid activity by CYP734A1 (Turk et al., 2005). In the *Arabidopsis* jasmonate pathway, a more complex situation emerges where distinct CYP94s are specialized either in hydroxylation or in carboxylation. The current model predicts that hydroxylation of JA-Ile does not represent exclusively catabolism since 12OH-JA-Ile intermediate retains some biological activity in CO11-JAZ

co-receptor assembly assays (Koo et al., 2011, 2014; Aubert et al., 2015) whereas carboxylation completely prevents *in vitro* interaction (Koo et al., 2014) and gene-inducing activity (Aubert et al., 2015). The finding that JA-Phe also undergoes a similar metabolic fate is intriguing and opens the possibility that its two-step oxidation by CYP94 enzymes modifies an associated biological activity.

Noteworthy, using a specific methoxyamination procedure, we showed in the present work that CYP94 jasmonate oxidation proceeds through the formation of aldehyde intermediates. We report post-wounding 12CHO-JA-Ile accumulation (Fig. 6F), which is probably the first jasmonate aldehyde reported *in planta*. Complete oxidation of a methyl to a carboxyl generally occurs via formation of hydroxyl and aldehyde intermediates. In wounded plants 12-CHO-JA-Phe was present at limit of detection and did not accumulate (Fig. 6E). One explanation could be that it is further metabolized by P450s with a much higher efficiency than 12-CHO-JA-Ile. In addition, JA-Phe is 2 orders of magnitude less

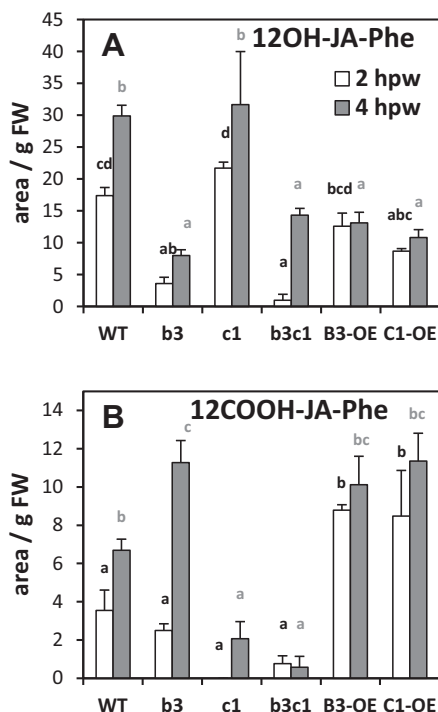


Fig. 7. Involvement of members of CYP94 family in post-wounding production of 12OH-JA-Phe and 12 COOH-JA-Phe. Leaves of 6–7 weeks-old *Arabidopsis* were wounded with forceps, harvested at different times post-wounding and analyzed for 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe content by LC-MS/MS analysis. WT, wild type; b3, *cyp94b3*; c1, *cyp94c1*; b3c1, *cyp94b3c1*, B3-OE, mutant overexpressing *CYP94B3*; C1-OE, mutant overexpressing *CYP94C1*. Histograms represent the mean \pm SEM of three measurements. White (2 h post wounding) or black (4 h post-wounding) histograms labeled with different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) as determined by two-way ANOVA with Bonferroni post-tests.

abundant than JA-Ile (Fig. 6A and B), this can make the detection of the corresponding aldehyde much more difficult. Schneider et al. (1999) showed that the bacterial cytochrome P450BM-3 catalyzed such a reaction and proposed that in the pathway leading from hydroxyl to carboxyl, the enzyme hydroxylates the carbon carrying a hydroxyl group. The resulting gem-diol intermediate, well documented in reactions catalyzed by P450s, especially in the pathway of steroid metabolism (Reviewed in Scheller et al., 1998) will then rearrange to aldehyde and carboxyl. Initial characterization of CYP94C1 on linear fatty acids also resulted in aldehyde formation (Kandel et al., 2007). Detection of aldehyde intermediates in *in vitro* reaction could be interpreted as a premature metabolite release from enzyme active site. However, detection of this compound in plant extracts and its dependence on CYP94B3 activity suggests a controlled formation that may have biological significance. It would be interesting to determine if other aldehyde JA-amino acid conjugates occur in plant tissues. Also, availability of synthetic references would clarify the exact abundance of these novel forms. In the context of plant stress, it is noteworthy that being electrophilic, the aldehyde functional group represents a target for nucleophilic addition and could potentially interact with amino groups of lysine and arginine. Schaunstein et al. (1977) demonstrated the implication of aldehydes in cross-linkage of protein and in interference with protein synthesis.

Reactions catalyzed by P450s are irreversible and thermodynamically disfavoured (Schlichting et al., 2000). To circumvent this problem, plants have evolved P450s characterized by high substrate specificity, where the substrate is tightly bound in the active site allowing positioning of the targeted atom next to the ferryl-oxo moiety. This is well illustrated by P450s involved in

brassinosteroid pathways (Mizutani and Ohta, 2010; Nomura and Bishop, 2006): where related P450s are able to discriminate almost identical substrates, i.e. CYP90B1 catalyses C22-hydroxylation of campesterol and CYP90D1 catalyses C23-hydroxylation of 6-deoxy campesterol. Initial characterization of CYP94C1 on linear fatty acids suggested that the active site of this enzyme had an unusual relaxed conformation because it could accommodate aliphatic substrates with chain length ranging from C12 to C18 with various numbers of unsaturations (Kandel et al., 2007). The present work confirms that members of the CYP94 family exhibit a broad substrate specificity within the JA-amino acid conjugate family. This view is supported by the work of Kitaoka et al. (2014) who showed that CYP94B3 hydroxylates JA-Ile and JA-Phe as well as JA-Leu and JA-Val. As free JA is not metabolized by CYP94C1 and CYP94B3 (Heitz et al., 2012), an amide conjugate structure seems to be necessary to position properly C12 carbon of the JA moiety in the active site of CYP94 enzymes. Different hydrophobic lateral chains

