



HAL
open science

Analyse fonctionnelle de cytochromes P450 de la famille CYP94 et des amidohydrolases IAR3 et ILL6 dans le catabolisme hormonal des jasmonates chez *Arabidopsis thaliana*

Émilie Widemann

► **To cite this version:**

Émilie Widemann. Analyse fonctionnelle de cytochromes P450 de la famille CYP94 et des amidohydrolases IAR3 et ILL6 dans le catabolisme hormonal des jasmonates chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ121 . tel-01235832

HAL Id: tel-01235832

<https://theses.hal.science/tel-01235832>

Submitted on 30 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE

Sciences de la Vie et de la Santé, ED414

THÈSE présentée par :

Emilie WIDEMANN

Soutenue le : 10 septembre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline / Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Analyse fonctionnelle de cytochromes
P450 de la famille CYP94 et des amido-
hydrolases IAR3 et ILL6 dans le
catabolisme hormonal des jasmonates
chez *Arabidopsis thaliana***

THÈSE dirigée par :

Dr. PINOT Franck
Dr. HEITZ Thierry

Directeur de thèse, Université de Strasbourg
Codirecteur de thèse, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. BESSOULE Jean-Jacques
Dr. HEHN Alain
Prof. Dr. CAMARA Bilal

Rapporteur externe, Université Bordeaux Segalen
Rapporteur externe, Université de Lorraine
Rapporteur interne, Université de Strasbourg

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Prof. Dr. HAUSE Bettina

Examineur, Institute of Plant Biochemistry (Halle, Allemagne)

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury, Dr Bettina Hause, Dr Jean-Jacques Bessoule, Dr Bilal Camara et Dr Alain Hehn d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je voudrais remercier sincèrement mes directeurs de thèse, Dr Franck Pinot et Dr Thierry Heitz, d'avoir partagé leurs connaissances et encadré mon travail de thèse rigoureusement durant ces trois années.

Je remercie vivement Pascaline Ullmann et Bernard Grausem pour leurs précieux conseils scientifiques et leur soutien. Merci beaucoup à Yann Aubert d'avoir contribué à ce projet de recherche.

Je souhaite également remercier la plateforme métabolomique de l'IBMP et tout particulièrement Raphaël Lugan, pour la formation à l'analyse de jasmonates par UPLC-MS/MS ainsi que pour les discussions enrichissantes dont j'ai bénéficiées.

Merci à tous les membres de l'équipe étudiant les cytochromes P450, qui m'ont tous aidée un jour ou l'autre. Mes remerciements à Patrick Achard, Benjamin Lallemand, Esther Lechner, Michel Legrand, Rozenn Menard, et les autres chercheurs de l'IBMP m'ayant conseillée pour mes travaux de recherche. Merci à Abdelmalek Alioua pour ses indications lors de qPCR et à Mathieu Erhardt pour son aide à la préparation d'échantillons et aux observations microscopiques.

Un grand merci à Emmanuelle Pineau et à Camille De March de m'avoir fait découvrir le plaisir de partager mes connaissances dans la bonne humeur et d'avoir contribué à mon travail de thèse lors de leurs stages.

Je suis très reconnaissante aux jardiniers d'avoir pris soin des plantes nécessaires aux expériences. Merci à Fabienne Philippon et Michèle Hadji pour leur gentillesse.

Mille fois merci à Mémère, notamment pour son oreille attentive et patiente. Du fond du cœur, je remercie Munna pour son soutien appréciable. Enfin, j'exprime toute ma gratitude à ma famille, qui m'a supportée, aidée, encouragée et soutenue dans mes études depuis toujours.

Table des matières

Liste des abréviations	13
INTRODUCTION	17
1 INTRODUCTION.....	18
1.1 Les enzymes à cytochromes P450 (P450s)	18
1.1.1 Propriétés catalytiques des cytochromes P450.....	18
1.1.1.1 Types de réactions catalysées.....	18
1.1.1.2 Mécanisme de catalyse des P450s.....	19
1.1.1.3 Rôle de la cytochrome P450 réductase couplée au cytochrome P450	20
1.1.2 Diversité des cytochromes P450	20
1.1.2.1 Nomenclature des cytochromes P450	21
1.1.2.2 Rôles biologiques des P450s chez les plantes.....	21
1.1.2.2.1 Implication des P450s dans de nombreuses voies métaboliques.....	21
1.1.2.2.2 Les ω -hydroxylases d'acides gras dans la synthèse de cutine et de subérine	22
1.1.2.2.3 Les P450s dans la biosynthèse d'hormones	23
1.2 Diversité des phytohormones et de leurs fonctions physiologiques	24
1.2.1 Différentes classes de phytohormones	24
1.2.2 Fonctions physiologiques des hormones végétales.....	25
1.2.2.1 Rôle des hormones dans le développement.....	26
1.2.2.2 Rôle des hormones en réponse aux stress environnementaux.....	26
1.2.2.2.1 Reconnaissance des stress biotiques.....	27
1.2.2.2.2 Les réponses déclenchées lors d'une attaque par un herbivore	27
1.2.2.2.3 Les réponses de défense contre les pathogènes microbiens	28
1.3 Les jasmonates (JAs).....	29
1.3.1 Biosynthèse de JA et de son conjugué Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile).....	29
1.3.2 Jasmonates dérivés de JA et de JA-Ile	32
1.3.3 Voie de signalisation des jasmonates par JA-Ile	35
1.3.3.1 Le complexe SCF ^{COI1}	36
1.3.3.2 Rôle des répresseurs JAZs.....	37
1.3.3.3 Les facteurs de transcription ciblés par les répresseurs JAZs	38
1.3.3.4 La signalisation jasmonate est basée sur un système de dé-répression.....	40

1.4	Rôles de la voie JA dans les interactions plantes-insectes et les interactions plantes-microbes	42
1.4.1	La voie de signalisation JA garante de réponses de défense contre les insectes..	42
1.4.2	La voie de signalisation JA pour la résistance aux pathogènes nécrotrophes	43
1.4.3	Les branches de signalisation antagonistes MYCs et ERF1/ORA59.....	44
1.5	Biosynthèse et signalisation jasmonate au cours du développement floral	45
1.5.1	Développement floral et autofécondation chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
1.5.2	Développement de l'anthere et des grains de pollen.....	47
1.5.3	Biosynthèse et signalisation JA dans les fleurs.....	50
1.5.3.1	Enzymes impliquées dans la biosynthèse de JA dans les fleurs	50
1.5.3.2	Transduction du signal jasmonate dans les fleurs	51
1.5.4	Interactions entre les voies hormonales auxine et JA	53
1.5.5	Interactions entre les voies hormonales GA et JA	54
1.6	Mécanismes d'inactivation hormonale.....	55
1.6.1	Catabolisme oxydatif d'hormones	56
1.6.1.1	Catabolisme oxydatif d'hormones par des dioxygénases	56
1.6.1.2	Catabolisme oxydatif d'hormones par des P450s	56
1.6.2	Inactivation hormonale par conjugaison	58
1.7	Clivage de conjugués hormonaux par des amido-hydrolases	58
1.8	Objectifs du travail de thèse	59
	MATERIEL ET METHODES	63
2	MATERIEL ET METHODES	64
2.1	Matériel végétal.....	64
2.2	Conditions de culture	65
2.2.1	Plantes en terreau	65
2.2.2	Plantes en culture <i>in vitro</i>	66
2.2.2.1	Stérilisation des graines.....	66
2.2.2.2	Culture en milieu solide	66
2.2.2.3	Culture en milieu liquide.....	66
2.3	Analyse et caractérisation de lignées d'insertion T-DNA.....	67
2.3.1	Extraction d'ADN génomique rapide	67
2.3.2	Génotypage par PCR.....	67
2.3.2.1	Programme PCR.....	68

2.3.2.2	Amorces utilisés pour le génotypage par PCR.....	68
2.3.3	Analyse des produits de PCR sur gel d'agarose.....	68
2.3.4	Séquençage d'ADN.....	69
2.3.5	Vérification de la perte d'expression des gènes d'intérêt	69
2.4	Blessure de feuilles d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
2.5	Test de résistance à <i>Botrytis</i>	70
2.5.1	Préparation de l'inoculum et inoculation	70
2.5.2	Evaluation de la résistance	70
2.5.2.1	Mesure des lésions	70
2.5.2.2	Quantification relative de l'ADN de <i>Botrytis cinerea</i>	70
2.6	Test de croissance racinaire d' <i>Arabidopsis thaliana in vitro</i>	71
2.7	Traitement de feuilles adultes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par des jasmonates	71
2.8	Traitement de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> de 7 jours par des jasmonates	72
2.9	Récolte de fleurs d' <i>Arabidopsis thaliana</i> fermées ou ouvertes.....	72
2.10	Récolte de pollen d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
2.11	Observations au mini-microscope électronique à balayage	73
2.12	Colorations	73
2.12.1	Colorations GUS	73
2.12.1.1	Colorations	74
2.12.1.2	Inclusions et coupes	74
2.12.2	Coloration d'Alexander : test de viabilité du pollen	74
2.12.3	Coloration au bleu d'aniline : visualisation du tube pollinique	75
2.13	Analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR	75
2.13.1	Extraction des ARNs totaux.....	75
2.13.2	Transcription inverse.....	76
2.13.3	PCR quantitative (qPCR)	76
2.13.3.1	Milieu de réaction.....	76
2.13.3.2	Amorces utilisées	77
2.13.3.3	Programme	79
2.13.3.4	Calculs des niveaux d'expression	79
2.14	Tests enzymatiques des CYP94s recombinants	80
2.14.1	Transformation de levure	80
2.14.1.1	Préparation de levures compétentes	80

2.14.1.2	Transformation	81
2.14.2	Expression de la protéine	81
2.14.3	Préparation de microsomes de levure.....	82
2.14.4	Dosage des protéines totales des microsomes par la méthode de Bradford.....	82
2.14.5	Incubations de microsomes avec des jasmonates.....	82
2.15	Analyses métaboliques.....	83
2.15.1	Jasmonates de synthèse utilisés.....	83
2.15.1.1	Composés synthétiques issus de collaborations avec des chimistes	84
2.15.1.1.1	Standards internes.....	84
2.15.1.1.2	Jasmonates	84
2.15.1.2	Composés commerciaux	84
2.15.1.3	Structures des composés utilisés	85
2.15.2	Extraction de jasmonates.....	87
2.15.2.1	Extraction de jasmonates de feuille ou de fleur	87
2.15.2.2	Extraction des jasmonates des milieux d'incubation de microsomes	88
2.15.3	Analyse et caractérisation de jasmonates par UPLC-MS/MS.....	88
2.15.3.1	L'UPLC-MS/MS	88
2.15.3.2	Les méthodes d'analyse utilisées	90
2.15.3.3	La méthylation pour identifier des fonctions aldéhydes	93
2.15.3.4	Le logiciel MassLynx.....	93
2.15.4	Calculs des concentrations de jasmonates de l'échantillon.....	94
2.16	Statistiques	95
RESULTATS	97
RESULTATS partie 1 :	99
Catabolisme de JA-Ile et homéostasie de jasmonates au cours de la réponse à la blessure	99
3 CATABOLISME OXYDATIF DE JA-ILE PAR LES CYTOCHROMES P450 DE LA FAMILLE CYP94 LORS DE LA BLESSURE MECANIQUE	100
3.1	Introduction	100
3.2	Publication : Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone Jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover (Heitz et al., 2012)	102

4	CATABOLISME PAR CLIVAGE DE JA-ILE ET DE 12OH-JA-ILE ET PRODUCTION DE 12OH-JA PAR LES AMIDO-HYDROLASES IAR3 ET ILL6 LORS DE LA BLESSURE.....	120
4.1	Introduction.....	120
4.2	Publication : The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in <i>Arabidopsis</i> leaves (Widemann et al., 2013).....	121
	RESULTATS partie 2 :	139
	Catabolisme de JA-Ile et homéostasie de jasmonates dans deux autres modèles biologiques de signalisation JA	139
5	IMPACT DU METABOLISME OXYDATIF DE JA-ILE PAR CYP94B3 ET CYP94C1 SUR LES REPONSES AU PATHOGENE NECROTROPHE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	141
5.1	Introduction.....	141
5.2	Résultats	142
5.2.1	Recherche de 12COOH-JA-Ile au cours de l'infection foliaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par <i>Botrytis cinerea</i>	142
5.2.2	Expression des <i>CYP94s</i> au cours de l'infection foliaire par <i>Botrytis cinerea</i>	143
5.2.3	Niveaux de jasmonates des plantes mutantes ayant des expressions de <i>CYP94B3</i> et <i>CYP94C1</i> modifiées	144
5.2.4	Résistance des plantes mutantes ayant des expressions de <i>CYP94B3</i> et <i>CYP94C1</i> modifiées	146
5.2.5	Expression des <i>CYP94s</i> chez les mutants inoculés	148
5.2.6	Etude des réponses transcriptionnelles de gènes de défense ou de signalisation chez les plantes mutantes infectées	150
5.2.6.1	Expression de gènes de défense	150
5.2.6.2	Expression des facteurs de transcription <i>MYC2</i> et <i>ERF1</i>	152
5.2.6.3	Expression des répresseurs JAZs	153
5.2.7	La carboxylation, une inactivation totale de JA-Ile ?.....	156
5.2.7.1	Effet d'un traitement JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile sur des feuilles de plantes âgées de 7 semaines.....	156
5.2.7.2	Effet d'un traitement JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile sur des plantules d'une semaine cultivées en milieu liquide.....	157
5.3	Conclusion.....	160

5.4	Discussion	161
6	OXYDATION DE JASMONATES PAR LES CYP94s AU COURS DU DEVELOPPEMENT FLORAL	163
6.1	Introduction	163
6.1.1	Dosages de jasmonates dans les fleurs	163
6.1.2	Hypothèse de travail.....	164
6.2	Résultats	167
6.2.1	Recherche de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile dans les fleurs de Col0	167
6.2.2	Etude de l'expression des 6 gènes <i>CYP94s</i> dans les fleurs	167
6.2.2.1	Expression des <i>CYP94s</i> à différents stades floraux (RT-qPCR).....	168
6.2.2.2	Expression des <i>CYP94s</i> dans les différents organes de fleurs ouvertes.....	170
6.2.2.3	Expression de <i>CYP94C1</i> chez des lignées rapportrices GUS	171
6.2.3	Niveaux de jasmonates dans les fleurs des mutants <i>cyp94s</i>	174
6.2.4	Expression de gènes de métabolisme et de signalisation de la voie des jasmonates ou impliqués dans le développement floral.....	180
6.2.4.1	Expression des amido-hydrolases <i>IAR3</i> et <i>ILL6</i> dans les fleurs des mutants d'expression de <i>CYP94s</i>	180
6.2.4.2	Expression des allènes oxyde cyclases <i>AOC1</i> et <i>AOC4</i> dans les fleurs des mutants <i>cyp94s</i>	182
6.2.4.3	Expression des facteurs de transcription <i>MYB21</i> et <i>MYB24</i> dans les fleurs des mutants d'expression de <i>CYP94s</i>	183
6.2.4.4	Expression des gènes <i>JAZs</i>	184
6.2.4.4.1	Expression des 12 gènes <i>JAZs</i> dans des fleurs de Col0	184
6.2.4.4.2	Expression de <i>JAZ1</i> , <i>JAZ3</i> , <i>JAZ5</i> , <i>JAZ9</i> , <i>JAZ10</i> , <i>JAZ11</i> dans les fleurs de mutants d'expression de <i>CYP94s</i>	185
6.2.4.5	Expression des myrosinases <i>TGG1</i> et <i>TGG2</i> dans les fleurs des mutants d'expression de <i>CYP94s</i>	188
6.2.5	Phénotype des mutants de gènes <i>CYP94s</i>	189
6.2.5.1	Aspect des étamines, pistil, pollen (miniMEB).....	189
6.2.5.2	Test de viabilité du pollen chez les mutants.....	189
6.2.5.3	Germination des grains de pollen.....	190
6.3	Conclusion.....	191
6.4	Discussion	192

RESULTATS partie 3 :	195
Diversité de l'oxydation de conjugués JA-acides aminés : exemple de l'étude de JA-Phe	195
7 IDENTIFICATION DE NOUVEAUX JASMONATES OXYDES : CYP94B3 ET CYP94C1 CATALYSENT LA CARBOXYLATION DE JA-PHE ET DE JA-ILE VIA DES INTERMEDIAIRES ALDEHYDES	197
7.1 Introduction et hypothèse de travail	197
7.2 Métabolisme de JA-Phe par CYP94C1 <i>in vitro</i>	201
7.2.1 Analyse en mode SCAN des milieux d'incubation.....	201
7.2.1.1 Recherche de pic NADPH-dépendant.....	201
7.2.1.2 Visualisation des masses m/z des ions contenus dans le pic NADPH-dépendant	203
7.2.2 Identification de 12CO-JA-Phe par dérivatisation à la méthoxyamine.....	204
7.2.3 Mise au point de méthodes d'analyse en mode MRM pour 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe.....	208
7.2.3.1 Sélection d'une énergie de collision et d'un ion fils	208
7.2.3.2 Analyse en mode MRM des 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe dans les milieux d'incubation.....	213
7.3 Recherche d'un intermédiaire aldéhyde lors de la carboxylation de JA-Ile par CYP94C1 <i>in vitro</i>	214
7.4 Etude du métabolisme de JA-Phe et de JA-Ile par CYP94B1 et CYP94B3	218
7.5 Recherche des nouveaux jasmonates oxydés dérivés de JA-Phe et JA-Ile dans les feuilles blessées de Col0	219
7.6 Analyse des niveaux de 12OH-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Ile chez les mutants d'expression des gènes <i>CYP94s</i>	222
7.7 Recherche de JA-Phe dans les fleurs ou des feuilles de Col0 infectées par <i>Botrytis cinerea</i>	228
7.8 Conclusion.....	229
7.9 Discussion	230
7.10 Article soumis au journal <i>Metabolomics</i> : Identification of the 12-oxojasmonoyl-isoleucine, a new jasmonate in Arabidopsis, by combining chemical derivatization and LC-MS/MS analysis.	233

7.11	Article en préparation : Identification of new oxidized jasmonates: CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 hydroxyl Jasmonoyl-Phenylalanine and Jasmonoyl-Isoleucine further oxidized to carboxyl derivatives through aldehyde intermediate.....	254
	DISCUSSION	283
8	DISCUSSION	285
8.1	La co-régulation transcriptionnelle comme outil prédictif de l'analyse du métabolisme des jasmonates	285
8.2	Les voies cataboliques de l'hormone JA-Ile	286
8.3	Des profils particuliers de jasmonates sont formés dans différentes situations physiologiques.....	290
8.4	Diversité de l'oxydation de conjugués JA-acide aminé par les CYP94s	294
8.5	Impact de l'oxydation sur la signalisation et la régulation de la voie JA.....	295
8.6	Perspectives.....	299
8.6.1	Rôles des amido-hydrolases ?	299
8.6.2	Rôles des formes oxydées formées par les CYP94s ?.....	300
8.6.3	Vers un modèle de signalisation des jasmonates incluant divers complexes JAZ/JA-acide aminé/COI1 pour assurer des réponses spécifiques.....	301
8.6.4	Les CYP94s, enzymes clés pour la régulation d'un large panel de conjugués JA-acide aminés impliqués dans des réponses spécifiques ?.....	304
	Annexes	306
	Bibliographie.....	316
	Résumé	328
	Synopsis.....	328

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
°C	Degré Celsius
AcLi	Acétate de lithium
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Albumine de sérum bovin
COI1	Coronatine insensitive
DAD1	DELAYED DEHISCENCE 1
dhJA	9,10-dihydro-JA
dhJA-Ile	9,10-dihydro-JA-Ile
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
ESI	Electrospray ionisation
<i>g</i>	Accélération
GUS	B-glucuronidase
h	Heure
IAA	Acide indole 3-acétique
Ile	Isoleucine
JA	Acide jasmonique
JA-Ile	(+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine
JAR1	Jasmonate Resistant 1
JAZ	Jasmonate ZIM domain
JMT	S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase
MeJA	Méthyle jasmonate
Méthoxyamine	CH ₃ -O-NH ₂
min	Minute

MRM	Multiple Reaction Monitoring
OPDA	Acide 12-oxo-phytyldiénoïque
OPR3	OPDA réductase 3, 12-oxophytyldienoate reductase
P450s	Cytochromes P450
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
Phe	Phénylalanine
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
qPCR	PCR quantitative ou en temps réel
RE	Réticulum endoplasmique
RNAi	ARN interférence
s	Seconde
Silane	3-Aminopropyltriéthoxysilane
SIR	Selected Ion Recording
ST2A	Sulfotransférase 2A
TGG2	THIOGLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 2
UPLC	Chromatographie liquide ultra-performante
UPLC-MS	Chromatographie Liquide Ultra Performance couplée à la spectrométrie de masse
V	Volt
X-Glc	Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

1.1 Les enzymes à cytochromes P450 (P450s)

Les plantes étant des organismes sessiles, elles ne peuvent fuir des conditions environnementales défavorables. Pour lutter contre les stress biotiques et abiotiques, les plantes ont développé des protections physiques complémentées d'un arsenal chimique. La mise en place de ces barrières protectrices et d'un réseau complexe de voies métaboliques produisant des composés de défense sont notamment orchestrées par les enzymes à cytochromes P450 (P450s ou CYPs). La plupart des P450s sont inductibles par des facteurs physiques et chimiques variés (Durst et O'Keefe, 1995), ce qui soutient l'idée que ces enzymes participent à l'adaptation des plantes à l'environnement. Par exemple, *CYP94A1* de *Vicia sativa* a une expression induite par des stress chimiques (Benveniste et al., 2005) et des polluants atmosphériques (Kastner et al., 2011) et *CYP94C1* d'*Arabidopsis thaliana* a une expression induite par le méthyle jasmonate et la blessure (Kandel et al., 2007). Ces protéines possèdent des propriétés catalytiques très diverses (Nelson et Werck-Reichhart, 2011).