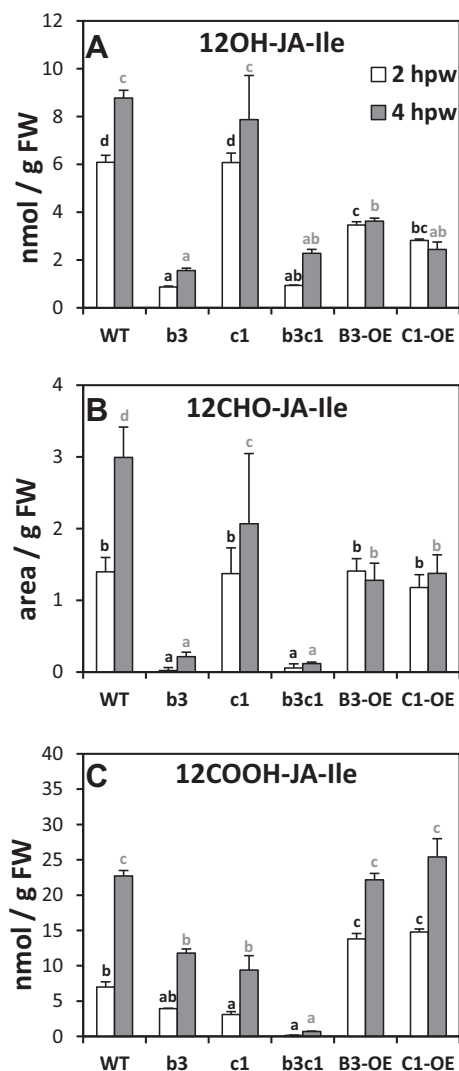


Fig. 8. Involvement of members of CYP94 family in post-wounding production of 12CHO-JA-Ile. Leaves were wounded with forceps, harvested at different time post-wounding and analyzed for 12OH-JA-Ile, 12CHO-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile content by LC-MS/MS analysis. WT, wild type; b3, *cyp94b3*; c1, *cyp94c1*; b3c1, *cyp94b3c1*, B3-OE, mutant overexpressing *CYP94B3*; C1-OE, mutant overexpressing *CYP94C1*. Histograms represent the mean \pm SEM of three measurements. White (2 h post wounding) or black (4 h post wounding) histograms labeled with different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) as determined by two-way ANOVA with Bonferroni post-tests.

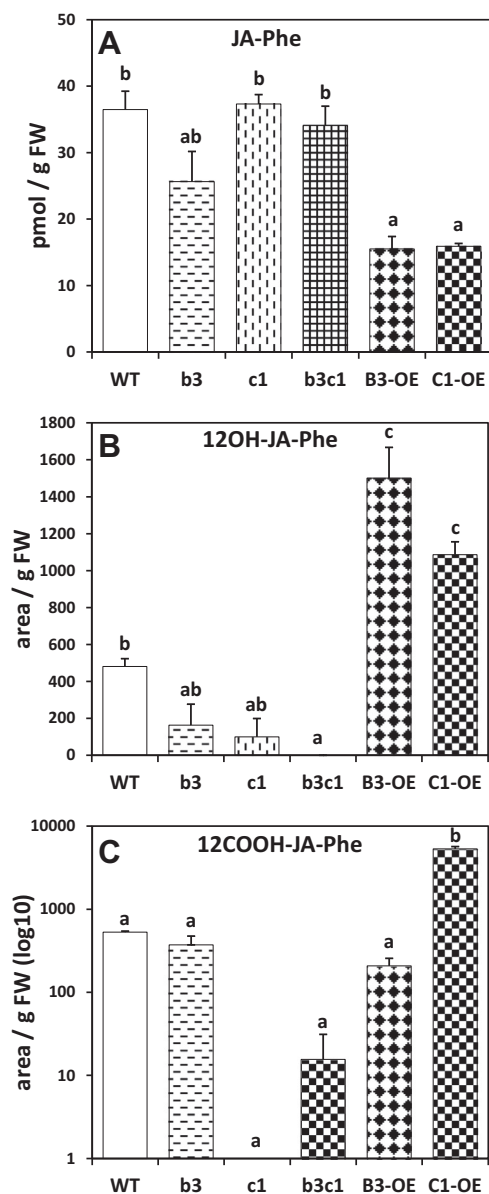


Fig. 9. Effect of CYP94B3 and CYP94C1 expression on JA-Phe and its oxidized derivatives accumulation in *Arabidopsis* leaves infected by *Botrytis cinerea*. Droplets of 5 μ l containing *Botrytis cinerea* spores were deposited on *Arabidopsis* leaves which were harvested 3 days post-inoculation. Non-inoculated leaves were used as control. Jasmonates of leaves were then extracted and analyzed for JA-Phe and its oxidized derivatives content by LC-MS/MS analysis. WT, wild type; b3, *cyp94b3*; c1, *cyp94c1*; b3c1, *cyp94b3c1*, B3-OE, mutant overexpressing CYP94B3; C1-OE, mutant overexpressing CYP94C1. NB: in panel C, ordinate axis is in log₁₀ scale. Histograms represent the mean \pm SEM of three measurements. Histograms labeled with different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

of the amino acid appear compatible with this function. Since multiple JA-amino acid conjugates can be oxidized by a given CYP94 enzyme, these activities cannot be uncoupled easily in mutant plants to distangle functions of individual conjugates. In this respect, it is currently unknown if CYP94 substrate specificities evolved in parallel with those of JAR1 or related conjugating enzymes that determine the spectrum of JA amino acid conjugates present in a given plant tissue.

A phylogenetic exploration of the CYP94 gene family has shown first traces of putative CYP94 genes in the moss *P. patens* suggesting appearance of this family in plants, during land colonization (Fig. 1

and Koo and Howe, 2012). The early and conserved diversification suggests that CYP94 subfamilies acquired novel and conserved functions. Furthermore, within each subfamily, loss events (e.g. for CYP94A and CYP94E) and duplication bursts occurred (Fig. 1), which is indicative of a highly dynamic evolution of the family likely in link with adaptive functions. Interestingly, metabolic analysis has detected the presence of oxophytodienoic acid, but not JA or JA-Ile in moss (Stumpe and Feussner, 2006). This means that the capacity to oxidize JA-amino acid conjugates was probably acquired later, with the evolution of the CYP94B and C subclades. These latter are very expanded subgroups, suggesting that their members fulfill similar functions in JA homeostasis across plant species. The A subclade, that is absent from *Arabidopsis*, has not yet been genetically tackled, but we previously showed that CYP94A1 from *Vicia faba* (Kastner et al., 2010) and CYP94A5 from *Nicotiana tabacum* (Le Bouquin et al., 2001) act as fatty acid hydroxylases that may be associated with cutin monomer synthesis. Finally, monocot-specific subclade E and conserved subclade D substrates are still unknown. Clearly, more biochemical and genetic characterization is needed to understand the fascinating diversity of CYP94 functions in plants.

Conjugates of amino acids with hormones or with lipid derivatives are also present in bacteria (Roberto et al., 1990) as well as in animals (Salmon and Higgs, 1987). In the latter case, they are most often represented by leukotrienes which are inflammatory mediators that result from the conjugation of arachidonic acid and various amino acids (i.e. cysteine, glycine, glutamic acid). P450s also play a role in leukotriene inactivation (Sehgal et al., 2011). It is noteworthy that arachidonic acid is metabolized to prostaglandins by mechanisms very similar to the production of jasmonic acid from linolenic acid in plants. These similar metabolic pathways are conserved in plants, bacteria and animals, suggesting they have fundamental and essential functions.

4. Experimental

4.1. Cloning of CYP94C1, CYP94B3 and CYP94B1

Coding sequences of CYP94C1 and CYP94B3 were amplified from an *Arabidopsis* genomic library and cloned into the plasmid pYeDP60 as described in Kandel et al. (2007) and in Heitz et al. (2012) respectively. The coding sequence of CYP94B1 (At5g63450) was generated by PCR amplification from a genomic DNA library of *Arabidopsis* ecotype Columbia-0, using primers designed to introduce a USER cloning site, according to Geu-Flores et al., 2007 (forward primer: 5' GGCTTAAUATGGAAATGCTCAACGCAA-3' and reverse primer: 5'-GGTTTAAUTTAAATATACATCGAATCACA-3'). PCR was performed using *PfuTurbo* C_x Hotstart DNA polymerase (Stratagene) according to manufacturer's instructions. The recombinant plasmid was constructed by integration of the PCR fragment into the USER compatible vector pYeDP60u, prepared as described in Hamann and Møller (2007). All PCR-based constructs were verified by sequencing.