1.1.1 Propriétés catalytiques des cytochromes P450

1.1.1.1 Types de réactions catalysées

Les P450s sont des hémoprotéines membranaires, généralement localisées au niveau du réticulum endoplasmique. Les P450s sont des monooxygénases catalysant l'incorporation d'un atome d'oxygène dans une molécule substrat. L'activation d'oxygène après liaison à l'hème permet aux P450s de catalyser des réactions thermodynamiquement défavorables telles que l'hydroxylation de groupes alkyles non fonctionnalisés d'acides gras ou d'hydrocarbures (Coon, 2005). Ces enzymes peuvent également catalyser des réactions d'isomérisation, d'époxydation, d'oxydation sur un atome d'azote ou de soufre et des réactions de C-déalkylation, N-déalkylation ou O-déalkylation (Durst et O'Keefe, 1995).

1.1.1.2 Mécanisme de catalyse des P450s

Le mécanisme de catalyse des P450s a été étudié (Schlichting et al., 2000) et est détaillé dans la figure 1-1.

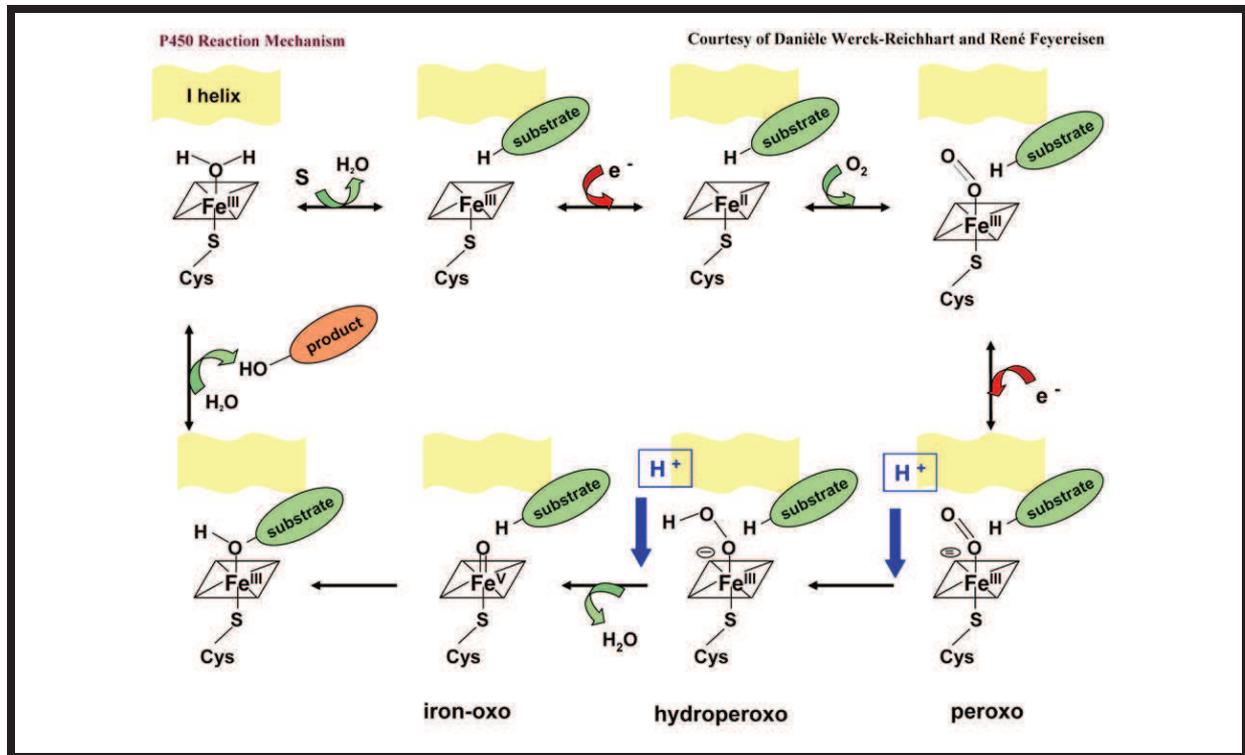
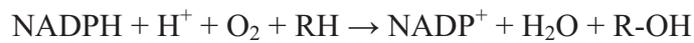


Figure 1-1 : Mécanismes de catalyse lors d'une réaction de monoxygénation d'un substrat par un P450. Pour cette réaction, deux électrons permettent l'activation d'une molécule de dioxygène au niveau de l'hème du P450, puis une molécule d'eau est produite et le substrat peut être oxydé. D'après (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000) et sur le site <http://www.p450.kvl.dk/p450.shtml>.

Lorsque le site actif du P450 est au repos, l'atome de fer de l'hème est hexacoordonné, avec quatre liaisons au noyau hémique, une liaison au soufre d'une cystéine conservée chez les P450s et une liaison à une molécule d'eau. En présence de substrat, la molécule d'eau se détache de l'atome de fer et un électron provenant de NADPH permet de passer d'un état de fer ferrique (Fe^{3+}) à fer ferreux (Fe^{2+}). Une molécule de dioxygène s'associe alors à l'atome de fer et un deuxième électron provenant de NADPH active la molécule d' O_2 . Un proton provenant d'une molécule d'eau ou d'un acide aminé à proximité, permet de former ensuite un groupement hydroperoxo. Un deuxième proton provoque la scission de la liaison $O-O$, une molécule d'eau est libérée et une espèce de fer (Fe^{4+})-oxo très réactive est formée avec l'atome d'oxygène restant. Le P450 active le substrat par abstraction d'un hydrogène ou d'un électron puis le substrat est oxydé. Le produit est alors libéré et une molécule d'eau se repositionne dans le site actif.

Le bilan réactionnel d'une réaction de monooxygénation d'un substrat (R) par un P450 est :



Le nom de P450 provient de propriétés spectrophotométriques de ces enzymes. En effet, ces hémoprotéines ont la particularité de présenter un pic d'absorption à 450 nm lorsque le noyau hémique est réduit et qu'une molécule de monoxyde de carbone (CO) est liée au site actif (Omura et Sato, 1964).

1.1.1.3 Rôle de la cytochrome P450 réductase couplée au cytochrome P450

Une cytochrome P450 réductase est couplée au P450. Celle-ci a pour rôle de fournir les deux électrons au P450 à partir de NADPH afin d'activer le dioxygène (figure 1-2). Chez les plantes, les P450s ont des domaines conservés incluant notamment une région charnière reliant l'ancre membranaire en N-terminal à la partie globulaire cytosolique, au sein de laquelle une cystéine interagit avec l'hème dans le site actif (figure 1-2).

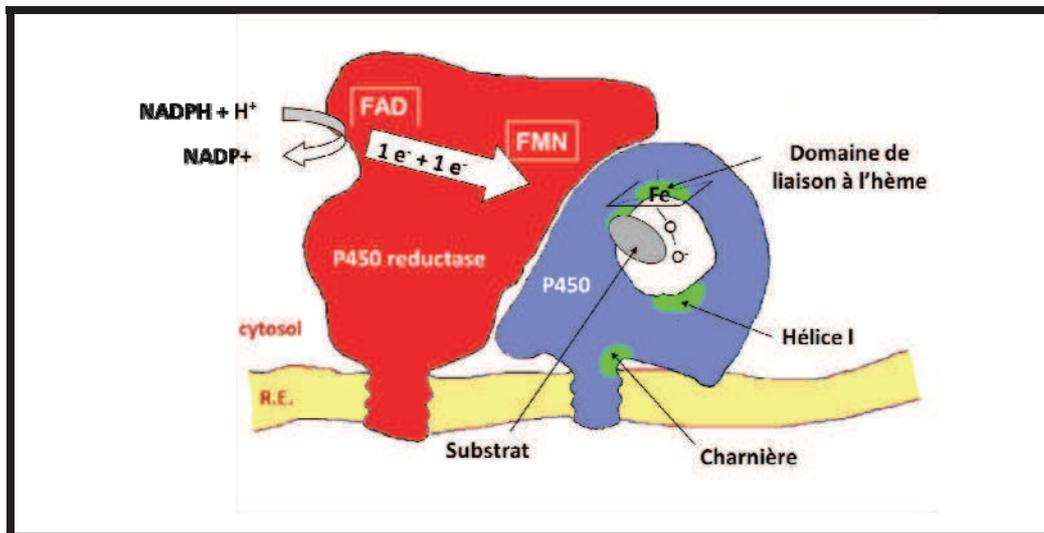


Figure 1-2 : Schéma d'une cytochrome P450 réductase (CPR) couplée à un cytochrome P450. La CPR permet le transfert d'électrons provenant de NADPH vers le cytochrome P450. D'après Werck-Reichhart et al. (2000).

1.1.2 Diversité des cytochromes P450

Les P450s sont présents chez les végétaux et les animaux, les champignons, les procaryotes et les protistes (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Toutefois, ce sont les plantes qui en possèdent le plus (Nelson, 2006). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* comporte 246 gènes de P450s et le peuplier, le riz et la vigne en possèdent 312, 356 et 457

respectivement (Nelson et al., 2004) tandis que le génome humain ne code que pour 57 P450s (Nebert et al., 2013). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, appelée également arabette des dames ou arabette de Thalius, les P450s représentent la plus grande famille de gènes après les protéines F-box et les récepteurs like-kinases (Nelson et Werck-Reichhart, 2011).

1.1.2.1 Nomenclature des cytochromes P450

Les P450s sont nommés en fonction de leur identité de séquence d'acides aminés avec d'autres P450s. Des enzymes partageant 40% d'identité de séquence d'acides aminés font partie d'une même famille et à partir de plus de 55% d'identité les P450s sont classés dans une même sous-famille. Le symbole CYP est suivi du nombre de la famille, de la lettre de la sous-famille et du numéro du gène.

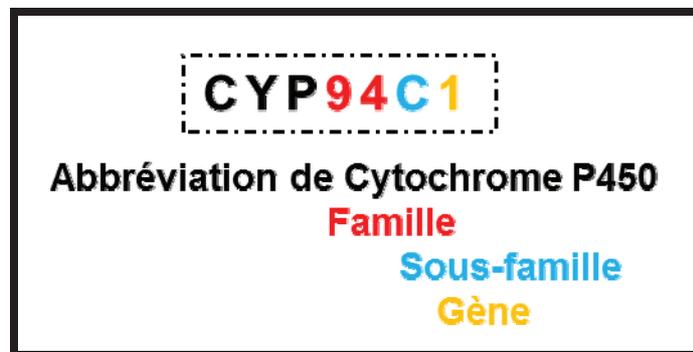


Figure 1-3 : Exemple de nomenclature pour un cytochrome P450.

1.1.2.2 Rôles biologiques des P450s chez les plantes

1.1.2.2.1 Implication des P450s dans de nombreuses voies métaboliques

Le rôle physiologique de la majorité des P450s reste à découvrir, notamment chez *Arabidopsis thaliana*, pour laquelle moins de 30% des P450s avaient une fonction caractérisée en 2010 (Mizutani et Ohta, 2010).

Les P450s sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques, notamment la voie des phénylpropanoïdes conduisant à la synthèse de lignine et de sporopollénine (exine des grains de pollen) (Morant et al., 2007), la synthèse de composés volatils (Irmisch et al., 2013), la synthèse de composés de défense comme la camalexine (Glawischnig, 2006) et d'alcaloïdes comme le taxol (Kaspera et Croteau, 2006), le métabolisme des stérols et la production de pigments (flavonoïdes et caroténoïdes). L'implication de P450s dans la biosynthèse et le

catabolisme d'hormones ainsi que dans la synthèse d'enveloppe protectrice contre la dessiccation, les rayonnements ultra-violets et les pathogènes a également été décrite (Bak et al., 2011).

1.1.2.2.2 Les ω -hydroxylases d'acides gras dans la synthèse de cutine et de subérine

La synthèse de cutine et de subérine, des biopolymères hydrophobes qui représentent une barrière physique entre la plante et l'environnement, ont permis aux plantes de conquérir le milieu terrestre (Pollard et al., 2008). Ces polymères sont principalement constitués d'acides gras, reliés entre eux par des liaisons esters entre les groupements carboxyle et ω -hydroxyle des acides gras.

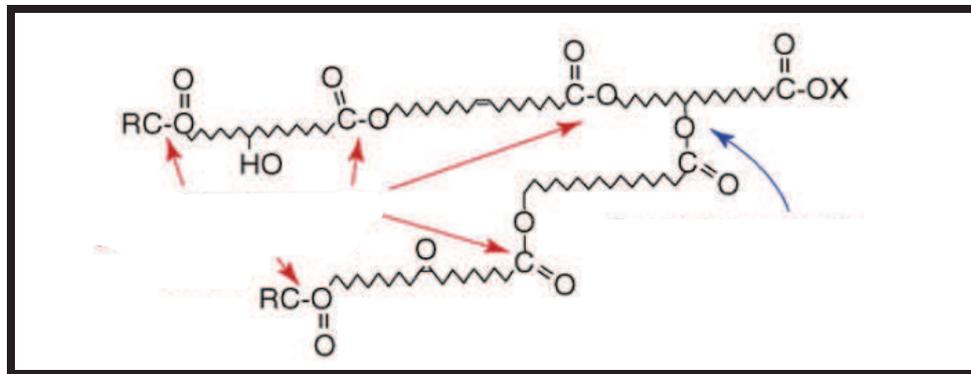


Figure 1-4 : Le polymère de cutine est formé par des acides gras reliés entre par des liaisons esters entre les groupements hydroxyle et carboxyle des acides gras. Les liaisons esters primaires sont désignées par des flèches rouges et la liaison ester secondaire est pointée par une flèche bleue. D'après (Kolattukudy, 1980).

Les premières ω -hydroxylases d'acides gras P450-dépendantes, CYP94A1 (Tijet et al., 1998) et CYP86A1 (Benveniste et al., 1998) ont été caractérisées dans notre laboratoire. CYP94C1 a ensuite été identifiée comme une ω -hydroxylase particulière catalysant l'oxydation complète d'un méthyle en fonction carboxyle (Kandel et al., 2007) (figure 1-5).

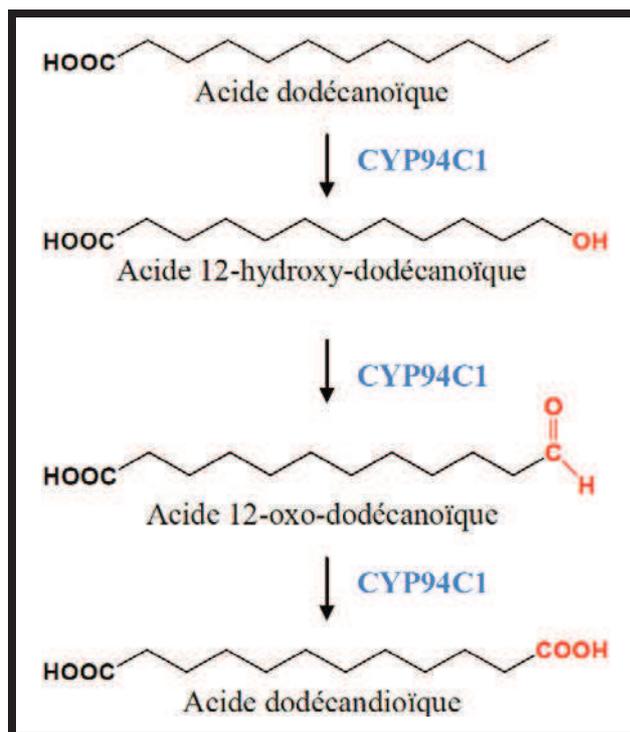


Figure 1-5 : CYP94C1 est une ω -hydroxylase d'acides gras aux propriétés particulières. CYP94C1 catalyse l'oxydation complète du méthyle terminal en fonction acide. D'après (Kandel et al., 2007).

Les membres de la famille CYP94 et CYP86 étaient donc des acteurs potentiels pour la synthèse de cutine et de subérine. L'étude de plantes mutantes *d'Arabidopsis thaliana* a confirmé le rôle de CYP86s dans l' ω -hydroxylation d'acides gras incorporés dans la cutine et la subérine (Pinot et Beisson, 2011). En revanche, le rôle de P450s de la famille CYP94 dans la synthèse de ces polymères reste à déterminer.

1.1.2.2.3 Les P450s dans la biosynthèse d'hormones

Outre ces barrières physiques, les P450s participent à des défenses chimiques orchestrées par des voies de signalisation hormonale. Les cytochromes P450s sont impliqués dans la synthèse d'hormones. Par exemple, au moins 10 P450s appartenant à 5 sous-familles distinctes interviennent dans la biosynthèse des brassinostéroïdes, notamment CYP85A1, CYP85A2, CYP90A1, CYP90B1 chez *Arabidopsis thaliana*. (Fujita et al., 2006; Ye et al., 2010) Des P450s interviennent également dans le métabolisme des gibbérellines. Par exemple, CYP701A et CYP88A participent à la biosynthèse de l'hormone active GA₁₂ (Helliwell et al., 1998; Helliwell et al., 2001).

L'implication de P450s dans le catabolisme d'hormones est également documentée et nous aborderons cet aspect (paragraphe 1.6.1.2) après avoir exposé les rôles des phytohormones, en particulier ceux des jasmonates.

1.2 Diversité des phytohormones et de leurs fonctions physiologiques

Les hormones sont des molécules clés pour déclencher des signalisations aboutissant à des réponses physiologiques spécifiques. Les phytohormones régissent le cycle de vie de la plante, son développement, sa reproduction mais également des réponses de défense et d'adaptation aux stress abiotiques et biotiques environnementaux (Santner et Estelle, 2009).

1.2.1 Différentes classes de phytohormones

Les diverses phytohormones identifiées sont synthétisées à partir de différents types de précurseurs. Certaines hormones sont formées à partir de précurseurs lipidiques, comme les jasmonates (JAs), les gibbérellines (GA), l'acide abscissique (ABA) et les brassinostéroïdes (BR). D'autres molécules signal sont synthétisées à partir d'acides aminés, comme l'auxine, l'acide salicylique (SA) ou l'éthylène, ou bien à partir d'une base purique dans le cas des cytokinines. La figure 1-6 présente des molécules représentatives de ces classes de phytohormones.

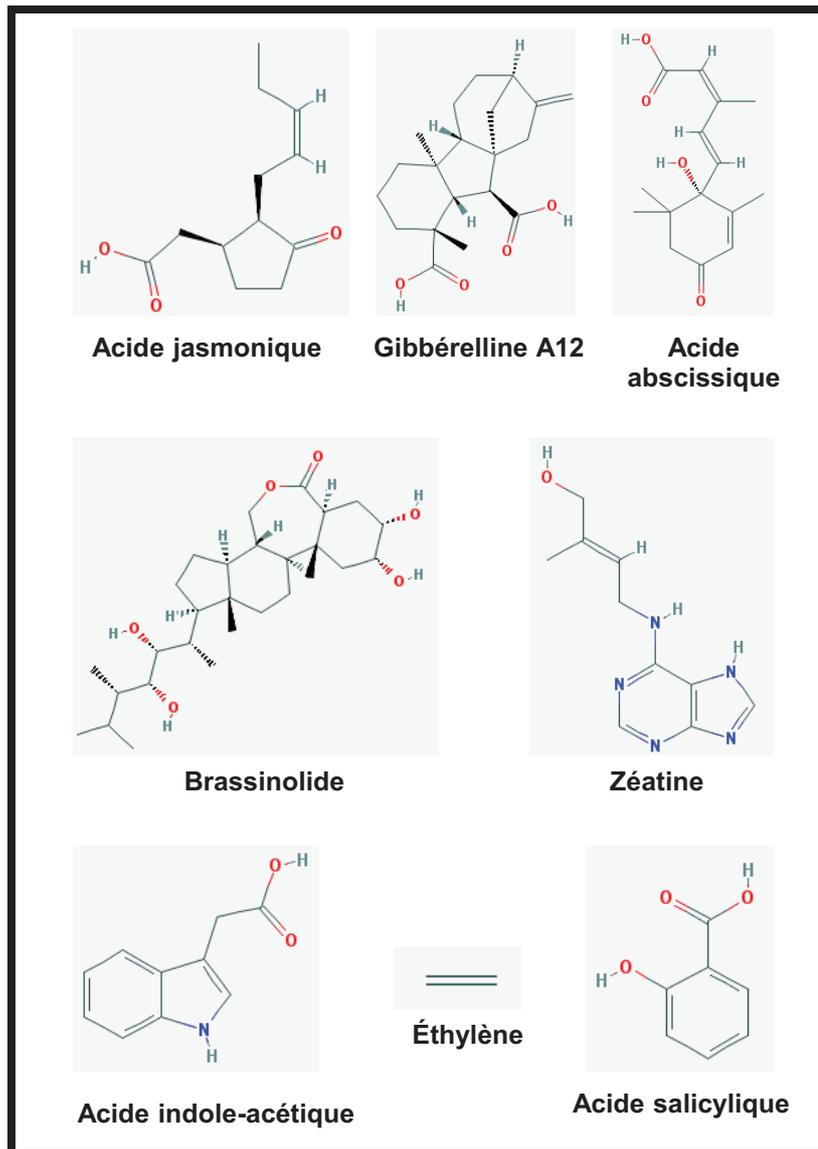


Figure 1-6 : Illustration de la diversité des hormones végétales. L'acide jasmonique fait partie de la classe des Jasmonates, la gibbérelline A12 des Gibbérellines, le brassinolide des Brassinostéroïdes, la zéatine des Cytokinines et l'acide indole-acétique de l'Auxine. (Les structures des composés proviennent du site pubchem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>)).

1.2.2 Fonctions physiologiques des hormones végétales

Les fonctions physiologiques des hormones sont variées et complexes. Chaque hormone contrôle une signalisation conduisant à des réponses spécifiques. Dans la majorité des situations, plusieurs hormones interviennent pour contrôler un phénomène (par exemple un processus développemental précis ou des réponses de défense spécifiques), de manière synergique ou antagoniste. Des interactions entre voies de signalisations hormonales, nommées « crosstalks », peuvent intervenir. Il existe des crosstalks directs où plusieurs voies

hormonales partagent un même composant de signalisation, et des crosstalks indirects où un signal transmis par une voie hormonale peut stimuler ou réprimer un signal d'une autre voie de signalisation hormonale (Erb et al., 2012).

1.2.2.1 Rôle des hormones dans le développement

Plusieurs hormones contrôlent la croissance des plantes, notamment les BR, GA et auxines qui peuvent agir parfois de façon synergique (Depuydt et Hardtke, 2011). L'éthylène promeut la maturation des fruits (Burg et Burg, 1962) et inhibe l'initiation de la floraison (Achard et al., 2007). La germination des graines est contrôlée de manière antagoniste par l'ABA et les GA (Piskurewicz et al., 2008). La sénescence des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* est contrôlée par JA, SA, l'éthylène et plus récemment l'implication de GA en amont de ces signalisations a été suggérée (Chen et al., 2014). Des actions antagonistes entre les voies GA et JA ont été décrites mais un synergisme entre les voies de signalisation de ces hormones a également été établi (Wild et al., 2012; Qi et al., 2014). L'OPDA, une molécule de la classe des jasmonates, joue un rôle important dans le développement de l'embryon chez la tomate (Goetz et al., 2012). L'initiation de la formation de trichomes est stimulée par la voie JA (Boughton et al., 2005; Yoshida et al., 2009; Qi et al., 2011). Par ailleurs, la croissance racinaire est inhibée par un traitement avec des jasmonates (Staswick et al., 1992). La voie JA est nécessaire pour le développement floral (Song et al., 2013). Chez *Arabidopsis thaliana*, de nombreuses études ont permis la caractérisation des enzymes de biosynthèse et des facteurs de signalisation indispensables à la fertilité mâle (Song et al., 2013; Wasternack et al., 2013). Nous développerons ce sujet dans le paragraphe 1.5 après avoir introduit les caractéristiques générales de la signalisation de JA-Ile.

1.2.2.2 Rôle des hormones en réponse aux stress environnementaux

Les phytohormones permettent également à la plante de se défendre contre les stress environnementaux. Les plantes sont confrontées à des stress abiotiques, tels que la température (froid ou chaleur), la sécheresse ou au contraire l'excès d'eau, le vent, les rayonnements UV. L'éthylène régule négativement les gènes de tolérance au froid (Shi et al., 2012). De l'OPDA est produit lors d'un stress hydrique et il a été suggéré que cette molécule pourrait participer à la régulation de l'ouverture des stomates (Savchenko et Dehesh, 2014).

1.2.2.2.1 Reconnaissance des stress biotiques

Les réponses de défense de la plante appropriées face à un stress biotique requièrent d'abord la reconnaissance d'éléments associés à ce stress. Les pathogènes sont reconnus par des motifs conservés de molécules microbiennes (flagelline, peptidoglycanes et lipopolysaccharides des bactéries, chitine) appelées « MAMPs » (Microbe-Associated Molecular Patterns) ou « PAMPs » (Pathogen-Associated Molecular Patterns), qui sont détectées par des récepteurs reconnaissant ces motifs (PRRs, Pattern Recognition Receptor) à la surface de la cellule végétale (Jones et Dangl, 2006). Cela conduit à l'immunité déclenchée par les PAMPs (PTI, PAMP-Triggered Immunity). Par ailleurs, les motifs moléculaires associés aux dégâts, les « DAMPs » (Damage-Associated-Molecular Patterns) qui sont produits par la plante après infection, sont également reconnus par les PRRs pour déclencher des réactions de défense. Il s'agit de réponses immunes innées. Les pathogènes peuvent contourner ce système de défense par l'action de protéines effectrices. Certains génotypes de plante produisent en contrepartie des protéines de résistance qui peuvent spécifiquement reconnaître les effecteurs du pathogène et assurer ainsi une immunité basée sur les effecteurs (ETI, Effector Triggered Immunity) (Denance et al., 2013).

1.2.2.2.2 Les réponses déclenchées lors d'une attaque par un herbivore

L'attaque par un insecte herbivore induit plusieurs signaux internes à partir des tissus blessés, notamment des flux calciques, des cascades de phosphorylation et la signalisation JA (Furstenberg-Hagg et al., 2013). Les défenses contre les herbivores sont très majoritairement contrôlées par la voie JA (Howe et al., 1996; McConn et al., 1997; Hu et al., 2013; Schweizer et al., 2013; Song et al., 2014), mais les hormones éthylène, SA, ABA, auxine, CK, BR, et GA interviennent également (Erb et al., 2012). Les réponses de défense incluent la production de composés pouvant repousser ou empoisonner les insectes, et de protéines interférant avec la digestion. Par ailleurs, une défense indirecte consiste à attirer des prédateurs ou des parasites de ces herbivores, en produisant des composés volatiles, du nectar extra-floral ou des éléments nutritifs (Furstenberg-Hagg et al., 2013). La voie des jasmonates induit l'expression de gènes qui conduisent à l'accumulation de protéines et d'un arsenal chimique voués à la défense (Wu et Baldwin, 2010; Mithofer et Boland, 2012). Une molécule volatile de type jasmonate, le méthyle jasmonate, est synthétisée par la plante agressée et permet notamment d'alerter les plantes voisines et d'induire des réponses de défense chez celles-ci (Farmer, 2001; Holopainen et Blande, 2012).

1.2.2.2.3 Les réponses de défense contre les pathogènes microbiens

L'éthylène, JA et SA régulent également les réponses de défense contre les pathogènes microbiens. Par exemple, lors d'une infection, SA est requis pour mettre en place une résistance systémique acquise (SAR), un mécanisme qui active les réponses de défense dans des tissus non-infectés et confère une protection contre des infections ultérieures par divers agents microbiens (Durrant et Dong, 2004). Les jasmonates sont notamment requis pour la résistance à des pathogènes fongiques racinaires (Vijayan et al., 1998) ou foliaires (Rowe et al., 2010). Les réponses de défense de la plante contre les microorganismes incluent un renforcement de la paroi cellulaire, une réponse hypersensible avec la génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS), l'accumulation de métabolites secondaires comme des composés phénoliques ou des tannins et enfin la production de protéines « pathogenesis-related » (PR) (Sels et al., 2008). Par exemple, les défensines de plante constituent la famille 12 des protéines PR (Sels et al., 2008). Ce sont de petits peptides cationiques formant des pores multimériques qui perméabilisent les membranes (White et al., 1995). *PDF1.2a* code pour une défensine et est induit par les voies JA et éthylène chez *Arabidopsis thaliana* (Penninckx et al., 1996). La famille PR4 comprend des chitinases qui sont des enzymes dégradant le polymère de chitine (N-acétylglucosamine), un constituant important de la paroi cellulaire des champignons (Pel et Pieterse, 2013).

Les hormones JA, éthylène et SA jouent des rôles clés dans les réponses de défense des plantes aux pathogènes. Les pathogènes biotrophes ont besoin de cellules de plante vivantes pour se développer et se reproduire, alors que les pathogènes nécrotrophes doivent tuer les cellules de plante pour rendre les substances nutritives accessibles et pouvoir croître et accomplir leur cycle de vie. Les réponses déclenchées par JA et l'éthylène sont plutôt efficaces pour développer des défenses contre les pathogènes nécrotrophes alors que SA promeut essentiellement des réponses contre les pathogènes biotrophes. Plus particulièrement, la voie SA exerce une inhibition sur la voie JA comme illustré figure 1-7 (Van der Does et al., 2013). La voie JA permet l'activation de facteurs de transcription tels qu'ORA59 et ERF1, ce qui permet l'induction de la transcription de gènes de défense, notamment le gène de la défensine *PDF1.2*. La voie éthylène agit de manière synergique à la voie JA en stimulant également ces facteurs de transcription permettant la synthèse de gènes de défense contre les pathogènes nécrotrophes (Wasternack et Hause, 2013).

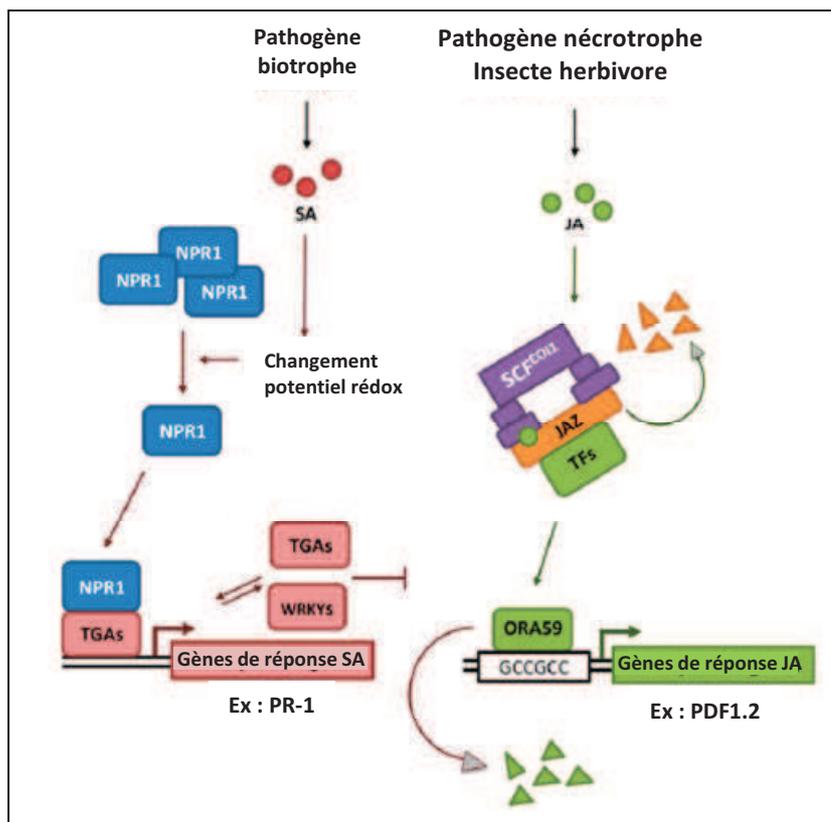


Figure 1-7 : Modèle d'interaction entre les signalisations SA et JA au niveau des promoteurs de gènes de réponse au JA contenant une boîte GCC. D'après Van der Does et al. (2013). L'infection par un pathogène biotrophe induit l'accumulation de SA qui provoque la monomérisation de NPR1 via des changements rédox dans la cellule. NPR1 (monomérique) est alors transféré dans le noyau où il interagit avec les facteurs de transcription TGA pour induire l'expression des gènes de réponse au SA. L'expression d'un large panel de gènes WRKY est induite par SA, certains d'entre eux pouvant réguler l'expression de gènes de réponse au SA. La blessure, notamment causée par un insecte herbivore, ou l'infection par un pathogène nécrotrophe, induisent l'accumulation de JA-Ile. L'hormone promeut la dégradation des répresseurs transcriptionnels JAZs via un complexe E3-ubiquitine ligase SCF^{COI1}, ce qui permet de libérer des facteurs activateurs de transcription tels que MYC2, EIN3 et EIL1. En conséquence, les facteurs de transcription AP2/ERF tels qu'ORA59 et ERF1 sont induits pour activer la branche ERF de la voie JA. La liaison d'ERFs à la boîte GCC induit l'expression de gènes de réponse au JA (ex : *PDF1.2*). SA peut affecter négativement l'accumulation de la protéine ORA59, ce qui soutient l'effet antagoniste entre l'expression des gènes de réponse au JA et au SA. Les TGAs et WRKYs pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de la voie JA. Les flèches indiquent des activités établies ou l'accumulation de composés ; ceux en rouge indiquent des activités médiées par la voie SA ; ceux en vert indiquent des activités médiées par la voie JA.

1.3 Les jasmonates (JAs)

1.3.1 Biosynthèse de JA et de son conjugué Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile)

Les jasmonates sont une classe de phytohormones jouant des rôles clés dans la régulation de la croissance et du développement de la plante ainsi que des réponses aux stress

abiotiques et biotiques (Fonseca et al., 2009a; Acosta et Farmer, 2010; Wasternack et Kombrink, 2010; Wasternack et Hause, 2013).

La biosynthèse de JAs est fortement stimulée par les attaques d'herbivores ou après une blessure mécanique foliaire (Glauser et al., 2008). Ces étapes enzymatiques sont distribuées dans différents compartiments cellulaires. Elle débute dans les plastes, se déroule ensuite dans le peroxyosome puis dans le cytosol (figure 1-8).

La synthèse se fait à partir des acides gras insaturés C16:3 ou C18:3 (acide linoléique, LnA). Ces précurseurs sont estérifiés dans les glycérolipides complexes des membranes plastidiques. La désaturation d'acides gras pour la formation des précurseurs C16:3 et C18:3 est assurée par les désaturases **FAD** (Miquel et Browse, 1992; McConn et Browse, 1996). L'action de phospho- ou galactolipases est nécessaire pour libérer les acides gras insaturés C18:3 ou C16:3 des membranes plastidiques. **DAD1** est une phospholipase A₁ localisée dans les plastes et son expression est induite par la blessure foliaire (Ishiguro et al., 2001). Ce gène est également exprimé dans le filet des étamines et *dad1* est mâle stérile. Dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* il y a 12 gènes codant pour des protéines DAD1 ou DAD1-like (Ishiguro et al., 2001). Ces enzymes portent souvent des activités phospholipases et galactolipases dans des proportions spécifiques à chaque membre. Les lipoxygénases **13-LOX** catalysent la formation d'un groupement hydroperoxyde en position 13 de l'acide linoléique pour produire l'acide (13*S*)-hydroperoxyoctadécatriénoïque (13-HPOT). La lipoxygénase de tomate *TomLoxD* a une expression induite dans les feuilles blessées (Heitz et al., 1997). Le groupement hydroperoxyde de 13-HPOT est ensuite converti en fonction allénique par l'allène oxyde synthase (**AOS**), ou CYP74A1 chez *Arabidopsis thaliana*, qui est un cytochrome P450 atypique localisé dans les plastes et qui ne nécessite pas de molécule d'oxygène et de transfert d'électron pour former le produit (Laudert et al., 1996; Stumpe et Feussner, 2006). Puis l'allène oxyde cyclase (**AOC**) va cycliser l'allène oxyde, ce qui donne naissance à l'OPDA, la première molécule de type jasmonate. Toutes les molécules dérivées de l'OPDA sont qualifiées de jasmonates.

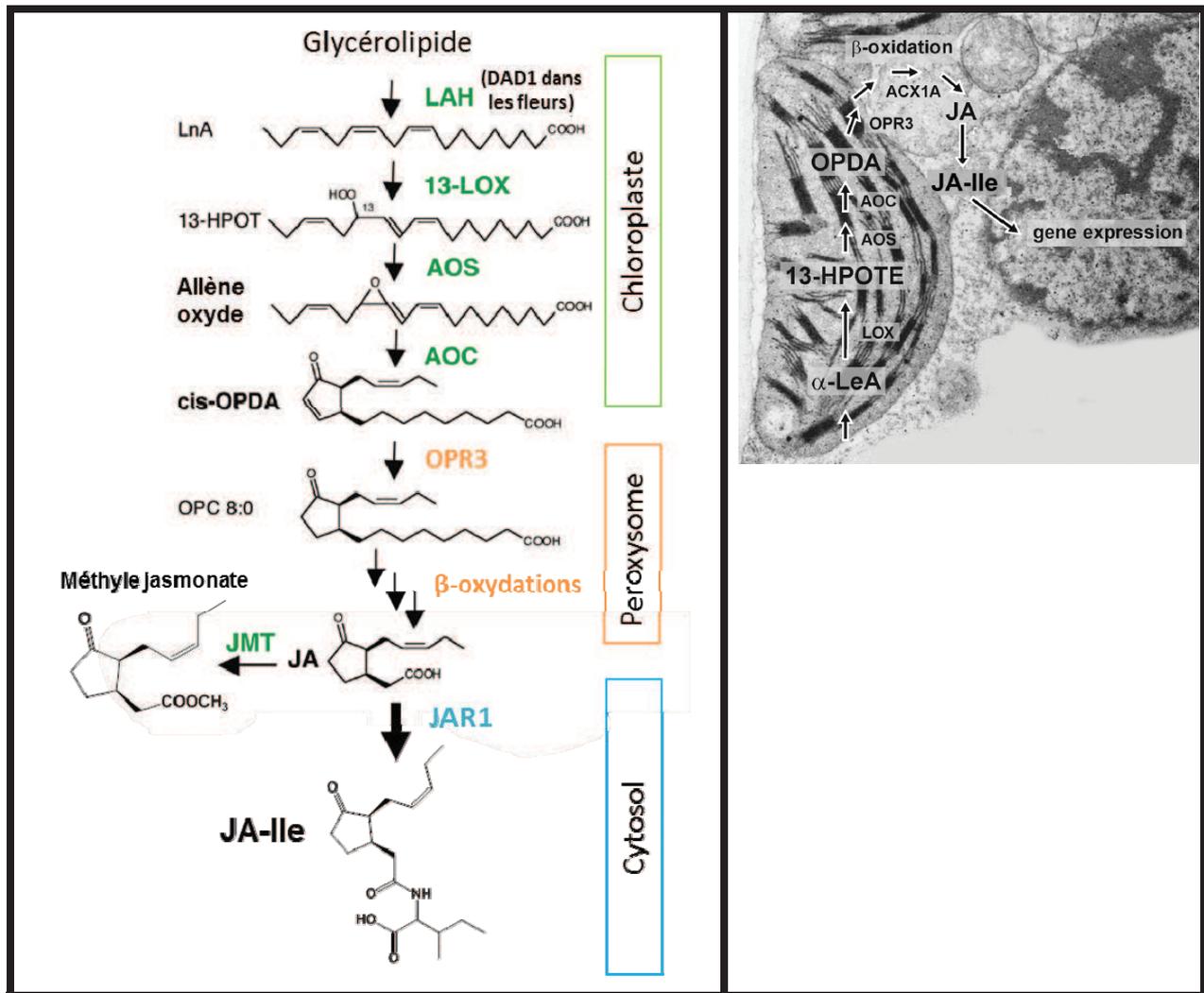


Figure 1-8 : Etapes de biosynthèse des premiers jasmonates et de l'hormone JA-Ile chez *Arabidopsis thaliana*. D'après La Camera et al. (2004). Les premières étapes de biosynthèse sont localisées dans le chloroplaste. Une lipid-acyl hydrolase (LAH), telle que DAD1 au niveau des fleurs, catalyse la libération de l'acide linoléique (LnA) qui est un acide gras insaturé (C18:3). Une lipoxygénase (13-LOX) ajoute un groupement hydroperoxyde en position 13 pour former l'acide 13-HPOT ((13S)-hydroperoxyoctadécatriénoïque), métabolisé ensuite par le cytochrome P450 CYP74A1 (AOS) pour former une fonction allène. Puis une allène oxyde cyclase (AOC) forme un pentacycle pour donner naissance à l'OPDA (acide *cis*-(+)-12-oxophytodiénoïque), la première molécule qualifiée de jasmonate. Dans le peroxyssome, la double liaison du pentacycle est réduite par l'OPDA réductase 3 (OPR3). La molécule d'OPC8:0 (acide 3-oxo-2-(2-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoïque) obtenue subit 3 étapes de β -oxydation pour raccourcir la chaîne carbonée et former l'acide jasmonique (JA). Enfin, l'enzyme Jasmonate Résistant 1 (JAR1) conjugue JA à l'isoleucine dans le cytosol pour produire l'hormone JA-Ile. JA peut également être méthyliée par l'enzyme JMT (S-adénosyl-L-méthionine:acide jasmonique carboxyle méthyltransférase).