4.2. Heterologous expression of CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 in yeast

CYP94C1, CYP94B1 and CYP94B3 were produced in a yeast optimized heterologous system as described in Heitz et al. (2012). Coding sequences were introduced into the *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 strain. Yeast has only three cytochromes P450, which are expressed at a negligible level under the growth conditions used. Yeast cultures were grown and cytochrome P450 expression was induced as described in Pompon et al. (1996). Then cells were harvested by centrifugation and manually broken with glass beads

(0.45 mm diameter) in a buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 600 mM sorbitol). The homogenate was centrifuged for 10 min at 10,000g. The resulting supernatant was centrifuged for 1 h at 100,000g. The pellet consisting of microsomal membranes was resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, and 30% (v/v) glycerol with a Potter-Elvehjem homogenizer and stored at -30°C . All procedures for microsomal preparation were carried out at $0-4^{\circ}\text{C}$. The total protein content in the microsomal fractions was estimated by the Bradford method.

4.3. Chemical synthesis of JA-Phe and JA-Ile

Chemical synthesis of amine conjugates of jasmonic acid was achieved by condensation of (3R, 7R/ 3S, 7S)-JA with Phenylalanine or Isoleucine according to the reported method (Kramell et al., 1988; Kramell et al., 1996; Kramell et al., 1997; Kramell et al., 1999). Physical data are in accordance with those reported (Kramell et al., 1988; Kramell et al., 1996; Kramell et al., 1997; Kramell et al., 1999). **R,R-JA-Phe:** $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.26–7.33 (m, 3H), 7.14–7.18 (m, 2H), 5.95 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 5.38–5.47 (m, 1H), 5.18–5.27 (m, 1H), 4.89 (q, 1H, $J = 6.4$ Hz), 3.25 (dd, 1H, $J = 14.0$, 5.1 Hz), 3.10 (dd, 1H, $J = 14.5$, 6.8 Hz), 2.56 (dd, 1H, $J = 13.7$, 3.8 Hz), 1.97–2.34 (m, 8H), 1.80–1.87 (m, 1H), 1.38–1.48 (m, 1H), 0.94 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 219.6$, 174.7, 168.3, 136.0, 134.4, 129.6, 129.1, 127.6, 125.4, 54.2, 53.4, 41.2, 39.0, 38.1, 37.7, 27.3, 25.9, 21.0, 14.5 ppm. **HRMS** (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calc: 380.1832; found: 380.1846. **S,S-JA-Phe:** $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 7.24-7.31$ (m, 3H), 7.14–7.17 (m, 2H), 6.16 (d, 1H, $J = 6.1$ Hz), 5.38–5.47 (m, 1H), 5.19–5.27 (m, 1H), 4.91 (q, 1H, $J = 6.2$ Hz), 3.25 (dd, 1H, $J = 13.9$, 5.6 Hz), 3.10 (dd, 1H, $J = 13.9$, 6.4 Hz), 2.60 (dd, 1H, $J = 14.2$, 4.2 Hz), 2.22–2.34 (m, 4H), 2.00–2.10 (m, 4H), 1.78–1.86 (m, 1H), 1.31–1.43 (m, 1H), 0.94 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 219.9$, 175.1, 171.7, 136.3, 134.4, 129.7, 128.9, 127.5, 125.3, 54.4, 53.5, 41.3, 38.7, 38.0, 37.9, 27.2, 25.8, 20.9, 14.5 ppm. **HRMS** (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calc: 380.1832; found: 380.1846.

4.4. Enzyme activities

For determination of enzyme activities, the incubation medium (0.1 ml) contained 0.4 mg of microsomal proteins from transformed yeast in 20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 1 mM NADPH and the substrate JA-Ile or JA-Phe (100 μM). The reaction was initiated by the addition of NADPH and after 20 min at 27°C , was stopped by the addition of 200 μl of acetonitrile containing 0.2% acetic acid. The mixture was centrifuged for 10 min at 2000g, and the supernatant was cleared by filtration through a 0.22- μm filter. Metabolites in incubations media were directly analyzed by UPLC-MS/MS.

4.5. Plant material and treatment

Arabidopsis thaliana genotypes, all in the Col0 ecotype, were grown under a 12 h/12 h photoperiod in a growth chamber regulated at 21°C . T-DNA insertion lines used were: *cyp94c1* (SALK_55455) and *cyp94b3* (CS302217), all obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC). The double mutant *cyp94b3c1* was obtained by crossing single mutants. Overexpressing lines were generated by cloning the *CYP94C1* or the *CYP94B3* ORF successively in the Gateway (Invitrogen) vectors pDONR207 and pB7WG2 downstream of the CaMV 35S promoter. Binary vector constructs were transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 and introduced by floral dip transformation into WT plants. T3 homozygous plants were used in all experiments. For wounding experiments, between 5 and 7 fully expanded leaves of 6–7-week-old plants were wounded 3 times

across the midvein with a hemostat. Leaves were harvested at different times post-wounding and quickly flash-frozen in liquid nitrogen before storing at -80°C until jasmonates extraction. Leaves of unwounded plants were also collected as a control. *Botrytis cinerea* infection was performed as described in La Camera et al. (2009). The jasmonate extraction solvent (750 μl of extraction solvent per 150 mg of leaves), consisting of ice-cold 90% methanol containing 9,10-dihydro-JA-Ile as an internal standard, was added to frozen leaf powder (130–150 mg fresh weight) in a tube containing glass beads. The material was ground twice for 30 s with a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-Le-Brettonneux, France) and homogenized on a rotary agitator (25 min, 4°C). Homogenates were cleared by centrifugation at 18,000g and supernatants were concentrated under nitrogen. A final centrifugation at 18,000g removed precipitates. Supernatants were stored at -80°C prior to UPLC-MS/MS analysis.