La stéréochimie des jasmonates est assurée par l'allène oxyde cyclase (AOC) qui introduit une configuration *cis* dans l'OPDA (Ziegler et al., 2000) et cette configuration est ensuite conservée jusqu'à la synthèse de JA-Ile (Wasternack et Kombrink, 2010).

L'OPDA est ensuite transféré dans le peroxysome où la double liaison du pentacycle est réduite par une 12-oxophytodiénoate réductase (**OPR**) pour produire l'acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentényle)-cyclopentane-1-octanoïque (OPC-8:0). Des étapes de **β-oxydation** permettent de raccourcir la chaîne latérale portant la fonction carboxyle. L'OPC-8:0 doit d'abord être activé par estérification de la fonction carboxyle avec un groupement CoA par l'OPC-8:0 CoA ligase1 (OPCL1) (Koo et al., 2006). Puis trois cycles de **β-oxydation** éliminent au total 6 carbones, grâce à l'action de 3 enzymes : l'acyl-CoA oxydase (ACX), une protéine multifonctionnelle (MPF, comportant les activités énoyl-CoA hydratase et β-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase) et la 3-kétoacyl-CoA thiolase (Furstenberg-Hagg et al., 2013). Finalement une acyl-thioestérase (ACH) libère l'acide jasmonique (JA) (Schaller et Stintzi, 2009). Lorsque le C16:3 est utilisé pour initier la synthèse de JA, toutes les étapes catalytiques successives sont identiques à celles convertissant le C18:3, excepté les étapes de β-oxydation, où 2 cycles sont suffisants pour obtenir la molécule de JA qui a 12 carbones. Ensuite **JARI** (GH3-11), une JA-acide aminé synthétase, conjugue JA avec l'isoleucine dans le cytosol (Staswick et Tiriyaki, 2004; Guranowski et al., 2007). Cette enzyme est hautement spécifique du point de vue stéréochimique et produit exclusivement le (+)-7-*iso*-JA-Ile (Suza et al., 2010), qui est reconnu comme hormone active (Fonseca et al., 2009b).

1.3.2 Jasmonates dérivés de JA et de JA-Ile

De nombreuses formes modifiées de JA ont été identifiées (figure 1-9), notamment des composés hydroxylés, sulfatés, glucosylés, décarboxylés, réduits ou méthylés. La fonction de la plupart des dérivés de JA ou de JA-Ile est inconnue et peu d'enzymes impliquées dans la formation de ces dérivés ont été caractérisées.

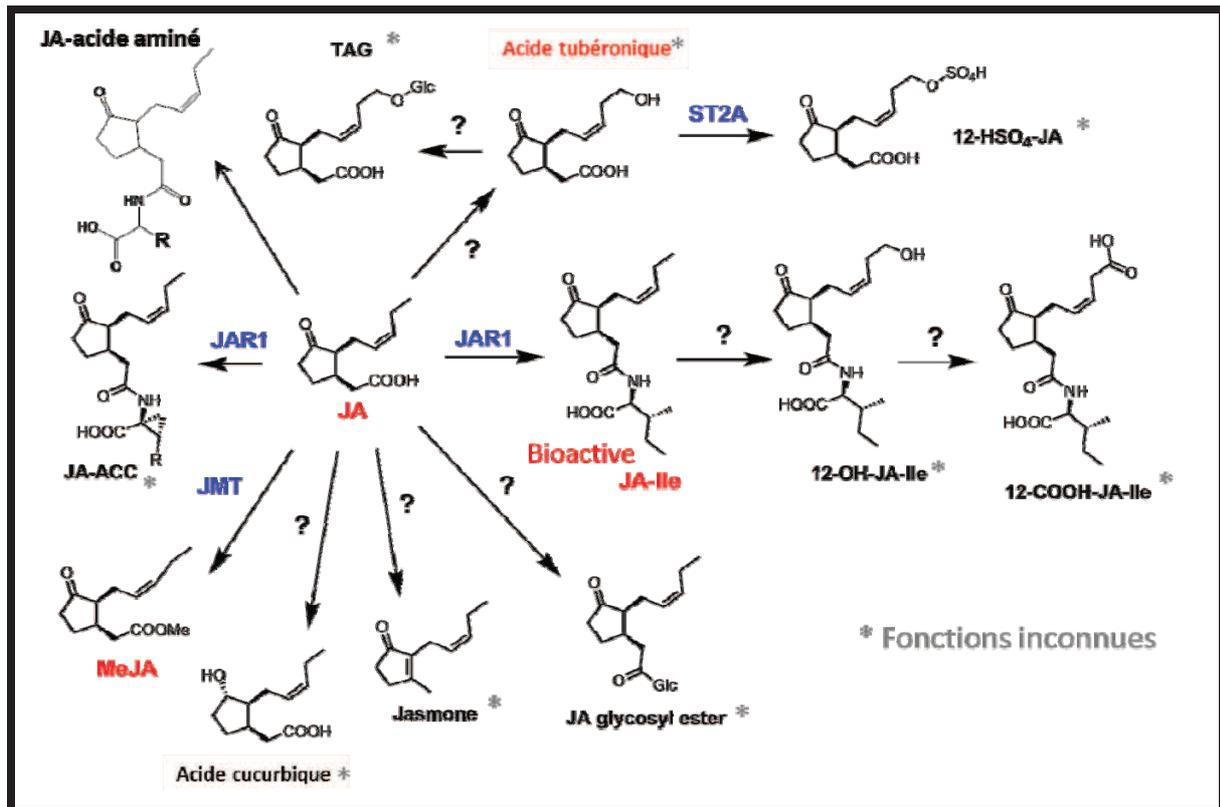


Figure 1-9 : Différents dérivés jasmonates décrits chez *Arabidopsis thaliana* en 2011. Les enzymes caractérisées formant des dérivés jasmonates sont indiquées en bleu (JAR1, Jasmonate Resistant1 ; JMT, S-adenosyl-L-méthionine:jasmonic acid carboxyle méthyltransférase ; ST2A, sulfotransférase 2A). La lettre R désigne la chaîne latérale des acides aminés conjugués à JA. Les étoiles indiquent les composés ayant des fonctions inconnues. TAG : 12-O-Glc-JA.

Parmi les modifications possibles de JA, une S-adenosyl-L-méthionine:acide jasmonique carboxyle méthyltransférase (JMT) catalyse la formation de méthyle jasmonate (MeJA) (Seo et al., 2001).

Le 12OH-JA ou acide tubéronique (TA) (figure 1-9), a été initialement décrit pour induire la formation de tubercules chez la pomme de terre, d'où son nom (Yoshihara et al., 1989). Il a ensuite été trouvé chez de nombreuses espèces dans diverses situations (Miersch et al., 2008). Les 12OH-JA et 12-HSO₄-JA (figure 1-9) sont accumulés dans les feuilles blessées de tomate et d'*Arabidopsis thaliana* (Gidda et al., 2003; Miersch et al., 2008). La sulfotransférase ST2A catalyse la formation de 12-HSO₄-JA à partir de 12OH-JA dans les feuilles blessées d'*Arabidopsis thaliana* (Gidda et al., 2003). Contrairement au méthyle jasmonate, les composés hydroxylés et sulfatés n'inhibent pas la croissance racinaire et la germination des graines de tomate. Dans les feuilles de tomate, des gènes ayant une expression induite par la blessure ou un traitement avec du MeJA ont au contraire une

expression inhibée par un traitement avec du 12OH-JA ou du 12-HSO₄-JA (Miersch et al., 2008). Ces données suggèrent que ces dérivés oxydés et sulfatés de JA pourraient participer à l’extinction de la signalisation après blessure.

Le 12-O-Glc-JA (TAG) est un autre composé accumulé dans les feuilles blessées. Sa fonction est inconnue chez *Arabidopsis thaliana*, mais ce composé a été décrit comme un signal spécifique déclenchant le repliement des feuilles de l’arbre *Samanea saman* (Nakamura et al., 2011).

L’accumulation de dérivés oxydés de JA-Ile, les 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile (figure 1-10), a également été décrite dans les feuilles blessées (Glauser et al., 2008).

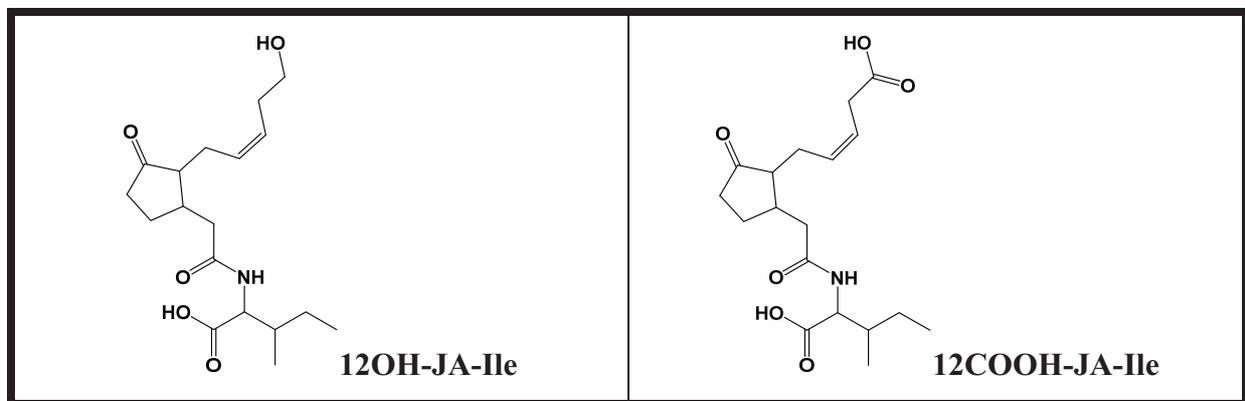


Figure 1-10 : Les formes oxydées 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile.

Un conjugué de JA avec le précurseur de l’éthylène, JA-ACC, a été décrit dans les plantules d’*Arabidopsis thaliana* de deux semaines et des tests enzymologiques ont montré que JAR1 forme ce conjugué *in vitro* (Staswick et Tiryaki, 2004).

Bien que JA-Ile soit le principal conjugué JA-acide aminé étudié, d’autres conjugués sont synthétisés *in vivo*. Par exemple, l’accumulation des conjugués Jasmonoyl-Alanine (JA-Ala), Jasmonoyl-Glutamine (JA-Gln), Jasmonoyl-Leucine (JA-Leu), Jasmonoyl-Valine (JA-Val), Jasmonoyl-Phénylalanine (JA-Phe) et Jasmonoyl-Thréonine (Thr) a été décrite dans les feuilles blessées d’*Arabidopsis thaliana* âgées de 30 jours (Koo et al., 2009). JA-Val, JA-Leu et JA-Phe sont aussi détectés dans les plantules d’*Arabidopsis thaliana* non-blessées de deux semaines (Staswick et Tiryaki, 2004). Chez *Nicotiana attenuata*, les conjugués JA-Ile, JA-Gln, JA-Leu et JA-Val sont accumulés après une blessure couplée à un traitement avec des sécrétions orales de larves du lépidoptère *Manduca sexta*, ce qui mime une attaque par cet insecte herbivore (Wang et al., 2007). Le conjugué JA-Tryptophane (JA-Trp) a été isolé à

partir de fleurs de *Vicia faba* (Brückner et al., 1988) et le conjugué JA-Tyr a également été détecté dans les fleurs de cette espèce de *Fabaceae* (Kramell et al., 2005). En revanche, JA-Trp n'est pas accumulé dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* (Staswick, 2009b). Ce conjugué a récemment été caractérisé comme un inhibiteur d'auxine au niveau des racines (Staswick, 2009b).

Des tests avec *jar1* ont montré que JA-Ile est très efficace pour inhiber la croissance racinaire, contrairement à JA-Val, JA-Leu et JA-Phe (Staswick et Tiriyaki, 2004).

Des études enzymologiques ont montré que JAR1 conjugue *in vitro* plus de la moitié des 21 acides aminés avec JA et catalyse notamment la formation de JA-Ile et JA-Phe. Cependant dans les plantules de *jar1*, les niveaux de JA-Phe sont plus élevés que chez les plantes de type sauvage, indiquant qu'une autre enzyme forme ce conjugué dans les plantules (Staswick et Tiriyaki, 2004). La formation des différents conjugués JA-acide aminés *in planta* semble donc résulter de l'activité de plusieurs enzymes.

1.3.3 Voie de signalisation des jasmonates par JA-Ile

La voie de signalisation des jasmonates, que l'on abrègera la voie JA, comprend la signalisation pouvant être gérée par l'ensemble des jasmonates, mais on sous-entend surtout le modèle COI1/JA-Ile/JAZ.

La découverte que JA-Ile est le jasmonate hormonal actif permet de qualifier l'acide jasmonique de pro-hormone. La première démonstration qu'une forme de JA couplé à un acide aminé (l'isoleucine) induit l'expression de gènes a été réalisée chez l'orge (Kramell et al., 1997). Cette forme conjuguée de JA, le Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile), a été identifiée bien plus tard comme l'entité bioactive permettant l'assemblage d'un co-récepteur « minimal » formé de la protéine F-box COI1 et d'un répresseur JAZ (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). L'interaction entre COI1 et JAZ1 est promue spécifiquement par JA-Ile et non pas par JA, MeJA ou OPDA, renforçant le concept que JA-Ile est l'hormone bioactive (Thines et al., 2007). Les mécanismes de perception sont à présent bien documentés (Katsir et al., 2008a) (Fonseca et al., 2009a).

1.3.3.1 Le complexe SCF^{COI1}

L'isolement du mutant *coil* a été le début d'une longue quête du récepteur de jasmonates. Le nom de COI1 (Coronatine Insensitive 1) vient de la résistance des plantes mutantes à la coronatine, un analogue structural de JA-Ile, synthétisée par les bactéries pathogènes *Pseudomonas syringae* et induisant la signalisation jasmonates. Ce mécanisme est un leurre pour inhiber la voie SA qui est efficace pour se défendre contre ces bactéries. Un traitement avec du MeJA ou de la coronatine provoque une inhibition de la croissance racinaire chez des plantules de type sauvage mais pas chez *coil* (Feys et al., 1994). De plus, les fleurs de ce mutant sont mâles stériles et, contrairement aux mutants de biosynthèse de JA, la fertilité ne peut pas être restaurée par un traitement exogène avec du MeJA suggérant que COI1 est impliqué dans la perception des jasmonates (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Des études de profils transcriptionnels ont montré que COI1 est un régulateur clé de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire et les défenses induits par la blessure ou le MeJA. COI1 régule environ la moitié des gènes ayant une expression induite ou réprimée par la blessure (Devoto et al., 2005).

Des modélisations moléculaires d'interaction entre COI1 et JA-Ile (figure 1-11) ont suggéré que JA-Ile peut mieux se fixer à COI1 que la coronatine ou le MeJA (Yan et al., 2009).

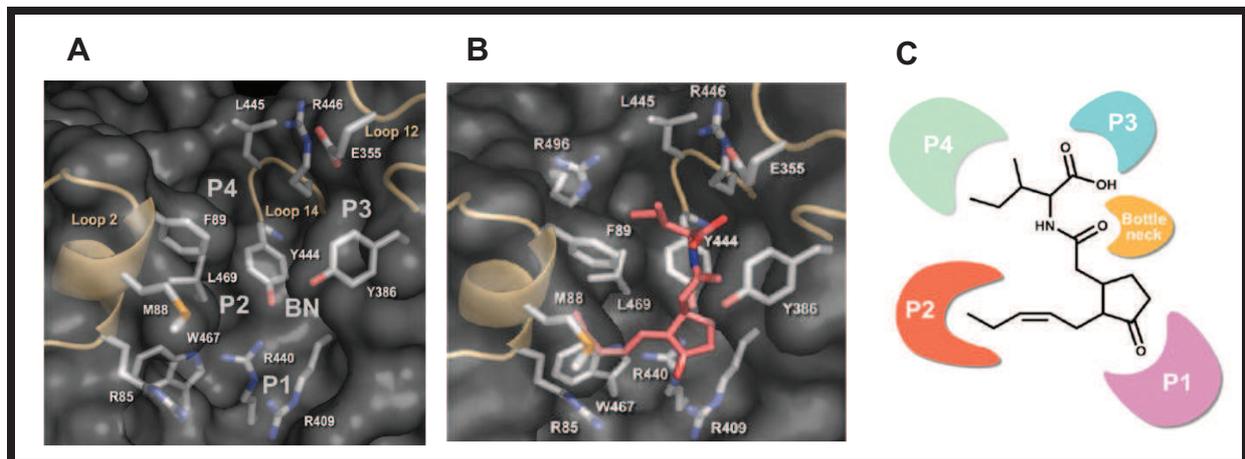


Figure 1-11 : Modèle de liaison de JA-Ile au récepteur COI1. Cavité à la surface de COI1 (A) amarrage moléculaire de JA-Ile à la surface de COI1 (B) modèle de liaison de JA-Ile à COI1(C) d'après Yan et al. (2009). La cétone du pentacycle de JA interagit avec la poche P1 en formant des liaisons hydrogènes. La chaîne carbonée latérale de JA s'imbrique dans la poche P2 par des interactions hydrophobes et van der Waals.

Mais des données de cristallisation ont montré que JA-Ile ne peut pas se fixer à COI1 ou JAZ seul, d'où l'idée d'un co-récepteur (Thines et al., 2007; Sheard et al., 2010). COI1 est un élément du récepteur aux jasmonates nécessaire à la défense et la fertilité présent également chez la tomate (Li et al., 2004) et le soja (Wang et al., 2005). L'homologue de cette protéine chez la tomate est requis pour le contrôle maternel de la production de graines et le développement de trichomes glandulaires sur les sépales, les fruits et les feuilles (Li et al., 2004). Chez *Arabidopsis*, COI1 est une protéine de 67 kDa portant 16 répétitions riches en leucine (LRR) et un motif F-box en position N-terminale (Xie et al., 1998). Ce composant de perception n'est pas une protéine membranaire, contrairement aux récepteurs hormonaux des BR, des cytokinines et de l'éthylène (Shan et al., 2012). Il a été démontré chez *Arabidopsis* que COI1 fait partie d'un complexe SCF (SKP1, Cullin, F-box), ubiquitine ligase E3 (Devoto et al., 2002; Ren et al., 2005). Ce type de complexe recrute sélectivement des protéines pour les ubiquitiner. Les complexes SCF^{COI1} ubiquitine ligase sont requis pour les réponses aux jasmonates chez *Arabidopsis thaliana* (Xu et al., 2002). COI1 montre des similarités avec la protéine F-box récepteur à l'auxine TIR1, incluse dans le complexe SCF^{TIR1} qui, en présence d'auxine, recrute des répresseurs à l'auxine et les ubiquitine pour induire leur dégradation au niveau du protéasome. La découverte de répresseurs interagissant avec COI1 en présence de JA-Ile, selon un mécanisme similaire à la perception d'auxine, a ensuite permis de conclure que JA-Ile est une forme hormonale active des jasmonates.

1.3.3.2 Rôle des répresseurs JAZs

Les protéines JAZs sont des répresseurs inhibant la transcription de gènes de réponse aux jasmonates. Ces répresseurs ont été découverts simultanément par 3 groupes en 2007 (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007).

Les répresseurs JAZs (JASMONATE ZIM-domain) sont des protéines comportant un domaine ZIM conservé incluant un motif TIFY (TIFF/YXG) qui permet des homodimérisations ou hétérodimérisations entre protéines JAZ, ainsi qu'un domaine Jas conservé qui interagit avec COI1 (Chung et Howe, 2009). Le domaine Jas contient un degron dont l'hélice alpha se lie à COI1 à proximité du site de liaison de JA-Ile et cette interaction est nécessaire pour la formation du co-récepteur COI1-JAZ (figure 1-12 et Pauwels et Goossens (2011)).

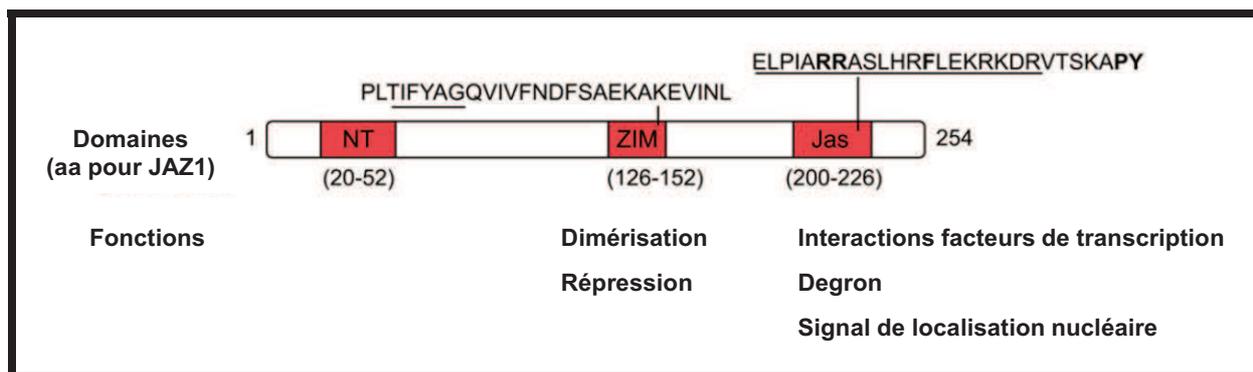


Figure 1-12 : Schéma représentant la protéine JAZ1 et les domaines conservés des protéines JAZs. D'après Pauwels et Goossens (2011). Les fonctions des domaines conservés ZIM et Jas sont indiquées. Le motif TIFY du domaine ZIM et le degron JAZ du domaine Jas sont soulignés dans la séquence d'acides aminés.