4.6. Jasmonate profiling

Jasmonate profiling was achieved as previously described (Heitz et al., 2012). Briefly, the relative quantification in samples was achieved by reporting MS peak areas relative to internal standard peak areas and the mass of biological material. Absolute quantification of JA-Ile, 12OH-JA-Ile, 12COOH-JA-Ile and JA-Phe were determined by comparison of sample signal with dose-response curves established with pure compounds. All analyses were performed using a Waters Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA USA) equipped with an electrospray ionisation source (ESI) and coupled to an Acquity UPLC system (Waters, USA). Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C_{18} column (100 \times 2.1 mm, 1.7 μm ; Waters) and pre-column. The mobile phase consisted of (A) water and (B) methanol, both containing 0.1% formic acid. The run started with 2 min of 95% A, then a linear gradient was applied to reach 100% B at 12 min, followed by isocratic B for 2 min. Return to initial conditions was achieved in 3 min, with a total run time of 17 min. The column was operated at 35°C with a flow-rate of 0.35 ml/min, injecting 3 μl samples. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. The nebulizer gas flow was set to 50 l/h, and the desolvation gas flow to 900 l/h. The interface temperature was set to 400°C and the source temperature to 135°C . The capillary voltage was set to 3.2 kV and the cone voltage to 25 V, the ionization was in positive or negative mode. Low mass and high mass resolution were 14 for the first mass analyzer and 13 for the second, ion energies 1 and 2 were 0.6 V, entrance and exit potential were 2 V and detector (multiplier) gain was 650 V. For identification of 12CHO-JA-Ile and 12CHO-JA-Phe, samples were derivatized with methoxyamine hydrochloride, a reagent known to specifically target carbonyl groups (Halket et al., 2005), as described in Widemann et al. (2015). For 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe identification, by analogy to what was described for JA-Ile (Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013) with cognate standards, we hypothesized that similar reactions are catalyzed with JA-Phe substrate, leading to the formation of 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe derivatives. Masses of 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe are 373 and 387 respectively. Ionization of 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe in positive mode is expected to give ions with m/z 374 and 388 respectively and in negative mode ions with m/z 372 and 386 respectively. Incubation of JA-Phe with microsomes of yeast expressing CYP94C1 led to the formation of one NADPH-dependent peak (Supplementary Fig. S1). As shown in Supplementary Fig. S2, ionization of compounds present in this peak gave expected ions for 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe in positive mode (m/z 374 and 388 in Panel A) as well as in negative mode (m/z 372 and 386 in Panel B). Fragmentation allowed to define optimal MRM transition conditions to detect and identify JA-Phe oxidation

products (see below). Generation of 12CHO-JA-Phe aldehyde by CYP94C1 was validated by submitting microsome incubation mixture to derivatization with methoxyamine as described in Widemann et al. (2015). This chemical specifically reacts with carbonyl functions, adding 29 amu per carbonyl. 12CHO-JA-Phe reacts twice while 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe only react once, allowing aldehyde structure validation. 12CHO-JA-Ile was identified similarly in incubations of CYP94C1 with JA-Ile. Data acquisition and analysis were performed with MassLynx software (Waters, Mildorf, MA). The transitions, at different collision energy (ce) were in negative mode: 12OH-JA-Ile 338 > 130 (ce = 23 eV); 12COOH-JA-Ile 352 > 130 (ce = 23 eV); and in positive mode: JA-Ile 324 > 151 (ce = 20 eV); 9,10-dihydro-JA-Ile 326 > 280 (ce = 24 eV); 12CHO-JA-Ile 338 > 132 (ce = 16 eV); JA-Phe 358 > 119 (ce = 32 eV); 12OH-JA-Phe 374 > 120 (ce = 28 eV); 12CHO-JA-Phe 372 > 166 (ce = 14); 12COOH-JA-Phe 388 > 120 (ce = 35).

4.7. Phylogenetic analysis of the CYP94 family

A. thaliana CYP94C1 homologs were searched by BLASTp (e-value threshold < 10⁻¹⁰⁰) in algae and land plants whole-genome sequences available through Phytozome 10.1 (<http://phytozome.jgi.doe.gov>). The CYP94 data set contains 138 protein sequences derived from 15 flowering plants and the moss *P. patens*. Multiple sequences alignment was built using MUSCLE algorithm (Edgar, 2004). Alignment was carefully inspected and manually curated when necessary. Ambiguous regions of the alignment were masked using Gblocks (Castresana, 2000) prior to the phylogenetic analysis. Phylogeny was inferred by a maximum likelihood method using the LG model (Le and Gascuel, 2008) and the PhyML 3.0 software (Guindon et al., 2010). Both nearest neighbor interchange (NNI) and subtree pruning and regrafting (SPR) methods were employed for improving the tree. We tested branches support by running approximate likelihood-ratio tests (Anisimova and Gascuel, 2006).

Acknowledgments

EW was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Dr. D. Grant for critical review of the manuscript. This project and YA received financial support from the Agence Nationale de la Recherche under contract ANR-12-BSV8-005. The UPLC-MS/MS instrument was cofinanced by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Strasbourg, the Région Alsace, the Institut National de la Recherche Agronomique, and the Teral Company.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.027>.

References

Acosta, I.F., Farmer, E.E., 2010. Jasmonates. The Arabidopsis Book 8, e0129. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0129>.

Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.

Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F., Heitz, T., 2015. CYP94-mediated JA-Ile hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defense responses to *Botrytis cinerea* infection. *J. Exp. Bot.* 10 [ePub ahead of print] doi: 10.1093/jxb/erv190.

Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.

Fonseca, S., Chico, J.M., Solano, R., 2009a. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 539–547.

Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzell, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., Solano, R., 2009b. (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* 5, 344–350.

Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H.H., Nielsen, M.T., Halkier, B.A., 2007. USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Res.* 35, e55.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.

Halket, J.M., Watermann, D., Przyborowska, A., Patel, R.K.P., Fraser, P.D., Bramley, P.M., 2005. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.* 56, 219–243.

Hamann, T., Moller, B.L., 2007. Improved cloning and expression of cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in yeast. *Protein Expr. Purif.* 56, 121–127.

Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., Werck-Reichhart, D., Pinot, F., 2012. Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of the plant hormone jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *J. Biol. Chem.* 287, 6296–6306.

Kandel, S., Morant, M., Benveniste, I., Blée, E., Werck-Reichhart, D., Pinot, F., 2005. Cloning functional expression and characterization of CYP709C1 the first sub-terminal hydroxylase of long chain fatty acid in plant. Induction by chemicals and methyl jasmonate. *J. Biol. Chem.* 280, 35881–35889.

Kandel, S., Sauveplane, V., Compagnon, V., Franke, R., Millet, Y., Schreiber, L., Werck-Reichhart, D., Pinot, F., 2007. Characterization of a methyl jasmonate and wounding responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation *in vitro*. *FEBS J.* 274, 5116–5127.

Kastner, P.E., Le Calvé, S., Diss, L., Sauveplane, V., Franke, R., Schreiber, L., Pinot, F., 2010. Specific accumulation of CYP94A1 transcripts after exposure to gaseous benzaldehyde: Induction of lauric acid ω-hydroxylase activity in *Vicia sativa* exposed to atmospheric pollutants. *Environ. Res.* 111, 37–44.

Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J.K., Howe, G.A., 2008a. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 428–435.

Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., Howe, G.A., 2008b. CO11 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor for coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7100–7105.

Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., Matsui, H., Nabeta, K., Matsuura, H., 2011. Arabidopsis CYP94B3 encodes jasmonoyl-L-isoleucine 12-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of jasmonate. *Plant Cell Physiol.* 52, 1757–1765.

Kitaoka, N., Kawaide, H., Amano, N., Matsubara, T., Nabeta, K., Takahashi, K., Matsuura, H., 2014. CYP94B3 activity against jasmonic acid amino acid conjugates and the elucidation of 12-O-B-glucopyranosyl-jasmonoyl-L-isoleucine as an additional metabolite. *Phytochemistry* 99, 6–13.

Koo, A.J.K., Cooke, T.F., Howe, G.A., 2011. Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9298–9303.

Koo, A.J.K., Gao, X., Jones, A.D., Howe, G.A., 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59, 974–986.

Koo, A.J.K., Howe, G.A., 2012. Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine. *Front. Plant Sci.* 3, 19. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00019>.

Koo, A.J.K., Thireault, C., Zemelis, S., Poudel, A.N., Zhang, T., Kitaoka, N., Brandizzi, F., Matsuura, H., Howe, G.A., 2014. Endoplasmic-reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 289, 29728–29738.

Kramell, R., Schmidt, J., Herrmann, G., Schliemann, W., 2005. N-(jasmonoyl)tyrosine-derived compounds from flowers of broad beans (*Vicia faba*). *J. Nat. Prod.* 68, 1345–1349.

Kramell, R., Schmidt, J., Schneider, G., Sembdner, G., Schreiber, K., 1988. Synthesis of N-(jasmonoyl)amino acid conjugates. *Tetrahedron* 44, 5791–5807.

Kramell, R., Schneider, G., Miersch, O., 1996. Resolution of racemic jasmonic acid and abscisic acid by chiral high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 7, 209–212.

Kramell, R., Schneider, G., Miersch, O., 1997. Chiral separation of amide conjugates of jasmonic acid by liquid chromatography. *Chromatographia* 45, 104–108.

Kramell, R., Miersch, O., Schneider, G., Wasternack, C., 1999. Liquid chromatography of jasmonic acid amine conjugates. *Chromatographia* 49, 42–46.

La Camera, S., Balagué, C., Göbel, C., Geoffroy, P., Legrand, M., Feussner, I., Roby, D., Heitz, T., 2009. The *Arabidopsis* patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 469–481.

Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320.

Le Bouquin, R., Skrabs, M., Kahn, R., Benveniste, I., Salaun, J.-P., Schreiber, L., Durst, F., Pinot, F., 2001. CYP94A5 a new cytochrome P450 from *Nicotiana tabacum* is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the omega-alcohol and to the corresponding diacid. *Eur. J. Biochem.* 268, 3083–3090.

Millar, A.A., Jacobsen, J.V., Ross, J.J., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Scofield, G., Reid, J.B., Gubler, F., 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.* 45, 942–954.

- Mizutani, M., Ohta, D., 2010. Diversification of P450 Genes during land plant evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 291–315.
- Nebert, D.W., Wikvall, K., Miller, W.L., 2013. Human cytochromes P450 in health and disease. *Phil. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368, 20120426.
- Nelson, D., 2006. Plant cytochrome P450s from moss to poplar. *Phytochem. Rev.* 5, 193–204.
- Nelson, D., Werck-Reichhart, D., 2011. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J.* 66, 194–211.
- Nomura, T., Bishop, G.J., 2006. Cytochrome P450s in plant steroid hormone synthesis and metabolism. *Phytochem. Rev.* 5, 421–432.
- Pinot, F., Beisson, F., 2011. Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS J.* 278, 195–205.
- Pinot, F., Benveniste, I., Salaün, J.-P., Durst, F., 1998. Methyl jasmonate induces lauric acid ω -hydroxylase activity and accumulation of CYP94A1 transcripts but does not affect epoxide hydrolase activities in *Vicia sativa* seedling. *Plant Physiol.* 118, 1481–1486.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., Urban, P., 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* 272, 51–64.
- Roberto, F.F., Klee, H., White, F., Nordeen, R., Kosuge, T., 1990. Expression and fine structure of the gene encoding N epsilon-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase from *Pseudomonas savastanoi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5797–5801.
- Salmon, J.A., Higgs, G.A., 1987. Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.* 43, 285–296.
- Schaunstein, E., Esterbauer, H., Zollner, H., 1977. Saturated aldehydes. In: Lagando, J.R. (Ed.), *Aldehydes in Biological Systems*. Methuen, New York, pp. 1–24.
- Scheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F., Schunck, W.-H., 1998. Oxygenation cascade in conversion of n-alkanes to ω -dicarboxylic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.* 273, 32528–32534.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S.A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A., Sligar, S.G., 2000. The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Nature* 287, 1615–1622.
- Schneider, S., Wubbolts, M.G., Sanglard, D., Withold, B., 1999. Production of alkanedioic acids by cytochrome P450BM-3 monooxygenase: oxidation of 16-hydroxyhexadecanoic to hexadecane-1,16-dioic acid. *Biocatal. Biotransformat.* 17, 163–178.
- Sehgal, N., Agarwal, V., Valli, R.K., Joshi, S.D., Antonovic, L., Strobel, H.W., Ravindranath, V., 2011. Cytochrome P4504f, a potential therapeutic target limiting neuroinflammation. *Biochem. Pharmacol.* 82, 53–64.
- Staswick, P.E., 2009. The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol.* 150, 1310–1321.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2117–2127.
- Stumpe, M., Feussner, I., 2006. Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem. Rev.* 5, 347–357.
- Tamogami, S., Rakwal, R., Kodama, O., 1997. Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of naringenin-7-O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett.* 401, 239–242.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., Browse, J., 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{CO11} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661–668.
- Turk, E.M., Fujioka, S., Seto, H., Shimada, Y., Takatsuto, S., Yoshida, S., Wang, H., Torres, Q.I., Ward, J.M., Murthy, G., Zhang, J., Walker, J.C., Neff, M.M., 2005. BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant J.* 42, 23–34.
- Wang, L., Halitschke, R., Kang, J.H., Berg, A., Harnish, F., Baldwin, I.T., 2007. Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine. *Planta* 227, 1161–1168.
- Wasternack, C., Kombrink, E., 2010. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem. Biol.* 5, 63–77.
- Wasternack, C., Hause, B., 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* 111, 1021–1058.
- Widemann, E., Heitz, T., Miesch, L., Miesch, M., Heinrich, C., Pinot, F., Lugan, R., 2015. Identification of the 12-oxo-jasmonoyl-isoleucine, a new intermediate of jasmonate metabolism in *Arabidopsis*, by combining chemical derivatization and LC-MS/MS analysis. *Metabolomics*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-014-0754-7>.
- Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., Miesch, M., Pinot, F., Heitz, T., 2013. The Amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. *J. Biol. Chem.* 288, 31701–31714.