Les répresseurs JAZs sont des cibles directes du complexe SCF^{COI1} et un traitement avec du JA entraîne leur ubiquitination puis leur dégradation via le protéasome 26S, ce qui permet de lever la répression sur les gènes de réponse aux jasmonates (figure 1-14). Par exemple, JAZ3 inhibe le facteur de transcription MYC2 (Chini et al., 2007). L'expression de gènes *JAZs* est elle-même sous contrôle de la signalisation JA. Ainsi, lors de la perception de l'hormone, les JAZs sont dégradées mais également à nouveau synthétisées, ce qui permet d'assurer un rétro-contrôle négatif pour atténuer le signal hormonal. Les JAZs contribuent ainsi au caractère transitoire des réponses jasmonates (Browse, 2009). Plus récemment, il a été découvert que les JAZs régulent des interactions entre la voie JA et d'autres voies hormonales telles que l'éthylène, l'auxine, GA et SA (Kazan et Manners, 2012). Ceci constitue l'une des bases des cross-talks positifs ou négatifs entre hormones.

1.3.3.3 Les facteurs de transcription ciblés par les répresseurs JAZs

Les répresseurs JAZs interagissent avec des facteurs de transcription. La dégradation des JAZs permet la dé-répression des facteurs de transcription qui peuvent alors agir sur la transcription des gènes cibles. Ces répresseurs peuvent interagir avec de nombreux facteurs de transcription différents, contrôlant ainsi l'expression de gènes impliqués dans divers processus dépendants de la voie JA, tels que la croissance racinaire, la défense contre les herbivores et les pathogènes nécrotrophes, la formation de trichomes, la synthèse d'anthocyanes et la fertilité mâle (figure 1-13) (Pauwels et Goossens, 2011). Ces interactions multiples permettent une grande plasticité de signalisation et contribuent à la spécificité des réponses au JA dans diverses situations.

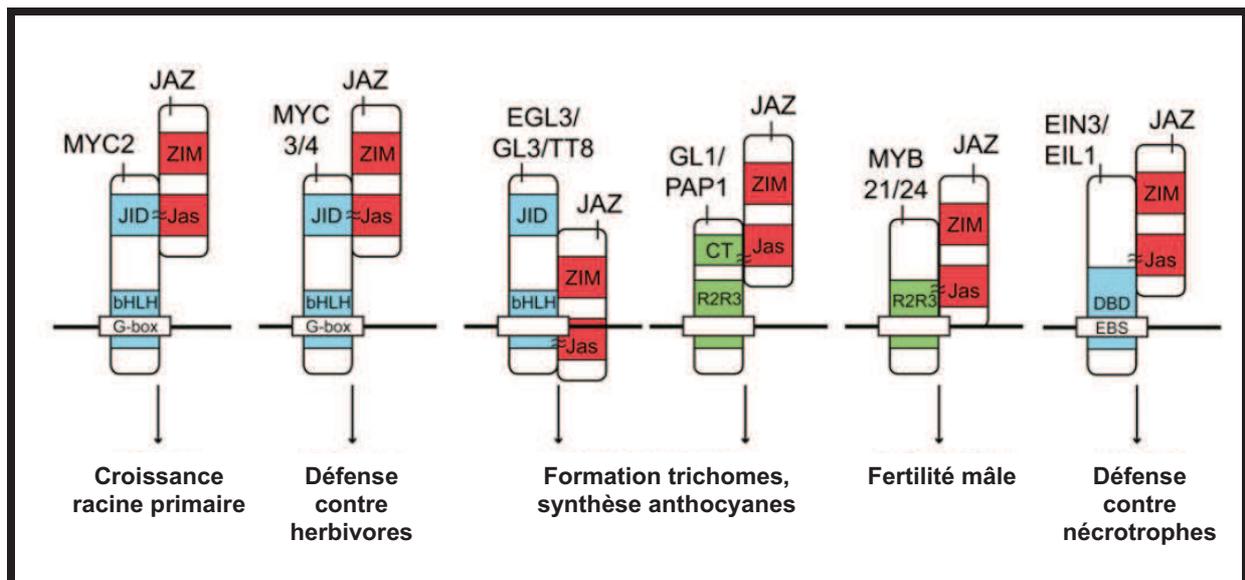


Figure 1-13 : Inhibition des réponses aux jasmonates par interaction des protéines JAZs avec de nombreux facteurs de transcription, d'après Pauwels et Goossens (2011). Modèle décrivant les différentes combinaisons JAZ-facteur de transcription et leurs domaines protéiques impliqués. Les signes \approx relient les domaines ou régions approximatives impliqués dans les interactions physiques.

Les facteurs de transcription à motifs basiques hélice-boucle-hélice (bHLH) tels que MYC2 (aussi nommé JIN1, JASMONATE INSENSITIVE 1), MYC3 et MYC4 sont réprimés par les JAZs (Fernandez-Calvo et al., 2011; Niu et al., 2011). MYC2 est un facteur de transcription qui permet les réponses aux JAs (notamment l'inhibition de la croissance racinaire et les réponses à la blessure). Le pattern d'expression des gènes contrôlés par MYC3 est différent de celui de MYC2. MYC3 interagit seulement avec 8 protéines JAZs alors que MYC2 interagit avec les 12 JAZs (Browse, 2009; Cheng et al., 2011). Il a été établi que MYC4 interagit avec JAZ1, JAZ3 et JAZ9 (Niu et al., 2011). Les mutants sur-exprimant JAZ10.4, un variant épissé de JAZ10, sont mâles stériles. JAZ10.4 interagit avec MYC2 mais ne peut pas être dégradée via le complexe SCF^{COI1}, indiquant que les fonctions de cette forme dominante négative de JAZ10 doivent être d'atténuer les signaux en présence de JA-Ile (Chung et Howe, 2009).

Chez les plantes, les facteurs MYB représentent une famille de protéines qui possèdent un domaine R2R3 de liaison à l'ADN (125 gènes chez *Arabidopsis thaliana*) (Stracke et al., 2001). MYB21, MYB24 et MYB57 contrôlent des réponses au JA, notamment le développement floral (Mandaokar et al., 2006; Song et al., 2011). L'accumulation d'anthocyanes et l'initiation de la formation des trichomes est COI1-dépendante, induite par les facteurs de transcriptions R2R3 MYB75 et Glabra1 (GL1) et les facteurs de transcription

bHLH Transparent Testa8 (TT8), Glabra3 (GL3) et Enhancer of Glabra3 (EGL3), qui interagissent avec les répresseurs JAZs (Qi et al., 2011). Il est supposé que la dégradation des JAZs induite par JA-Ile abolit les interactions entre les protéines JAZs et les facteurs de transcription, permettant aux complexes de transcription WD-repeat/bHLH/MYB comportant ces facteurs d'activer les cascades transcriptionnelles aboutissant à l'accumulation d'anthocyanes et l'initiation de la formation des trichomes.

Récemment, des répresseurs transcriptionnels se liant à l'ADN (de type bHLH) et régulant négativement la signalisation JA ont été décrits. Le facteur JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1) agit comme un répresseur transcriptionnel et se lie aux séquences de gènes cibles auxquelles se lie également MYC2. Ces deux facteurs sont donc en compétition pour la régulation de l'expression de ces gènes (Nakata et al., 2013). Plus récemment, il a été décrit que JAM1 interagit avec les répresseurs JAZs (Sasaki-Sekimoto et al., 2014). JAM2 et JAM3 sont également des répresseurs transcriptionnels et leur expression réduit la fertilité mâle (Nakata et al., 2013; Nakata et Ohme-Takagi, 2013).

1.3.3.4 La signalisation jasmonate est basée sur un système de dé-répression

En résumé, JA est activé par conjugaison avec l'isoleucine par l'enzyme JAR1. Le conjugué JA-Ile promeut alors l'assemblage d'un co-récepteur composé de la protéine F-box COI1 et des protéines JAZs. Les JAZs sont des répresseurs de la transcription qui inhibent la transcription de gènes de réponse aux jasmonates en absence ou en présence de faibles niveaux de JA-Ile. L'assemblage du co-récepteur COI1-JAZ permet l'ubiquitination des JAZ par le complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{COI1}, ce qui provoque leur dégradation protéolytique par le protéasome 26S. Ainsi, l'élimination des répresseurs JAZs correspond à une dé-répression des réponses dépendantes de JA-Ile (figure 1-14).

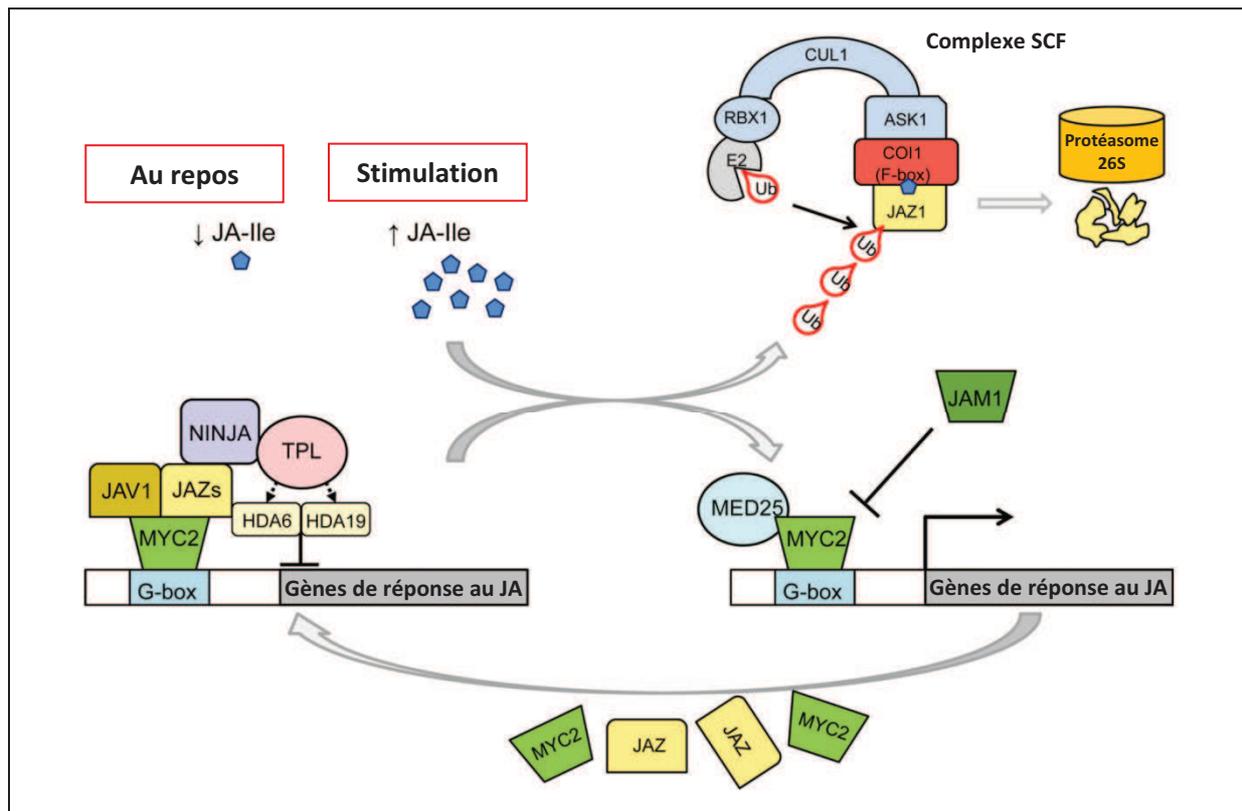


Figure 1-14 : La perception de JA/JA-Ile par le complexe co-récepteur SCF^{COI1}-JAZ libère l'expression de gènes de réponse aux jasmonates (Wasternack et Hause, 2013; Wasternack, 2014). En présence de faibles niveaux de JA-Ile, MYC2, qui se lie à une boîte G des gènes de réponse à JA/JA-Ile, est réprimé par des régulateurs négatifs tels que les JAZs interagissant avec les co-répresseurs NINJA et TOPLESS (TPL), qui agissent via les HISTONEDEACETYLASE6 (HDA6) et HDA19. En complément des protéines JAZs, JASMONATE ASSOCIATED VQ MOTIF GENE 1 (JAV1) agit comme un répresseur (partie gauche du schéma). Les protéines JAMs (JASMONATE ASSOCIATED MYC2-LIKE1, JAM2, JAM3) (partie droite du schéma) sont des antagonistes de MYC2 en se liant également à la boîte G. En présence de forts niveaux d'hormone, les JAZs et JAV1 sont ubiquitinés pour être dégradés par le protéasome 26S. Ainsi, MYC2 peut activer la transcription des gènes de réponse au JA/JA-Ile, incluant des gènes de réponse précoces tels que les JAZs et MYC2. MED25, la sous-unité 25 du complexe Mediator, permet la transcription. E2, Rbx, Cullin, ASK1 et la protéine F-box COI1 sont des composants du complexe SCF. Ub, ubiquitine.

Des modules de signalisation similaires interviennent également dans la régulation de l'expression de gènes induits par l'auxine, GA et ABA (figure 1-15). Ils comportent des facteurs de transcription, des répresseurs transcriptionnels et un complexe co-récepteur connectant le répresseur et le complexe SCF par liaison de l'hormone (Song et al., 2013).

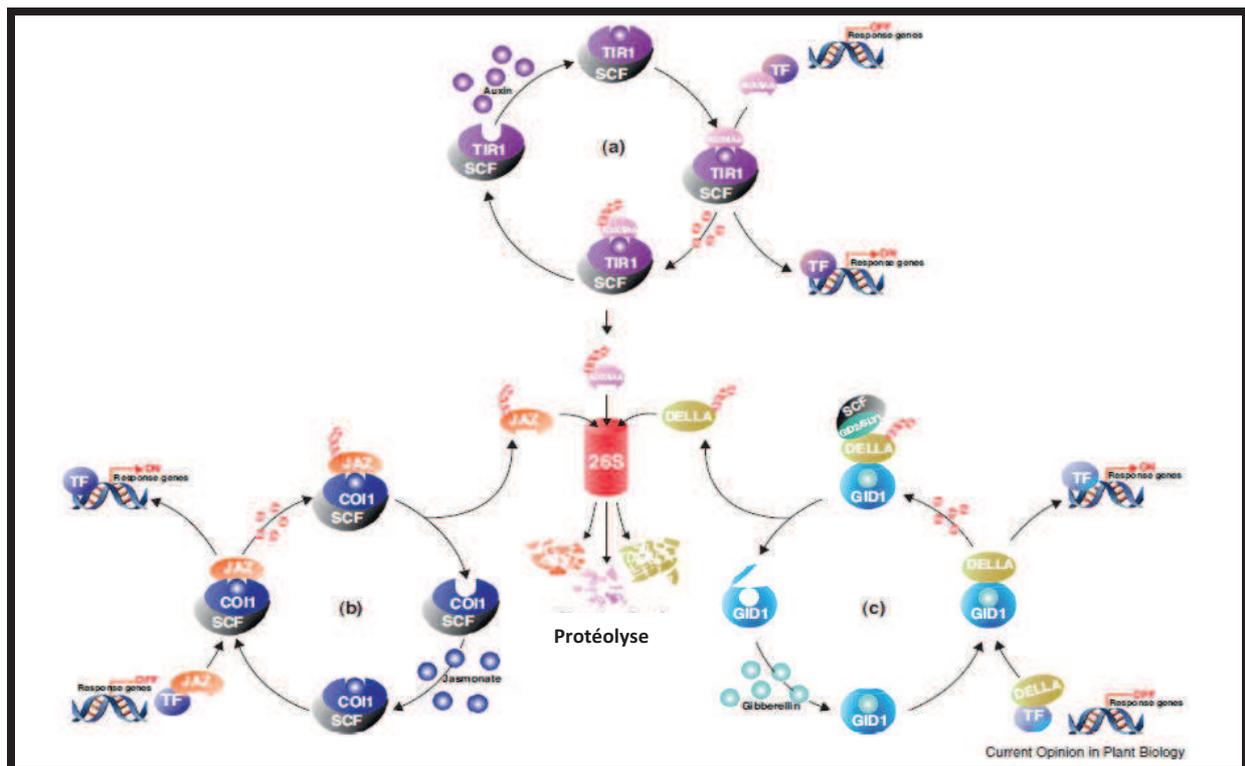


Figure 1-15 : Schéma des voies de signalisation hormonale de l'auxine, des jasmonates et des gibbérellines. D'après Shan et al. (2012). Le protéasome 26S est représenté par le cylindre « 26S ». Les petits disques rouges représentent l'ubiquitine. (a) Voie de signalisation de l'auxine. TF : facteur de transcription incluant les ARFs. (b) Voie de signalisation JA. TF : facteurs de transcription incluant MYC2/3/4, MYB21/24/75, TT8, GL1, GL3, EGL3. (c) Voie de signalisation des gibbérellines. GID1 : GID1a/b/c chez *Arabidopsis thaliana* ; DELLA : protéines DELLA (GAI, RGA, RGL1, RGL2 RGL3 chez *Arabidopsis thaliana*) ; TF : facteurs de transcription tels que PIFs.

1.4 Rôles de la voie JA dans les interactions plantes-insectes et les interactions plantes-microbes

La cascade de signalisation JA, incluant l'hormone JA-Ile, est considérée comme une voie de régulation majeure de la défense des plantes contre les herbivores et certains pathogènes microbiens.

1.4.1 La voie de signalisation JA garante de réponses de défense contre les insectes

La voie JA joue un rôle clé dans la défense des plantes contre les insectes. La blessure mécanique et l'attaque par des herbivores stimulent fortement la synthèse des JAs qui déclenchent les réponses de défense chez la plante (Blechert et al., 1995; Koo et al., 2009). Le

système immunitaire assuré par la voie JA affecte les performances d'insectes phytophages, tels que les chenilles (*Lepidoptera*), les thrips (*Thysanoptera*), les cicadelles (*Homoptera*), les tétranyques (*Acari*) et les mouches de terreau (*Diptera*) (Browse et Howe, 2008). Le rôle des JAs dans la défense des plantes a notamment été mis en évidence par l'étude des mutants de biosynthèse ou de signalisation de JAs. Par exemple chez la tomate, un mutant déficient dans la synthèse d'OPDA est déficient pour l'activation des gènes de défense inductibles par la blessure, ce qui compromet la résistance au lépidoptère prédateur *Manduca sexta* (Howe et al., 1996). Le mutant de biosynthèse de JAs *fad3-2 fad7-2 fad8* est extrêmement sensible aux mouches de terreau (*Bradysia impatiens*) (McConn et al., 1997). Chez la tomate, le mutant de perception aux jasmonates *jail* (JAI1 étant l'homologue de COI1 d'*Arabidopsis thaliana*) est plus sensible au tétranyque à deux points. Les JAs assurent la protection des plantes contre les herbivores en régulant des réponses de défense (Koo et Howe, 2009), telles que la synthèse de métabolites secondaires toxiques (Pauwels et al., 2009) ou la production de barrières morphologiques comme les trichomes (Yoshida et al., 2009). Le MeJA est un fort éliciteur de l'expression d'inhibiteurs de protéinases qui interfèrent avec la digestion des insectes (Farmer et Ryan, 1990). Le rôle de la voie JA dans la défense contre les herbivores n'est pas limitée aux insectes, puisque des cloportes (crustacés terrestres), normalement détritivores, deviennent herbivores sur le mutant d'*Arabidopsis thaliana aos* (Farmer et Dubugnon, 2009). De même, le mutant *coi1* est consommé plus intensément par des tortues (Mafla et al., 2012)

1.4.2 La voie de signalisation JA pour la résistance aux pathogènes nécrotrophes

La voie JA joue également un rôle essentiel pour la défense des plantes contre les pathogènes nécrotrophes (Browse, 2009). COI1 est essentiel pour la résistance aux champignons tels que *Botrytis cinerea* et *Alternaria brassicicola* (Thomma et al., 1998). Les systèmes de défense contrôlés par la voie JA incluent la biosynthèse d'inhibiteurs de protéases et de métabolites secondaires, notamment des anthocyanes et des flavonoïdes antimicrobiens (Mengiste, 2012). La voie JA stimule également la synthèse de peptides antimicrobiens, comme par exemple la défensine PDF1.2 (Thomma et al., 1998) ou d'autres protéines PR (Pathogenesis Related).