Bibliographie

- ✓ Arahira, M., Nong, V.H., Udaka, K., and Fukazawa, C. (2000). Purification, molecular cloning and ethylene-inducible expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Eur. J. Biochem.* *267*, 2649–2657.
- ✓ Barberon, M., Vermeer, J.E.M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T.G., Humbel, B.M., Nawrath, C., Takano, J., Salt, D.E., et al. (2016). Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell* *164*, 447–459.
- ✓ Bassard, J.-E., Richert, L., Geerinck, J., Renault, H., Duval, F., Ullmann, P., Schmitt, M., Meyer, E., Mutterer, J., Boerjan, W., et al. (2012). Protein-Protein and Protein-Membrane Associations in the Lignin Pathway. *The Plant Cell* *24*, 4465–4482.
- ✓ Beetham, J.K., Grant, D., Arand, M., Garbarino, J., Kiyosue, T., Pinot, F., Oesch, F., Belknap, W.R., Shinozaki, K., and Hammock, B.D. (1995). Gene Evolution of Epoxide Hydrolases and Recommended Nomenclature. *DNA and Cell Biology* *14*, 61–71.
- ✓ Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., and Ohlrogge, J.B. (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell* *19*, 351–368.
- ✓ Beisson, F., Li-Beisson, Y., and Pollard, M. (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* *15*, 329–337.
- ✓ Bellevik, S., Zhang, J., and Meijer, J. (2002). *Brassica napus* soluble epoxide hydrolase (BNSEH1). *Eur. J. Biochem.* *269*, 5295–5302.
- ✓ Benveniste, I., Tijet, N., Adas, F., Philipps, G., Salaün, J.-P., and Durst, F. (1998). CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* Encodes a Cytochrome P450-Dependent Fatty Acid Omega-Hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *243*, 688–693.
- ✓ Bernards, M.A. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* *80*, 227–240.
- ✓ Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A.-C., Humphry, M., Borel, S., Petétot, J.M.-C., Métraux, J.-P., and Nawrath, C. (2007). A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO J.* *26*, 2158–2168.
- ✓ Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraça, L., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A.-C., Métraux, J.-P., et al. (2011). A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *23*, 1958–1970.

- ✓ Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7, 315–322.
- ✓ Blée, E., and Schuber, F. (1992). Enantioselectivity of the hydrolysis of linoleic acid monoepoxides catalyzed by soybean fatty acid epoxide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 171–177.
- ✓ Bonaventure, G., Beisson, F., Ohlrogge, J., and Pollard, M. (2004). Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with *Arabidopsis* epidermis: occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1,18-dioate as the major component: Polyester composition of *Arabidopsis* epidermis. *The Plant Journal* 40, 920–930.
- ✓ Bradshaw, R.E., and Zhang, S. (2006). Biosynthesis of dothistromin. *Mycopathologia* 162, 201–213.
- ✓ Carvalho, C.M., Aires-Barros, M.R., and Cabral, J.M. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 17–34.
- ✓ Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.
- ✓ Compagnon, V., Diehl, P., Benveniste, I., Meyer, D., Schaller, H., Schreiber, L., Franke, R., and Pinot, F. (2009). CYP86B1 Is Required for Very Long Chain ω -Hydroxyacid and α,ω -Dicarboxylic Acid Synthesis in Root and Seed Suberin Polyester. *PLANT PHYSIOLOGY* 150, 1831–1843.
- ✓ Croteau, R., and Kolattukudy, P.E. (1975). Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers. Enzymatic hydration of 18-hydroxy-cis-9,10-epoxystearic acid to threo 9,10,18-trihydroxystearic acid by a particulate preparation from apple (*Malus pumila*). *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 73–81.
- ✓ De Giorgi, J., Piskurewicz, U., Loubery, S., Utz-Pugin, A., Bailly, C., Mène-Saffrané, L., and Lopez-Molina, L. (2015). An Endosperm-Associated Cuticle Is Required for *Arabidopsis* Seed Viability, Dormancy and Early Control of Germination. *PLOS Genetics* 11, e1005708.
- ✓ Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122, 403–414.
- ✓ Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., and Heredia, A. (2015). Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends in Plant Science* 20, 551–558.
- ✓ Edqvist, J., and Farbos, I. (2003). A germination-specific epoxide hydrolase from *Euphorbia lagascae*. *Planta* 216, 403–412.

- ✓ Ehltling, J., Sauveplane, V., Olry, A., Ginglinger, J.-F., Provart, N.J., and Werck-Reichhart, D. (2008). An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 8, 47.
- ✓ Fernández, V., Guzmán-Delgado, P., Graça, J., Santos, S., and Gil, L. (2016). Cuticle Structure in Relation to Chemical Composition: Re-assessing the Prevailing Model. *Front Plant Sci* 7, 427.
- ✓ Fich, E.A., Segerson, N.A., and Rose, J.K.C. (2016). The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annu Rev Plant Biol* 67, 207–233.
- ✓ Francis, S.A., Dewey, F.M., and Gurr, S.J. (1996). The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49, 201–211.
- ✓ Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C., and Schreiber, L. (2005). Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues--a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66, 2643–2658.
- ✓ Gilbert, R.D., Johnson, A.M., and Dean, R.A. (1996). Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48, 335–346.
- ✓ Girard, A.-L., Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Gaillard, C., Elmorjani, K., Vivancos, J., Runavot, J.-L., Quemener, B., Petit, J., Germain, V., et al. (2012). Tomato GDSL1 Is Required for Cutin Deposition in the Fruit Cuticle. *The Plant Cell* 24, 3119–3134.
- ✓ Gomi, K., Yamamoto, H., and Akimitsu, K. (2003). Epoxide hydrolase: a mRNA induced by the fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush). *Plant Mol. Biol.* 53, 189–199.
- ✓ Graça, J. (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry* 3.
- ✓ Graça, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., and Pereira, H. (2002). Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* 61, 205–215.
- ✓ Grausem, B., Widemann, E., Verdier, G., Nosbüsch, D., Aubert, Y., Beisson, F., Schreiber, L., Franke, R., and Pinot, F. (2014). CYP77A19 and CYP77A20 characterized from *Solanum tuberosum* oxidize fatty acids *in vitro* and partially restore the wild phenotype in an *A. thaliana* cutin mutant: New potato P450 fatty acid hydroxylases. *Plant, Cell & Environment* 37, 2102–2115.
- ✓ Griffing, L.R. (2010). Networking in the endoplasmic reticulum. *Biochemical Society Transactions* 38, 747–753.

- ✓ Guo, A., Durner, J., and Klessig, D.F. (1998). Characterization of a tobacco epoxide hydrolase gene induced during the resistance response to TMV. *Plant J.* *15*, 647–656.

- ✓ Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., et al. (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone Jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *J. Biol. Chem.* *287*, 6296–6306.

- ✓ Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L., and Franke, R. (2008). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* *59*, 2347–2360.

- ✓ Holloway, P.J. (1973). Cutins of *Malus pumila* fruits and leaves. *Phytochemistry* *12*, 2913–2920.

- ✓ Howe, G.A., and Schillmiller, A.L. (2002). Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 230–236.

- ✓ Jakobson, L., Vaahtera, L., Töldsepp, K., Nuhkat, M., Wang, C., Wang, Y.-S., Hõrak, H., Valk, E., Pechter, P., Sindarovska, Y., et al. (2016). Natural Variation in *Arabidopsis* Cvi-0 Accession Reveals an Important Role of MPK12 in Guard Cell CO₂ Signaling. *PLoS Biol.* *14*, e2000322.

- ✓ Jenkin, S., and Molina, I. (2015). Isolation and Compositional Analysis of Plant Cuticle Lipid Polyester Monomers. *J Vis Exp*.

- ✓ Kandel, S., Sauveplane, V., Olry, A., Diss, L., Benveniste, I., and Pinot, F. (2006). Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants. *Phytochemistry Reviews* *5*, 359–372.

- ✓ Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* *7*, 193–195.

- ✓ Kauss, H., Fauth, M., Merten, A., and Jeblick, W. (1999). Cucumber hypocotyls respond to cutin monomers via both an inducible and a constitutive H₂O₂-generating system. *Plant Physiol.* *120*, 1175–1182.

- ✓ Kessler, A., Halitschke, R., and Baldwin, I.T. (2004). Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science* *305*, 665–668.

- ✓ Kiyosue, T., Beetham, J.K., Pinot, F., Hammock, B.D., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. *Plant J.* *6*, 259–269.

- ✓ Kolattukudy, P.E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* *208*, 990–1000.
- ✓ Kolattukudy, P.E., Rogers, L., and Larson, J.D. (1981). Enzymatic reduction of fatty acids and alpha-hydroxy fatty acids. *Meth. Enzymol.* *71 Pt C*, 263–275.
- ✓ Kolattukudy, P.E., Rogers, L.M., Li, D., Hwang, C.S., and Flaishman, M.A. (1995). Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 4080–4087.
- ✓ Kolattukudy, P.E. (2001). Polyesters in higher plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *71*, 1–49.
- ✓ Li, Y., Beisson, F., Koo, A.J.K., Molina, I., Pollard, M., and Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 18339–18344.
- ✓ Li-Beisson, Y. (2011). Cutin and Suberin. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd)
- ✓ Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J., and Beisson, F. (2009). Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 22008–22013.
- ✓ Lü, S., Song, T., Kosma, D.K., Parsons, E.P., Rowland, O., and Jenks, M.A. (2009). *Arabidopsis* CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant J.* *59*, 553–564.
- ✓ Minami, M., Ohno, S., Kawasaki, H., Rådmark, O., Samuelsson, B., Jörnvall, H., Shimizu, T., Seyama, Y., and Suzuki, K. (1987). Molecular cloning of a cDNA coding for human leukotriene A4 hydrolase. Complete primary structure of an enzyme involved in eicosanoid synthesis. *J. Biol. Chem.* *262*, 13873–13876.
- ✓ Mizutani, M., and Ohta, D. (2010). Diversification of P450 Genes During Land Plant Evolution. *Annual Review of Plant Biology* *61*, 291–315.
- ✓ Molina, I., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M. (2007). Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*: Lipid polyesters in seed coats. *The Plant Journal* *53*, 437–449.
- ✓ Morant, M., Jørgensen, K., Schaller, H., Pinot, F., Møller, B.L., Werck-Reichhart, D., and Bak, S. (2007). CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *Plant Cell* *19*, 1473–1487.

- ✓ Morisseau, C., Beetham, J.K., Pinot, F., Debernard, S., Newman, J.W., and Hammock, B.D. (2000). Cress and Potato Soluble Epoxide Hydrolases: Purification, Biochemical Characterization, and Comparison to Mammalian Enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378, 321–332.
- ✓ Morisseau, C., and Hammock, B.D. (2005). EPOXIDE HYDROLASES: Mechanisms, Inhibitor Designs, and Biological Roles. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 311–333.
- ✓ Morisseau, C., and Hammock, B.D. (2013). Impact of Soluble Epoxide Hydrolase and Epoxyeicosanoids on Human Health. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53, 37–58.
- ✓ Moussu, S., San-Bento, R., Galletti, R., Creff, A., Farcot, E., and Ingram, G. (2013). Embryonic cuticle establishment: The great (apoplastic) divide. *Plant Signaling & Behavior* 8, e27491.
- ✓ Mowbray, S.L., Elfström, L.T., Ahlgren, K.M., Andersson, C.E., and Widersten, M. (2006). X-ray structure of potato epoxide hydrolase sheds light on substrate specificity in plant enzymes. *Protein Science* 15, 1628–1637.
- ✓ Nardini, M., and Dijkstra, B.W. (1999). α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 732–737.
- ✓ Nawrath, C. (2002). The Biopolymers Cutin and Suberin. *The Arabidopsis Book* 1, e0021.
- ✓ Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R.B., Geldner, N., Reina-Pinto, J.J., and Kunst, L. (2013). Apoplastic Diffusion Barriers in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 11, e0167.
- ✓ Neuteboom, L.W., Kunimitsu, W.Y., Webb, D., and Christopher, D.A. (2002). Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Science* 163, 1021–1035.
- ✓ Newman, J.W., Morisseau, C., and Hammock, B.D. (2005). Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 44, 1–51.
- ✓ Pace-Asciak, C.R., and Lee, W.S. (1989). Purification of hepoxilin epoxide hydrolase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 264, 9310–9313.
- ✓ Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L., and Aharoni, A. (2009). The *Arabidopsis* DCR Encoding a Soluble BAHD Acyltransferase Is Required for Cutin Polyester Formation and Seed Hydration Properties. *PLANT PHYSIOLOGY* 151, 1773–1789.
- ✓ Philippe, G., Gaillard, C., Petit, J., Geneix, N., Dalgalarrodo, M., Bres, C., Mauxion, J.-P., Franke, R., Rothan, C., Schreiber, L., et al. (2016). Ester Cross-Link Profiling of the Cutin

Polymer of Wild-Type and Cutin Synthase Tomato Mutants Highlights Different Mechanisms of Polymerization. *Plant Physiology* 170, 807–820.

- ✓ Pinot, F., Salaün, J.P., Bosch, H., Lesot, A., Mioskowski, C., and Durst, F. (1992). omega-Hydroxylation of Z9-octadecenoic, Z9,10-epoxystearic and 9,10-dihydroxystearic acids by microsomal cytochrome P450 systems from *Vicia sativa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 183–193.
- ✓ Pinot, F., Grant, D.F., Beetham, J.K., Parker, A.G., Borhan, B., Landt, S., Jones, A.D., and Hammock, B.D. (1995). Molecular and biochemical evidence for the involvement of the Asp-333-His-523 pair in the catalytic mechanism of soluble epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 270, 7968–7974.
- ✓ Pinot, F., Benveniste, I., Salaün, J.P., Loreau, O., Noël, J.P., Schreiber, L., and Durst, F. (1999). Production in vitro by the cytochrome P450 CYP94A1 of major C18 cutin monomers and potential messengers in plant-pathogen interactions: enantioselectivity studies. *Biochem. J.* 342 (Pt 1), 27–32.
- ✓ Pinot, F., and Beisson, F. (2011). Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles: Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants. *FEBS Journal* 278, 195–205.
- ✓ Podila, G.K., Rogers, L.M., and Kolattukudy, P.E. (1993). Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology* 103, 267–272.
- ✓ Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J.B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* 13, 236–246.
- ✓ Prost, I. (2005). Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. *PLANT PHYSIOLOGY* 139, 1902–1913.
- ✓ Raffaele, S., Leger, A., and Roby, D. (2009). Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. *Plant Signal Behav* 4, 94–99.
- ✓ Ralston, L., and Yu, O. (2006). Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Reviews* 5, 459–472.
- ✓ Reina-Pinto, J.J., and Yephremov, A. (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 540–549.
- ✓ Renault, H., De Marothy, M., Jonasson, G., Lara, P., Nelson, D.R., Nilsson, I., André, F., von Heijne, G., and Werck-Reichhart, D. (2017). Gene Duplication Leads to Altered Membrane Topology of a Cytochrome P450 Enzyme in Seed Plants. *Molecular Biology and Evolution* 34, 2041–2056.