La voie JA est aussi connue pour affecter positivement la formation des mycorhizes à arbuscules (Hause et al., 2007)

1.4.3 Les branches de signalisation antagonistes MYCs et ERF1/ORA59

La voie JA promeut les réponses de défense contre les insectes herbivores en un cross-talk positif avec l'ABA, alors que les réponses contre les pathogènes nécrotrophes sont induites en un cross-talk positif avec la voie éthylène. Des antagonismes existent entre ces 2 branches (figure 1-16), de façon à prioriser la défense vers l'un ou l'autre programme transcriptionnel. Les facteurs de transcription MYCs déclenchent les réponses de défense contre les insectes herbivores et les facteurs de transcription ERF1 et ORA59 promeuvent les réponses contre les pathogènes nécrotrophes.

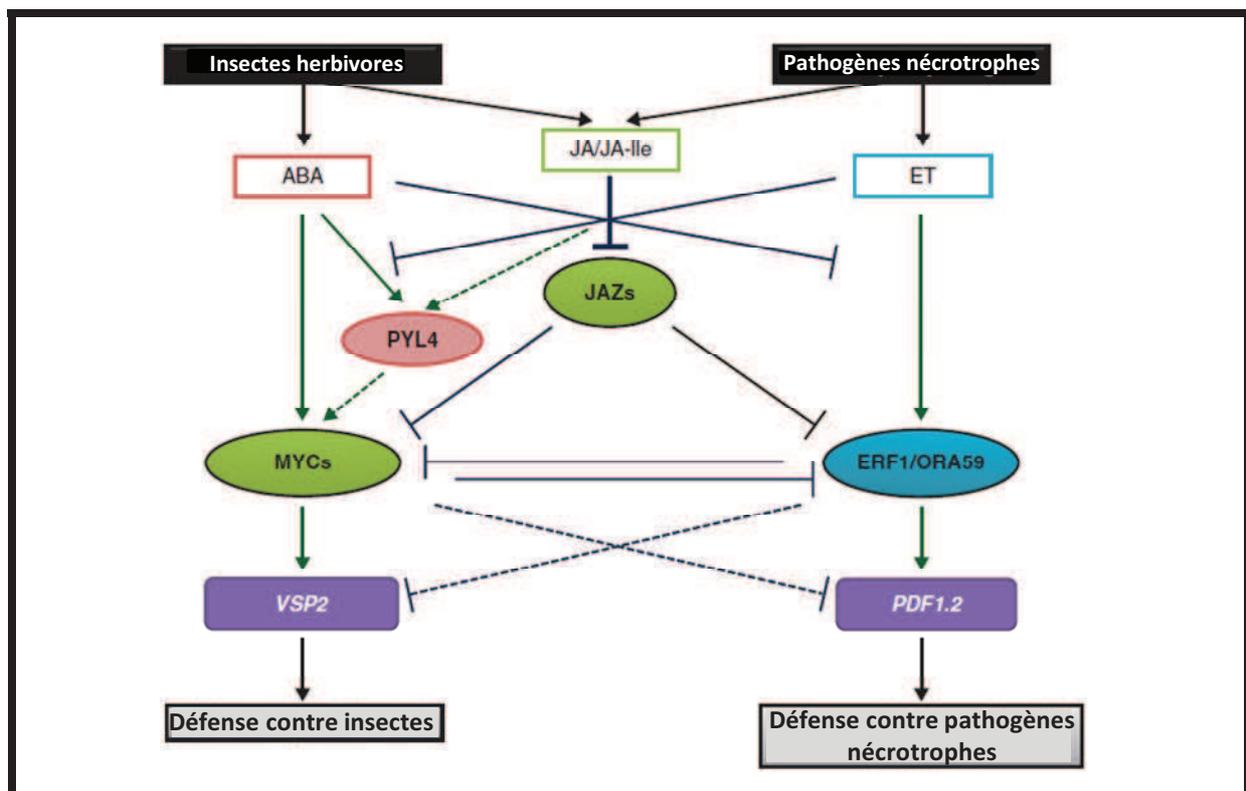


Figure 1-16 : Les cross-talks entre JA, éthylène (ET) et acide abscissique (ABA) déclenchés en réponse aux insectes herbivores et aux pathogènes nécrotrophes. D'après Wasternack et Hause (2013). L'attaque par des insectes herbivores induit les voies de signalisation dépendantes de JA et d'ABA, alors que les infections par les pathogènes nécrotrophes induisent les voies de signalisation dépendantes de JA et d'éthylène. Les deux branches sont régulées de manière antagoniste. Flèches pleines, interactions connues ; traits en pointillés, interactions hypothétiques ; flèches vertes, effets positifs. Les composés sont encadrés, les régulateurs transcriptionnels sont encerclés, les gènes régulés sont en violet. ERF1, ethylene response factor 1 ; ORA59, octadecanoid-responsive protéine 59 d'Arabidopsis à domaine AP2/ERF ; PYL4, PYR1-like protein 4 (récepteur à l'ABA).

1.5 Biosynthèse et signalisation jasmonate au cours du développement floral

1.5.1 Développement floral et autofécondation chez *Arabidopsis thaliana*

Le développement floral d'*Arabidopsis thaliana* s'effectue en plusieurs étapes détaillées dans la figure 1-17.

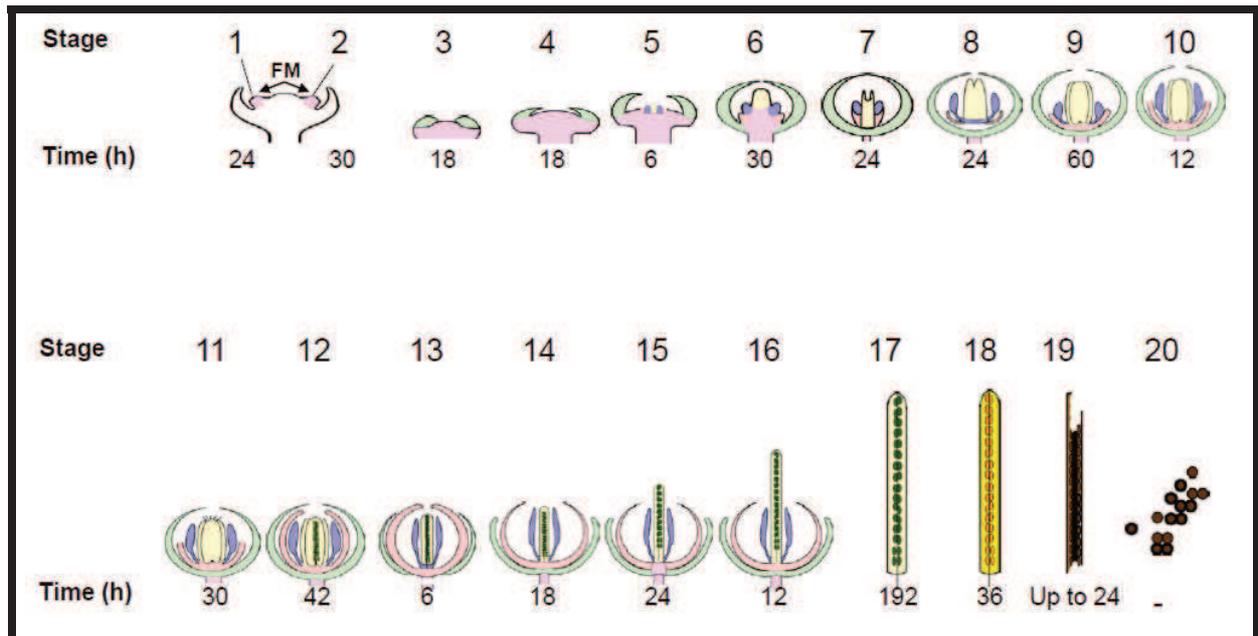


Figure 1-17 : Représentation des 20 stades de développement floral chez *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis book, Elena R. Alvarez-Buylla, URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0127>). Représentation schématique des stades de développement des fleurs d'*Arabidopsis*. Brièvement, le primordium floral est formé aux stades 1 et 2. Au stade 3, les primordia des sépales sont déjà visibles et continuent à grandir jusqu'à ce qu'ils enveloppent le méristème floral (stades 4 à 6). En même temps, au stade 5 les primordia des pétales et des étamines commencent à être visibles et le gynécée commence à se former (stade 6). Le développement des organes continue et au stade 9, des papilles stigmatiques naissent au sommet du gynécée. Au stade 12, les pétales ont une longueur similaire à celle des étamines. L'anthèse se passe au stade 13, la fécondation a lieu et les fleurs s'ouvrent au stade 14. Les siliques atteignent leur taille maximum et sont vertes au stade 17, puis elles perdent de l'eau et jaunissent (stade 18) jusqu'à ce que les valves se séparent des siliques sèches (stade 19) et que les graines tombent (stade 20). Méristème floral (FM) en rose ; sépales en vert ; étamines en rose pâle ; gynoécium en jaune ; ovules en vert foncé, graines en orange et brun. La durée de chaque stade en heure (h) est indiquée sous les figures (à partir de Smyth et al. (1990)).

La floraison, la pollinisation et la formation de graines sont des étapes essentielles pour la survie d'une espèce. Ainsi, dans leur environnement naturel, les plantes doivent contrôler le moment de formation de la fleur, son ouverture, la libération de grains de pollen matures et la production de composés volatils ou de nectar qui vont attirer des pollinisateurs.

La formation d'un embryon résulte de la fécondation entre un gamète mâle (contenu dans le grain de pollen) et un gamète femelle (protégé dans le pistil). Les espèces dioïques dépendent pleinement des pollinisateurs car elles comportent des individus portant uniquement des fleurs mâles produisant les grains de pollen et des individus portant uniquement des fleurs femelles. Des espèces monoïques produisent des fleurs hermaphrodites. Dans le cas d'auto-incompatibilité, le pollen d'une fleur ne peut pas générer la fécondation d'un ovule d'une même fleur. Au contraire, certaines espèces autorisent l'autofécondation et n'ont pas besoin de pollinisateur car le pollen produit par une fleur peut féconder un ovule de la même fleur. *Arabidopsis thaliana* est une plante monoïque qui pratique l'autofécondation (figure 1-18).

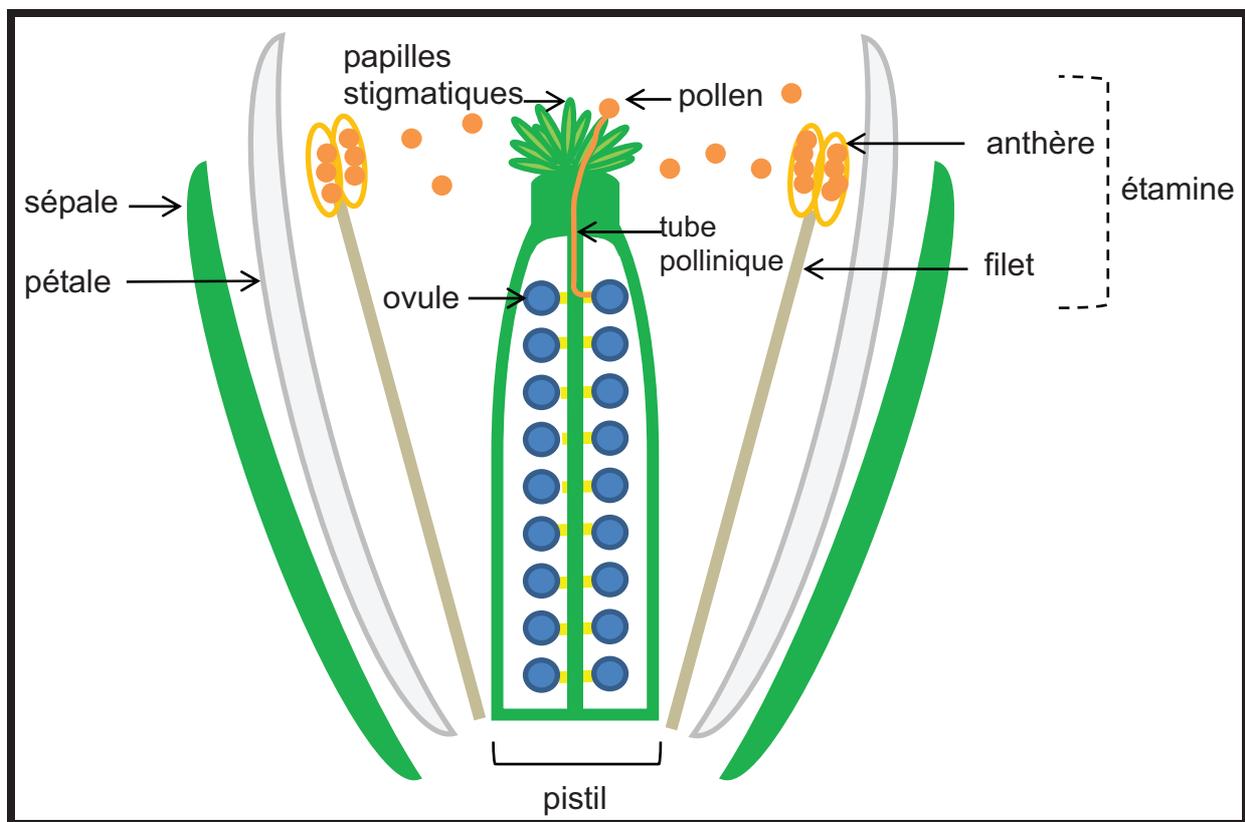


Figure 1-18 : Schéma de fleur d'*Arabidopsis thaliana* lors de l'autofécondation.

Pour assurer l'autofécondation, il est primordial de libérer des grains de pollen matures au niveau des papilles stigmatiques du pistil lorsqu'elles sont prêtes à recevoir des grains de pollen. Le pollen peut alors germer au niveau des papilles et un tube pollinique se forme pour atteindre l'ovule (figure 1-18).

1.5.2 Développement de l'anthère et des grains de pollen

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'obtention de grains de pollen matures nécessite plusieurs étapes, notamment la génération d'une cellule végétative et de deux noyaux reproductifs (l'un engendrera l'embryon et l'autre permettra la formation d'albumen nécessaire à la croissance de l'embryon) après méiose puis mitose, mais également la formation d'une paroi pollinique qui aura pour but de protéger le grain de pollen des stress environnementaux (Alvarez-Buylla et al., 2010; Quilichini et al., 2014).

Des observations d'anthères au cours des stades tardifs de développement, à partir du stade 9, ont été réalisées par Sanders et al. (1999) et sont présentées en figure 1-19. Le tapetum est constitué d'une couche de cellules assurant la maturation des grains de pollen (stades 9-11). Au stade 12, le tapetum est dégradé et le septum séparant les locules est brisé. Au stade 13, les anthères s'ouvrent au niveau du stomium, ce qui permet la libération des grains de pollen matures.

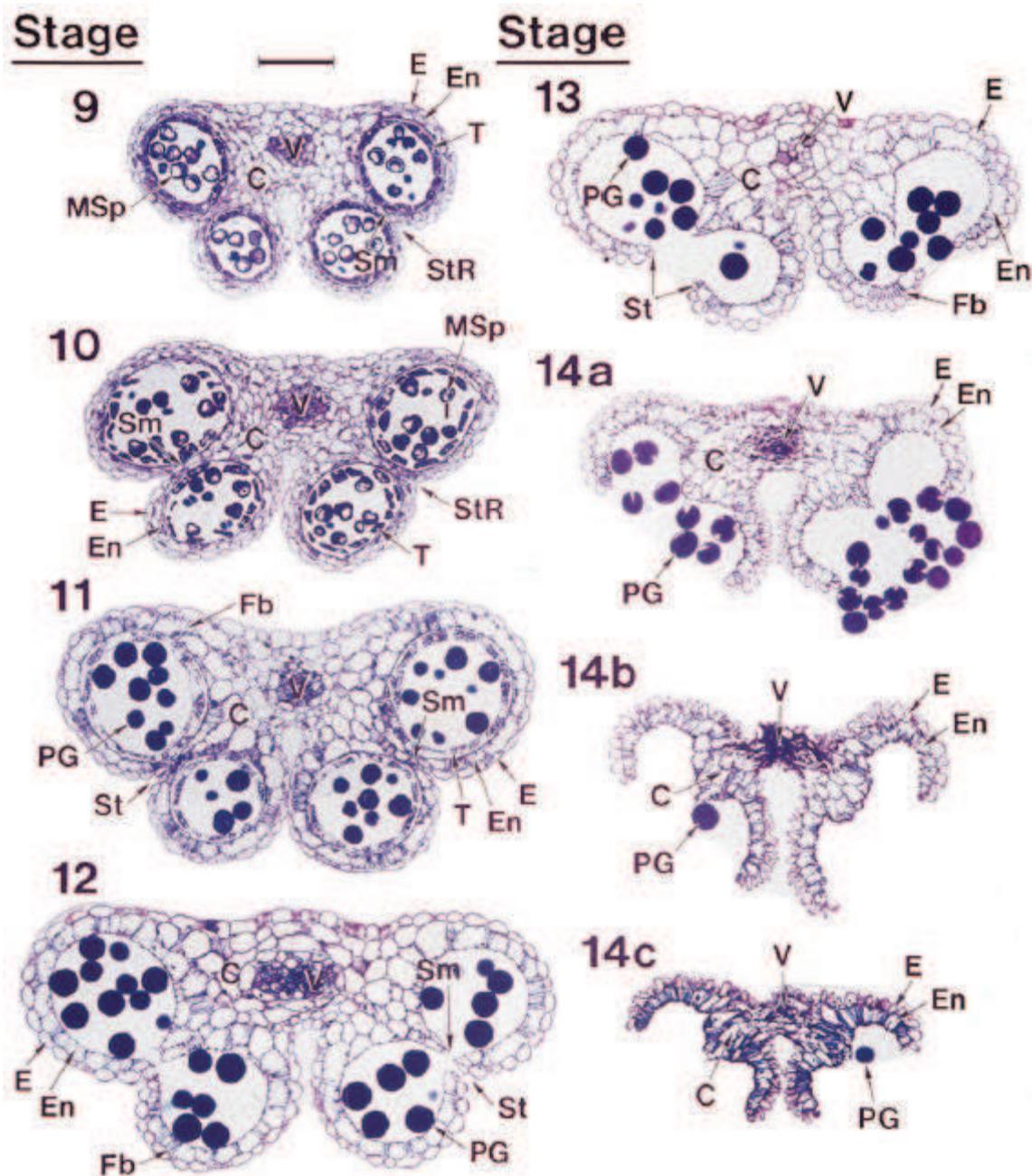


Figure 1-19 : Développement de l'anthere dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* de stade 9 à 14 (Sanders et al., 1999). Les fleurs ont été fixées et incluses dans une résine plastique et des coupes transversales de 1 μm d'épaisseur ont été effectuées. Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine et les anthers ont été observées par microscopie en champ clair. Les stades 9 à 11, 12 à 13, et 14a à 14c représentent respectivement le développement tardif de l'anthere, la déhiscence et la sénescence. C, tissu conjonctif ; E, épiderme ; En, endothécium ; Fb, bandes fibreuses ; MSp, microspores ; PG, grains de pollen ; Sm, septum ; St, stomium ; StR : région du stomium ; T, tapetum ; V, région vasculaire. Barre d'échelle = 50 μm .

La formation des grains de pollen a lieu dans les anthères des étamines. Parallèlement, le filet des étamines, structure portant l'anthère, s'allonge progressivement jusqu'à atteindre une longueur suffisante pour permettre à l'anthère de se situer à proximité des papilles stigmatiques (Smyth et al., 1990). Enfin, des mouvements d'eau contribuent au dessèchement de l'anthère, ce qui provoque sa déhiscence et permet ainsi la libération des grains de pollen matures (Nelson et al., 2012). La signalisation JA joue donc un rôle dans ces processus de développement floral tardif (figure 1-20).