- ✓ Sadler, C., Schroll, B., Zeisler, V., Waßmann, F., Franke, R., and Schreiber, L. (2016). Wax and cutin mutants of *Arabidopsis*: Quantitative characterization of the cuticular transport barrier in relation to chemical composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 1336–1344.
- ✓ Salaün, J.P., Benveniste, I., Reichhart, D., and Durst, F. (1978). A microsomal (cytochrome P-450)-linked lauric-acid-monooxygenase from aged Jerusalem-artichoke-tuber tissues. *Eur. J. Biochem.* 90, 155–159.
- ✓ Salaün, J.P., Benveniste, I., Reichhart, D., and Durst, F. (1981). Induction and specificity of a (cytochrome P-450)-dependent laurate in-chain-hydroxylase from higher plant microsomes. *Eur. J. Biochem.* 119, 651–655.
- ✓ Sauveplane, V., Kandel, S., Kastner, P.-E., Ehling, J., Compagnon, V., Werck-Reichhart, D., and Pinot, F. (2009). *Arabidopsis thaliana* CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants: CYP77A4, an epoxy fatty acid-forming enzyme. *FEBS Journal* 276, 719–735.
- ✓ Schnurr, J., Shockey, J., and Browse, J. (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 629–642.
- ✓ Schweizer, P., Jeanguenat, A., Whitacre, D., Métraux, J.-P., and Mösinge, E. (1996a). Induction of resistance in barley against *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* by free cutin monomers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49, 103–120.
- ✓ Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Muller, C., and Mettraux, J.-P. (1996b). Perception of free cutin monomers by plant cells. *The Plant Journal* 10, 331–341.
- ✓ Shamloul, M., Trusa, J., Mett, V., and Yusibov, V. (2014). Optimization and utilization of *Agrobacterium*-mediated transient protein production in *Nicotiana*. *J Vis Exp*.
- ✓ Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2012). Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 12, 696–703.
- ✓ Stapleton, A., Beetham, J.K., Pinot, F., Garbarino, J.E., Rockhold, D.R., Friedman, M., Hammock, B.D., and Belknap, W.R. (1994). Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from potato. *Plant J.* 6, 251–258.
- ✓ Summerer, S., Hanano, A., Utsumi, S., Arand, M., Schuber, F., and Blée, E. (2002). Stereochemical features of the hydrolysis of 9,10-epoxystearic acid catalysed by plant and mammalian epoxide hydrolases. *Biochem. J.* 366, 471–480.
- ✓ Watson, C.J., Froehlich, J.E., Josefsson, C.A., Chapple, C., Durst, F., Benveniste, I., and Coolbaugh, R.C. (2001). Localization of CYP86B1 in the outer envelope of chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 42, 873–878.

- ✓ Weissbart, D., Salaün, J., Durst, F., Pflieger, P., and Mioskowski, C. (1992). Regioselectivity of a plant lauric acid omega hydroxylase. Omega hydroxylation of cis and trans unsaturated lauric acid analogs and epoxygenation of the terminal olefin by plant cytochrome P-450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1124, 135–142.
- ✓ Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., and Yephremov, A. (2001). Functional analysis of the LACERATA gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid omega -hydroxylation in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9694–9699.
- ✓ Weng, H., Molina, I., Shockey, J., and Browse, J. (2010). Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta* 231, 1089–1100.
- ✓ Werck-Reichhart, D., Hehn, A., and Didierjean, L. (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science* 5, 116–123.
- ✓ Werck-Reichhart, D., Bak, S., and Paquette, S. (2002). Cytochromes p450. *Arabidopsis Book* 1, e0028.
- ✓ Van der Werf, M.J., Orru, R.V.A., Overkamp, K.M., Swarts, H.J., Osprian, I., Steinreiber, A., de Bont, J.A.M., and Faber, K. (1999). Substrate specificity and stereospecificity of limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14; an enzyme showing sequential and enantioconvergent substrate conversion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 380–385.
- ✓ Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., Miesch, M., Pinot, F., and Heitz, T. (2013). The Amidohydrolases IAR3 and ILL6 Contribute to Jasmonoyl-Isoleucine Hormone Turnover and Generate 12-Hydroxyjasmonic Acid Upon Wounding in *Arabidopsis* Leaves. *Journal of Biological Chemistry* 288, 31701–31714.
- ✓ Widemann, E., Grausem, B., Renault, H., Pineau, E., Heinrich, C., Lugan, R., Ullmann, P., Miesch, L., Aubert, Y., Miesch, M., et al. (2015). Sequential oxidation of Jasmonoyl-Phenylalanine and Jasmonoyl-Isoleucine by multiple cytochrome P450 of the CYP94 family through newly identified aldehyde intermediates. *Phytochemistry* 117, 388–399.
- ✓ Wijekoon, C.P., Goodwin, P.H., Valliani, M., and Hsiang, T. (2011). The role of a putative peroxisomal-targeted epoxide hydrolase of *Nicotiana benthamiana* in interactions with *Colletotrichum destructivum*, *C. orbiculare* or *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Science* 181, 177–187.
- ✓ Wixtrom, R.N., and Hammock, B.D. (1988). Continuous spectrophotometric assays for cytosolic epoxide hydrolase. *Anal. Biochem.* 174, 291–299.

- ✓ Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M., and Ohlrogge, J. (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 12040–12045.

- ✓ Yang, W., Simpson, J.P., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M., and Ohlrogge, J.B. (2012). A Land-Plant-Specific Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Family in *Arabidopsis*: Substrate Specificity, sn-2 Preference, and Evolution. *PLANT PHYSIOLOGY* *160*, 638–652.

- ✓ Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., and Ohlrogge, J. (2016). Quantitative analysis of glycerol in dicarboxylic acid-rich cutins provides insights into *Arabidopsis* cutin structure. *Phytochemistry* *130*, 159–169.

- ✓ Yeats, T.H., and Rose, J.K.C. (2013). The Formation and Function of Plant Cuticles. *PLANT PHYSIOLOGY* *163*, 5–20.

- ✓ Zheng, Z. (2003). *Arabidopsis* AtGPAT1, a Member of the Membrane-Bound Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gene Family, Is Essential for Tapetum Differentiation and Male Fertility. *THE PLANT CELL ONLINE* *15*, 1872–1887.

- ✓ Ziegler, J., Hamberg, M., Miersch, O., and Parthier, B. (1997). Purification and Characterization of Allene Oxide Cyclase from Dry Corn Seeds. *Plant Physiol.* *114*, 565–573.

- ✓ Zlotnik-Mazori, T., and Stark, R.E. (1988). Nuclear magnetic resonance studies of cutin, an insoluble plant polyester. *Macromolecules* *21*, 2412–2417.