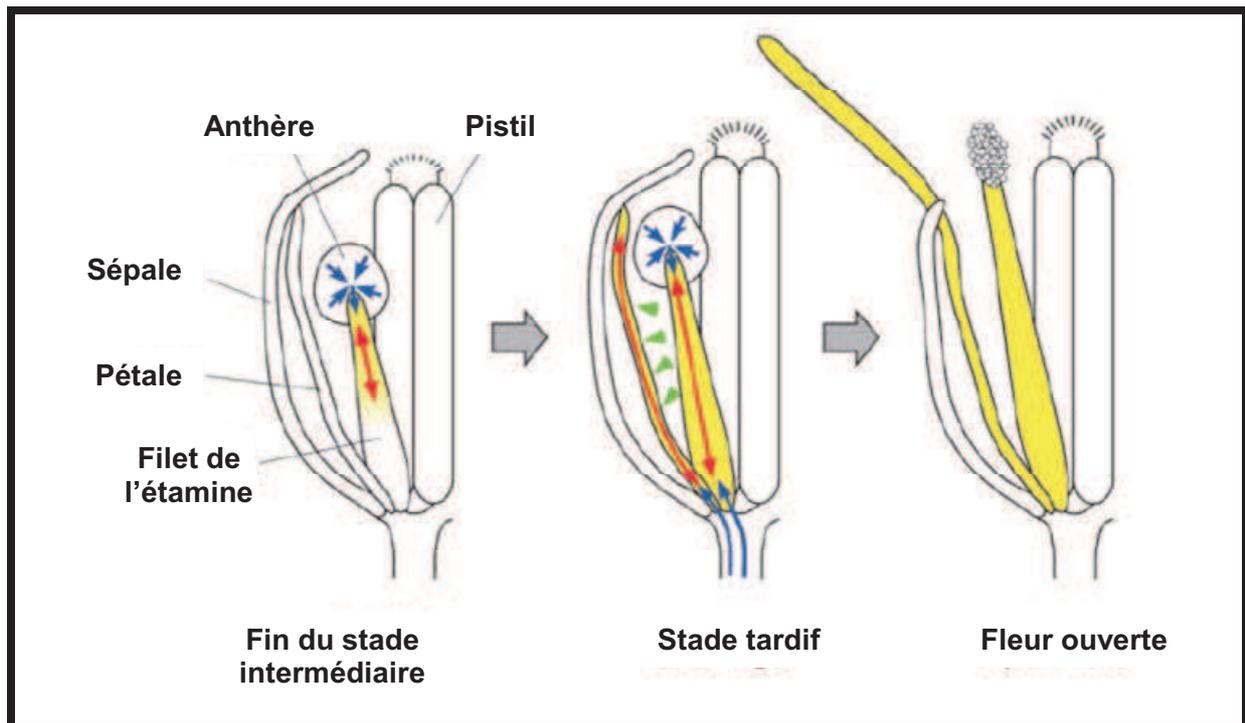


Figure 1-20 : Modèle proposé de régulation synchrone de la maturation du pollen, de la déhiscence des anthères et de l'ouverture de la fleur par JA. Transmission de JA (flèches vertes), élongation des organes (flèches rouges) et transport de l'eau (flèches bleues). D'après (Ishiguro et al., 2001).

Pour assurer la reproduction, l'étamine subit donc des processus développementaux spécifiques contrôlés par de multiples signalisations (Ge et al., 2010), permettant notamment la génération de cellules reproductrices (Regan et Moffatt, 1990) et la déhiscence de l'anthère (Sanders et al., 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, les phytohormones JA, auxine, gibbérélline, brassinostéroïde (BR) et cytokinine (CK) jouent des rôles essentiels dans la régulation du développement des étamines (Song et al., 2013). Si l'importance du JA pour la viabilité du pollen est connue depuis 1996 (McConn et Browse, 1996), la découverte du rôle des brassinostéroïdes et des cytokinines est plus récente (Ye et al., 2010; Kinoshita-Tsujimura et Kakimoto, 2011). Les hormones JA et auxine régulent principalement le développement

tardif de l'étamine après le stade floral 12, tandis que les GA sont déjà requises pour le développement de l'étamine à partir du stade floral 9 (Song et al., 2013). Les mutations qui affectent les étapes de la maturation du pollen, de l'élongation du filet ou de la déhiscence des anthères provoquent souvent une stérilité mâle (Song et al., 2013; Wasternack et al., 2013).

1.5.3 Biosynthèse et signalisation JA dans les fleurs

1.5.3.1 Enzymes impliquées dans la biosynthèse de JA dans les fleurs

Des approches génétiques ont permis de découvrir le rôle des jasmonates dans la fertilité mâle chez *Arabidopsis thaliana*. Tout d'abord la stérilité mâle a été constatée chez le triple mutant *fad3-2 fad7-2 fad8*, qui produit du pollen non viable et est affecté dans la déhiscence des anthères et l'élongation du filet (McConn et Browse, 1996). Ce mutant est déficient pour la désaturation d'acides gras conduisant à la synthèse de C16:3 et C18:3, précurseurs des oxylipines dont le JA (Miquel et Browse, 1992). L'application de JA ou de son précurseur C18:3 sur les bourgeons floraux traités au stade floral 12 permet de restaurer la fertilité. Cette complémentation chimique a mis en évidence l'importance du JA pour la fertilité mâle au cours du stade floral 12. La restauration de la fertilité par traitement au JA a ensuite été utilisée pour deux autres mutants de biosynthèse de jasmonates qui ont confirmé l'importance du JA dans la fertilité mâle. A partir de cette découverte, la stérilité de nombreux mutants affectés dans la biosynthèse de JA a été établie. Le gène *DADI* code pour une phospholipase A₁ libérant le C18:3 dans les plastes. Le mutant *dad1* est mâle stérile, démontrant l'importance de la mobilisation enzymatique du précurseur des jasmonates pour la fertilité (Ishiguro et al., 2001). Le mutant *opr3*, également mâle stérile, est affecté dans la réduction de l'OPDA, requise pour la synthèse de JA. Ce mutant a permis de déterminer que le JA et non pas l'OPDA est la molécule signal qui induit et coordonne l'élongation du filet, la déhiscence de l'anthère et la production de pollen viable (Stintzi et Browse, 2000).

L'allène oxyde synthase (AOS) et les allènes oxydes cyclases (AOC) catalysent la formation d'OPDA (Park et al., 2002). Chez *Arabidopsis thaliana*, il n'y a qu'un seul gène codant pour une AOS, il s'agit de *CYP74A*. L'utilisation du système rapporteur GUS a montré que l'AOS est exprimée dans les grains de pollen en cours de maturation et à la base des filets des étamines (Kubigsteltig et al., 1999). L'étude de l'expression des quatre AOCs existants chez *Arabidopsis thaliana* a montré qu'*AOC4* et *AOC1* sont les gènes les plus exprimés dans les bourgeons floraux et les fleurs ouvertes, l'expression d'*AOC4* étant au moins 3 fois

supérieure à celle d'*AOC1* (Stenzel et al., 2012). Dans les fleurs ouvertes, *AOC1* et *AOC4* sont exprimés dans les sépales, les pétales, les étamines et le pistil. Dans l'étamine, l'expression d'*AOC4* est située principalement dans le filet tandis que celle d'*AOC1* est également forte dans l'anthere et dans les grains de pollen. Le mutant *aos* est mâle stérile alors que les mutants *aoc* ne sont pas stériles car une redondance entre ces gènes est probable.

Les dernières étapes de synthèse de JA correspondent à des cycles de β -oxydation auxquels participent les acyl-coenzyme A oxidases (ACX), dans les peroxisomes. Chez *Arabidopsis thaliana* il existe 5 ACX, dont deux sont exprimées dans le pollen et participent à la fertilité mâle (Schmid et al., 2005; Schilmiller et al., 2007). Le rôle clé de ces enzymes pour la synthèse de JA dans les fleurs a été décrit chez le double mutant *acx1/5* qui produit une majorité de pollen non-viable (Schilmiller et al., 2007).

Les gènes de synthèse de JA sont donc exprimés dans les fleurs et leur inactivation provoque des déficiences de fertilité. Le lien entre biosynthèse de jasmonates et le développement et la maturation des étamines est également soutenu par le fait que la protéine homéotique florale AGAMOUS, responsable du développement de l'étamine, se fixe au promoteur du gène de la phospholipase à l'origine de la synthèse de JA, *DAD1*, et régule sa transcription (Ito et al., 2007).

1.5.3.2 Transduction du signal jasmonate dans les fleurs

Le rôle primordial des jasmonates pour la fertilité mâle chez *Arabidopsis thaliana* a également été mis en évidence par l'isolement de mutants de perception de JAs (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998).

Le mutant du récepteur *coil* présente une déficience de l'allongement du filet des anthères ainsi que de l'ouverture des anthères et ses grains de pollen sont immatures, ce qui conduit à une stérilité mâle (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Contrairement aux mutants de biosynthèse de JA, la fertilité de *coil* ne peut pas être restaurée par traitement exogène avec du JA. Ce mutant illustre l'importance de la signalisation jasmonate pour la fertilité mâle chez *Arabidopsis thaliana*.

D'autres éléments de la signalisation des jasmonates intervenant dans le développement floral ont pu être identifiés. L'établissement de profils transcriptionnels de bourgeons (stade 12) du mutant *opr3* traité au MeJA a permis d'identifier 1296 gènes régulés

de manière jasmonate-dépendante dans les étamines (Mandaokar et al., 2006). La plupart des gènes (72%) sont exprimés spécifiquement dans le sporophyte, les autres gènes étant spécifiquement exprimés dans le pollen. Parmi ces gènes, des facteurs de transcription majeurs régulant le développement JA-dépendant des étamines ont été identifiés, notamment MYB21, MYB24, MYB32 et MYB108 pour lesquels des études génétiques ont ensuite montré leur implication dans la maturation du pollen et des étamines (Preston et al., 2004; Mandaokar et al., 2006; Mandaokar et Browse, 2009; Song et al., 2011; Wasternack et al., 2013).

MYB21 et son homologue *MYB24* codent pour des facteurs de transcription MYB du sous-groupe 19 et sont exprimés spécifiquement dans la fleur (Stracke et al., 2001; Shin et al., 2002). Le mutant *myb24* est fertile tandis que *myb21* est mâle stérile, en raison d'une élongation réduite du filament des anthères et une déhiscence retardée. Le double mutant *myb21myb24* présente des défauts de développement floral supplémentaires, incluant l'absence de déhiscence. Le pollen étant cependant viable, la perte de déhiscence et de l'élongation du filament des anthères apparaissent donc être à la base de la stérilité. Ces résultats ont montré que MYB21 et MYB24 sont des régulateurs clés de la signalisation jasmonate au cours du développement des étamines (Mandaokar et al., 2006). L'expression de MYB21 et MYB24 est COI1-dépendante (Reeves et al., 2012). Les jasmonates sont synthétisés au cours du développement floral. L'hormone promeut l'interaction entre COI1 et les protéines répresseurs JAZs, provoquant la dégradation de celles-ci et libérant la fonction de transcription de MYB21 et MYB24, essentiels pour le développement de l'étamine (Song et al., 2013).

Les mutants *myb108* présentent une fertilité mâle réduite, associée à un retard de déhiscence des anthères et une réduction de la viabilité du pollen. Il a été décrit que MYB108 et MYB24 ont des fonctions partiellement redondantes et agissent en aval de MYB21 dans la cascade transcriptionnelle qui gouverne la maturation des étamines et du pollen en réponse au JA (Mandaokar et Browse, 2009). MYB21 et MYB24 sont également requis pour la croissance des pétales et du gynécée et MYB21 promeut la production de sesquiterpènes volatils (Reeves et al., 2012).

La synthèse de JA dans les fleurs induit également l'expression des gènes de défense dans cet organe. Chez *Arabidopsis thaliana*, les myrosinases TGG1 et TGG2, des enzymes catalysant la libération de composés de défense volatils par hydrolyse de glucosinolates, sont

exprimées dans les fleurs de manière COI1-dépendante (Capella et al., 2001). Chez la tomate, le gène de Threonine Deaminase, qui catabolise la thréonine dans l'intestin des lépidoptères herbivores et le gène de Proteinase inhibitor 2, qui inhibe la digestion de protéines dans l'intestin des herbivores, sont fortement exprimés dans les fleurs (Samach et al., 1991; Ryan, 2000; Gonzales-Vigil et al., 2011). Cette régulation pourrait permettre d'augmenter les défenses contre les stress biotiques dans l'organe floral enrichi en sucres qui est attractif pour les herbivores (Wasternack et al., 2013).

1.5.4 Interactions entre les voies hormonales auxine et JA

Des études génétiques ont montré que la perturbation de la biosynthèse ou du transport de l'auxine affecte l'initiation de la formation de l'étamine et le développement tardif de l'étamine (Cheng et al., 2006). L'utilisation de gènes rapporteurs (GUS et GFP) sous contrôle du promoteur inductible à l'auxine DR5 a mis en évidence la présence d'auxine dans les anthères aux stades 10 et 11, synthétisée probablement par la flavine monooxygénase YUC6 (Cheng et al., 2006; Cecchetti et al., 2008).

Des mutants de signalisation de l'auxine ont mis en évidence l'importance de cette hormone dans le développement floral. Le mutant d'*Arabidopsis thaliana msg2* est un mutant gain de fonction pour la protéine répresseur IAA19 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 19) et est mâle stérile en raison d'une élongation réduite du filet des anthères (Tatematsu et al., 2004). Les mutants des facteurs de transcription *arf6* et *arf8* (*auxin response factor*), déficients pour la signalisation de l'auxine, sont mâles stériles et présentent un phénotype similaire à *coi1* (filament plus court, déhiscence de l'anthère défectueuse, pollen non viable). Il a été montré qu'ARF6 et ARF8 induisent la synthèse de JA dans les bourgeons floraux en contrôlant l'expression des gènes *DAD1*, *LOX2*, *AOS* et *OPR3* (Nagpal et al., 2005; Tabata et al., 2010; Reeves et al., 2012). Il y a donc un cross-talk positif liant les voies hormonales auxine et JA. Il est probable que l'auxine synthétisée au cours du développement floral permette la dégradation des répresseurs et active les facteurs de transcription ARF6 et ARF8, qui ensuite régulent la synthèse de JA pour assurer le développement de l'étamine (Song et al., 2013). ARF6 et ARF8 sont eux-mêmes contrôlés au niveau transcriptionnel par le micro-ARN miR167 (Wu et al., 2006).

1.5.5 Interactions entre les voies hormonales GA et JA

Des mutants de biosynthèse de gibbérellines mâles stériles ont mis en évidence le rôle essentiel de GA dans l'élongation du filet et dans le développement de l'anthere aux stades 10, 11 et 12 (Sun et Kamiya, 1994; Cheng et al., 2004; Hu et al., 2008; Rieu et al., 2008).

L'implication de la signalisation GA dans le développement floral a également été démontrée. En effet, le triple mutant des récepteurs au GA *gid1a gid1b gid1c* présente des défauts d'élongation du filet et un arrêt du développement de l'anthere au stade 9 (Griffiths et al., 2006). Des études ultérieures ont montré que les répresseurs DELLA de la voie GA agissent par la régulation de miR159 et les facteurs de transcription MYB33 et MYB65 pour contrôler le développement précoce de l'anthere au stade 9 (Achard et al., 2004; Millar et Gubler, 2005; Allen et al., 2007). Par ailleurs, la dégradation des DELLAs au stade 12 permet de lever l'inhibition de la synthèse de JA. Le JA peut alors être synthétisé et les facteurs de transcription MYB21, MYB24 et MYB27 sont activés pour assurer le développement tardif de l'étamine (Cheng et al., 2009).

La fertilité mâle est donc régulée par de nombreux acteurs, impliquant notamment les signalisations auxine, GA et JA (figure 1-21).

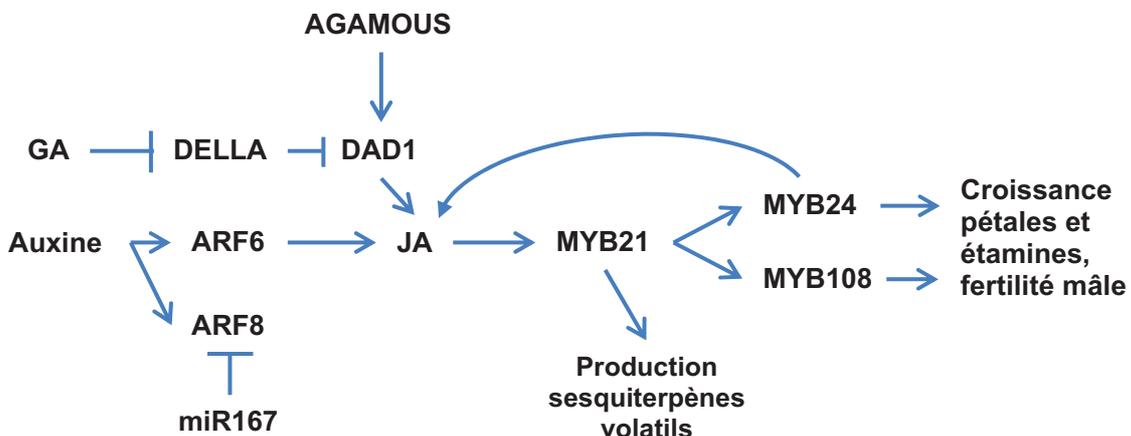


Figure 1-21 : Schéma de régulation de la fertilité mâle par les voies hormonales auxine, gibbérelline (GA) et jasmonate (JA). L'auxine active les facteurs de transcription ARF6 et ARF8 (inhibés par miR167) qui induisent la synthèse de JA. Celle-ci est également déclenchée par la transcription de la phospholipase DAD1, qui est sous contrôle du facteur homéotique AGAMOUS. La synthèse de JA est aussi stimulée par GA, qui permet de lever l'inhibition exercée par les répresseurs DELLAs. JA permet ensuite l'activation du facteur de transcription MYB21 qui agit en amont des facteurs de transcription MYB24 et MYB108 régulant la fertilité mâle. MYB24 exerce un rétrocontrôle positif sur la synthèse de JA.

1.6 Mécanismes d'inactivation hormonale

Les hormones sont des molécules clés induisant des réponses spécifiques dans des tissus précis à un moment déterminé. La défense étant coûteuse en énergie, il est en effet nécessaire de contrôler la production des composés de défense (Denance et al., 2013). Pour réguler les réponses, la plante doit donc contrôler finement les niveaux d'hormone. Ceux-ci résultent d'un équilibre entre biosynthèse et inactivation ou catabolisme (figure 1-22).

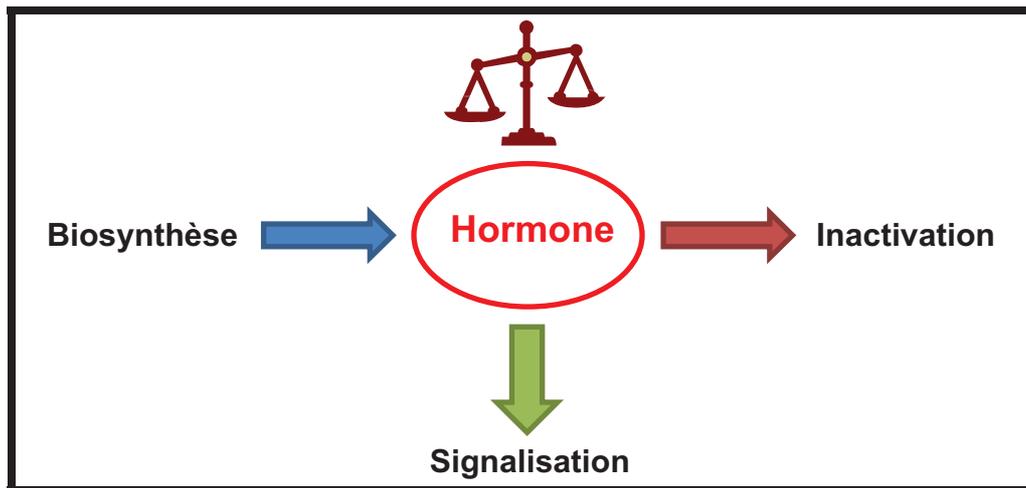


Figure 1-22 : Les quantités d'hormone bioactive stimulant la signalisation hormonale dépendent d'un équilibre dynamique entre sa biosynthèse et son inactivation.

Comme nous l'avons vu, la voie de biosynthèse de JA-Ile est parfaitement élucidée (figure 1-8). Cependant, les mécanismes d'inactivation contrôlant les niveaux d'hormone active demandaient à être caractérisés lorsque j'ai démarré mes travaux de recherche.

L'inactivation d'une hormone peut être temporaire et réversible, correspondant à son stockage, ou bien impliquer un catabolisme irréversible. Les hormones sont sujettes à de nombreuses modifications, notamment par oxydation, méthylation, estérification, glucosylation ou conjugaison avec un acide aminé (Erb et Glauser, 2010).

Par exemple, l'inactivation d'une hormone peut être effectuée par glucosylation. Des formes glucosylées de nombreuses hormones végétales ou de leurs dérivés sont connues (Piotrowska et Bajguz, 2011). Chez *Zea mays*, le gène *iaglu* code pour une glucosyltransférase agissant sur l'IAA (indole-3-acetic acid) (Szerszen et al., 1994). La réaction inverse est réalisée par une hydrolase (6-O(4-O)-IAAGlc hydrolase), permettant de libérer l'auxine et donc de l'activer (Jakubowska et Kowalczyk, 2005).

1.6.1 Catabolisme oxydatif d'hormones

1.6.1.1 Catabolisme oxydatif d'hormones par des dioxygénases

Chez le riz, l'enzyme DAO est une 2-oxoglutarate-dépendent-Fe (II) dioxygénase qui assure le catabolisme de l'auxine en oxydant IAA pour produire la forme inactive acide 2-oxo-indole-3-acétique (OxIAA) (Zhao et al., 2013). Chez *Arabidopsis thaliana*, la SA-3 hydroxylase (S3H) catalyse la conversion d'acide salicylique en acide 2,3-dihydroxybenzoïque (2,3-DHBA). Ce catabolisme de l'acide salicylique a lieu dans les feuilles et inhibe ainsi la sénescence foliaire en limitant les niveaux de SA (Zhang et al., 2013). La biosynthèse et le catabolisme des gibbérellines sont contrôlés par des 2-oxoglutarate-dépendent dioxygénases (GA2oxydase, GA3oxydase) (Hedden et Thomas, 2012).

1.6.1.2 Catabolisme oxydatif d'hormones par des P450s

Les P450s sont impliqués dans la biosynthèse ou l'inactivation de nombreuses hormones, participant ainsi à l'homéostasie de ces composés signaux (Mizutani et Ohta, 2010).

Des P450s interviennent dans le métabolisme des gibbérellines. CYP701A et CYP88A participent à la biosynthèse de l'hormone active GA₁₂ alors que CYP714D1 inactive l'hormone active GA₄ par époxydation (Zhu et al., 2006).

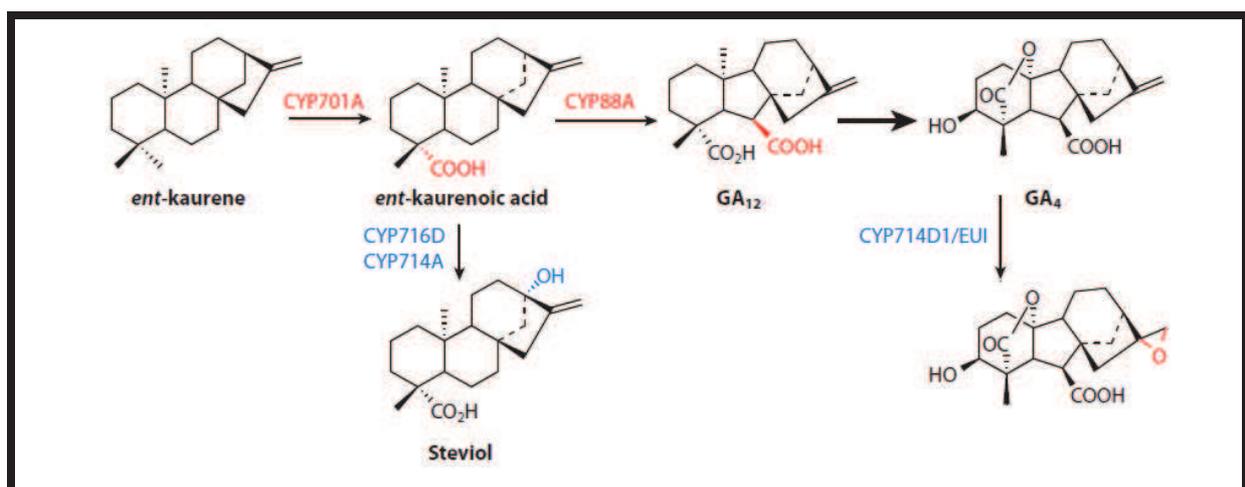


Figure 1-23 : P450s impliqués le métabolisme des gibbérellines. Les P450s impliqués dans la biosynthèse (en rouge) et le catabolisme (en bleu) sont représentés. D'après Mizutani et Ohta (2010).

L'ABA induit la dormance des graines. Il a été montré que CYP707A2 catalyse l'hydroxylation d'ABA en position 8 (figure 1-24), ce qui provoque l'inactivation de cette hormone et promeut la levée de la dormance (Millar et al., 2006).

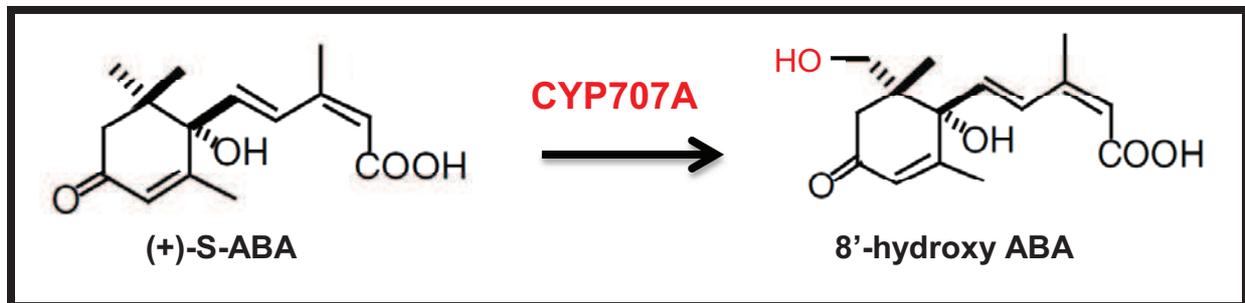


Figure 1-24 : La forme bioactive de l'acide abscissique ((+)-S-ABA) peut être inactivée par hydroxylation par les membres de la famille CYP707A.

L'inhibition de l'activité de BR peut également être effectuée par une simple hydroxylation (en position C26) par CYP734A1 (Turk et al., 2005).

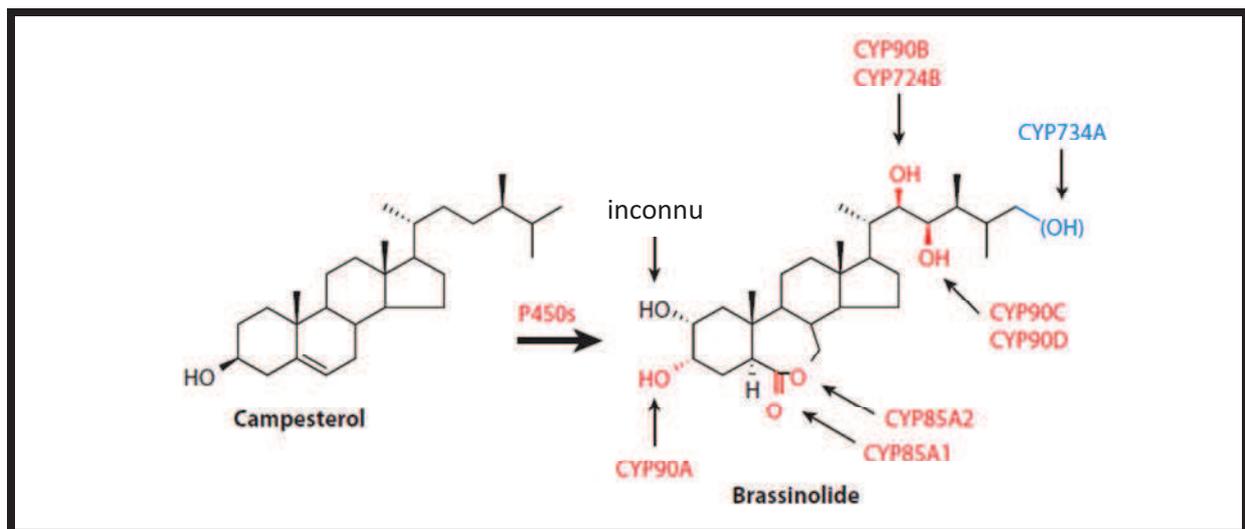


Figure 1-25 : P450s impliqués dans le métabolisme des brassinostéroïdes. D'après Mizutani et Ohta (2010). Les P450s impliqués dans la biosynthèse (en rouge) et le catabolisme (en bleu) sont représentés. L'hydroxylation catalysée par CYP734A est un mécanisme d'inactivation.

La modification de l'expression de P450s impliqués dans des étapes de biosynthèse ou de catabolisme d'hormone est un facteur important dans l'homéostasie des hormones et affecte le développement de la plante. Ainsi, la sur-expression de P450s oxydant GA ou BR conduit à de sévères défauts développementaux (Turk et al., 2005; Zhu et al., 2006).

1.6.2 Inactivation hormonale par conjugaison

Des conjugués hormone-acide aminé peuvent conférer à l'hormone une propriété biologique spécifique, mais également être un moyen de stocker l'hormone sous forme inactive, la dégrader ou la transporter. Par exemple, l'acide salicylique couplé à l'acide aspartique (SA-Asp) par l'acétyl-amido synthétase GH3.5 a été décrit comme une forme de transport de SA (Chen et al., 2014). De nombreux conjugués auxine-acide aminé ont été décrits (Tam et al., 2000; Kowalczyk et Sandberg, 2001). La conjugaison d'auxine avec des acides aminés est un processus très important chez *Arabidopsis thaliana* car 90% de l'auxine est conjuguée à un acide aminé (Tam et al., 2000).

1.7 Clivage de conjugués hormonaux par des amido-hydrolases

Certains conjugués d'auxine comme IAA-Asp et IAA-Glu sont considérés comme des intermédiaires de la dégradation d'auxine car des dérivés oxydés comme Ox-IAA-Asp ou 6OH-IAA-Asp ont été décrits (Östin et al., 1998). D'autres conjugués comme IAA-Ala, IAA-Leu et IAA-Phe peuvent être clivés pour libérer l'auxine. Des amido-hydrolases de conjugués d'auxine, catalysant le clivage de la liaison entre l'auxine et l'acide aminé, ont été décrites (Ludwig-Muller, 2011; Ljung, 2013). Elles appartiennent à la famille M20 des peptidases, qui ont deux cations dans leur site actif, généralement des ions Mn^{2+} (Ludwig-Muller, 2011).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les amido-hydrolases d'auxine caractérisées font partie d'une famille de 7 gènes (*IAR3*, *ILL1*, *ILL2*, *ILL3*, *ILL5*, *ILL6* et *ILR1*) (Rampey et al., 2004). Les isoformes *ILL1*, *IAR3* et *ILL5* portent une séquence signal prédisant une localisation dans le RE, alors qu'*ILL6* et *ILL3* n'en possèdent pas, et *ILR1* et *ILL2* ont des motifs prédisant une localisation dans le RE chez les animaux ou les champignons, mais pas chez les plantes (Davies et al., 1999; LeClere et al., 2002; Campanella et al., 2003; Bitto et al., 2009).

ILR1 est la première amido-hydrolase qui a été caractérisée, suite à l'isolement du mutant *ilr1* par son insensibilité à un traitement IAA-Leu (Bartel et Fink, 1995). *IAR3* clive divers conjugués d'auxine et également des conjugués ABA-acide aminé *in vitro*, suggérant que sa sélectivité de substrat n'est pas très stricte. Elle peut cliver d'autres conjugués (Todoroki et al., 2011) comme IAA-Ala (figure 1-26) (Davies et al., 1999). Son activité est requise pour la tolérance à la sécheresse (Kinoshita et al., 2012)

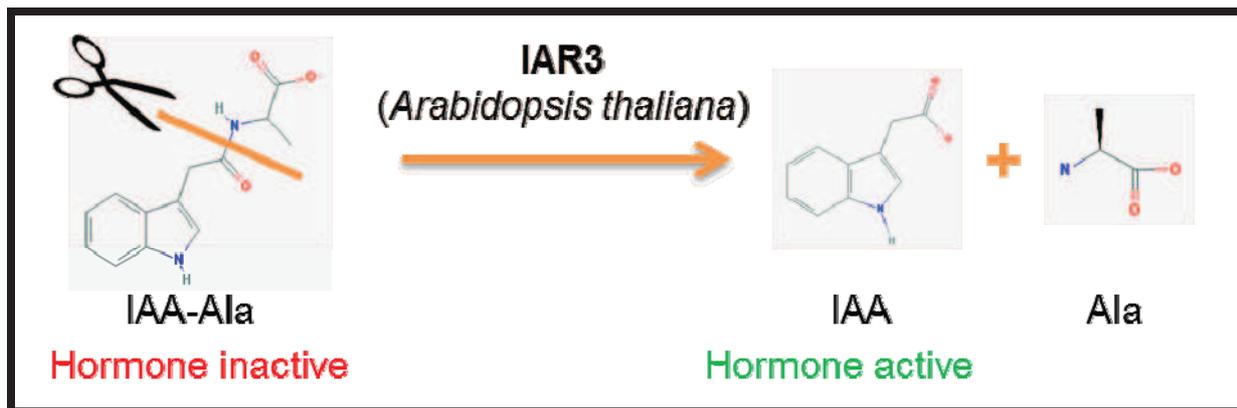


Figure 1-26 : L'amido-hydrolase IAR3 promeut l'activation d'auxine (IAA) par hydrolyse de la liaison amide du conjugué IAA-Ala.

1.8 Objectifs du travail de thèse

L'homéostasie d'une hormone est contrôlée par sa biosynthèse et son inactivation catabolique. La biosynthèse de JA-Ile est bien caractérisée, mais les mécanismes d'inactivation de JA-Ile demandent à être élucidés.

Les modes de formation des composés oxydés de JA-Ile, 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile, étaient inconnus lorsque j'ai initié mes travaux de recherche. Ces deux composés semblaient être des produits directs de l'oxydation de l'hormone, contrairement aux autres jasmonates oxydés connus. Certaines hormones sont inactivées par les P450s (paragraphe 1.6.1.2). Nous avons émis l'hypothèse que des cytochromes P450 pourraient oxyder l'hormone JA-Ile afin de l'inactiver. Plus particulièrement, CYP94C1 a été ciblé pour ses propriétés catalytiques particulières, déterminées préalablement sur des acides gras au laboratoire, ainsi que pour son profil d'expression.

Mes travaux de thèse ont eu pour objectif de caractériser les mécanismes d'inactivation de l'hormone JA-Ile chez *Arabidopsis thaliana*. Plus particulièrement, j'ai étudié l'implication des enzymes à cytochromes P450 de la famille CYP94 et des amido-hydrolases de la famille d'IAR3 dans le métabolisme des jasmonates. La blessure mécanique foliaire induit une forte accumulation de JA-Ile de manière transitoire, c'est pourquoi j'ai choisi ce premier modèle biologique pour étudier l'inactivation et le catabolisme de cette hormone.

L'impact de l'oxydation de JA-Ile sur les réponses physiologiques a également été étudié, en particulier sur les réponses de défense lors de l'infection par le champignon *Botrytis cinerea* et au cours du développement floral.

Pour déterminer si les niveaux d'autres conjugués JA-acide aminés pourraient être régulés par des oxydations catalysées par des CYP94s, nous avons également étudié le métabolisme du conjugué JA-Phe qui est accumulé dans les feuilles blessées.

MATERIEL ET METHODES

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel végétal

Tous les génotypes d'*Arabidopsis thaliana* utilisés sont d'écotype Columbia-0 (Col-0). Le site TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/>) indique les lignées mutantes disponibles pour chaque gène. Les mutants d'insertion T-DNA ont été obtenus des collections SALK.

Les mutants d'insertion T-DNA utilisés sont les suivants :

Mutant	Gène touché	Allèle	Collection
<i>cyp94b1</i>	At5g63450	<i>cyp94b1-1</i>	SALK_129672
<i>cyp94b3</i>	At3g48520	<i>cyp94b3-1</i>	CS302217
<i>cyp94c1</i>	At2g27690	<i>cyp94c1-1</i>	SALK_55455
<i>iar3</i>	At1g51760	<i>iar3-5</i>	SALK_069047
<i>iar3</i>	At1g51760	<i>iar3-6</i>	SALK_042101
<i>ill6</i>	At1g44350	<i>ill6-1</i>	GK412E11
<i>ill6</i>	At1g44350	<i>ill6-2</i>	SALK_024894
<i>jar1</i>	At2g46370	<i>jar1-1</i>	
<i>coil</i>	At2g39940	<i>coil-1</i>	

Les lignées d'insertion T-DNA ont été obtenues du Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC), des collections de l'institut SALK (noté SALK, <http://www.salk.edu/>) ou GABI-KAT (noté GK, <http://www.gabi-kat.de/>). Les graines obtenues proviennent de populations ségrégantes. Dans de rares cas, il s'agit de stocks homozygotes.

Pour les lignées RNAi de *CYP94C1*, obtenues avant mon arrivée au laboratoire, un fragment d'ADNc (nucléotides 451 à 750 de l'ADNc) de *CYP94C1* a été amplifié par PCR et cloné dans les deux orientations dans le vecteur pFGC5941 (Heitz et al., 2012). Un ARN double brin obtenu par expression de cette construction sous promoteur 35S permet de diminuer voire éteindre l'expression du gène endogène.

Les doubles mutants *cyp94b3cyp94c1*, *cyp94b1cyp94b3*, *cyp94b1cyp94c1* et le triple mutant *cyp94b1cyp94b3cyp94c1* sont issus de croisements entre les lignées *cyp94b1-1*, *cyp94b3-1* et *cyp94c1-1*.

Les lignées utilisées sur-exprimant *CYP94C1* (OECYP94C1-3B et OECYP94C1-3F) ont été obtenues avant mon arrivée au laboratoire par Sylvie Kandel. Elles ont été générées par clonage de l'ORF de *CYP94C1* successivement dans les vecteurs Gateway (Invitrogen) pDONR207 et pB7WG2, en aval du promoteur 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Les constructions de vecteur binaire ont été transférées à la souche d'*Agrobacterium* GV3101 puis introduites dans des plantes sauvages par immersion des fleurs (Clough et Bent, 1998). Des plantes homozygotes T3 ou les générations suivantes ont été utilisées pour les expériences.

Des plantes sur-exprimant *CYP94B3* (OECYP94B3) nous ont été courtoisement données par Yves Millet.

2.2 Conditions de culture

2.2.1 Plantes en terreau

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été cultivées dans des pots individuels de 7 cm de diamètre contenant 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 en proportion 2 kg/m³ de terreau, soit 140 g pour 70 litres de terreau. Les plantes sont disposées en logettes de culture avec une photopériode 12 h jour /12 h nuit pendant 6 à 7 semaines (stade rosette adulte) pour les expériences de blessure et d'infection par *Botrytis cinerea*. Des plantes en fleurs ont été obtenues avec une photopériode 16 h jour /8 h nuit. La température des logettes est de 21 °C en période de lumière et de 18 °C en période d'obscurité.

2.2.2 Plantes en culture *in vitro*

2.2.2.1 Stérilisation des graines

Pour la stérilisation des graines destinées à la culture en milieu solide, les graines ont été soumises à une atmosphère provenant d'un mélange de javel, d'eau et de HCl (50:50:3 (v/v/v)) pendant 3 h.

Pour la stérilisation des graines destinées à la culture en milieu liquide, des lavages à l'éthanol ont été effectués. Pour cela, les graines sont mises dans un tube éppendorf de 2 ml et 1 ml d'éthanol 70% est ajouté. Le tube est ensuite mis en rotation sur roue pour bien laver les graines pendant 10 min puis l'éthanol est retiré. Ensuite les graines sont à nouveau lavées avec de l'éthanol 70% puis de l'éthanol 96%. Les graines sont laissées sous la hotte pour sécher avant d'être semées en milieu liquide.

2.2.2.2 Culture en milieu solide

Le milieu solide artificiel utilisé pour cultiver les plantes *in vitro* est un milieu Gamborg B5 solidifié par 3 g/l de bactoagar. Les graines ont été semées en ligne à deux cm du bord de la boîte. Les boîtes de milieu solide sont incubées à 4°C pendant 48h puis disposées verticalement en chambre de culture (photopériode de 16 h d'éclairage à 21°C et 8 h d'obscurité à 17°C) pendant 11 jours.

2.2.2.3 Culture en milieu liquide

Le milieu liquide artificiel utilisé pour cultiver les plantes *in vitro* est composé de Murashige et Skoog Basal (M5519, Sigma-Aldrich®) 4,4 g/l, complémenté de saccharose 5 g/l et de MES monohydrate (Duchefa Biochemie) 0,5 g/l. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 à l'aide d'une solution de KOH 1 M.

Un volume de 4 ml de milieu liquide est placé stérilement dans chacun des 6 puits d'une boîte de plastique stérile. Puis 12 graines stérilisées sont déposées à l'aide d'un cure-dent dans chaque puits. La boîte est ensuite fermée par un couvercle et une double couche de sparadrap large microporeux (urgopore). La boîte est laissée à l'obscurité à 4°C pendant 48 h pour synchroniser la germination, puis transférée dans une armoire de culture (armoire SANYO, 16 h de luminosité / 8 h d'obscurité, 22°C, 65 % d'humidité).

2.3 Analyse et caractérisation de lignées d'insertion T-DNA

2.3.1 Extraction d'ADN génomique rapide

Cette méthode d'extraction rapide permet d'analyser de nombreux d'échantillons. De plus, une seule jeune feuille d'*Arabidopsis thaliana* est suffisante pour obtenir l'ADN génomique nécessaire pour les PCR de génotypage. Une jeune feuille (environ 5 mm) est broyée dans un volume de 500 µl de tampon d'extraction « Magic Buffer » (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 300 mM saccharose). Après centrifugation (3,000 rpm, 3 min), 10 µl de surnageant sont dilués dans 90 µl de tampon d'extraction.

2.3.2 Génotypage par PCR

La technique de PCR permet de génotyper les plantes en mettant en évidence la présence du T-DNA dans l'allèle muté ou son absence dans l'allèle sauvage. Pour chaque lignée, deux combinaisons d'amorces différentes sont utilisées :

- Une amorce sens et une amorce anti-sens s'hybrident spécifiquement sur le gène d'intérêt, de part et d'autre de la zone prédite de l'insertion du T-DNA. La présence d'un amplicon met en évidence un allèle sauvage sans insertion T-DNA.
- Une amorce sens s'hybrident spécifiquement avec le gène d'intérêt et une amorce anti-sens s'hybrident spécifiquement sur le T-DNA (ou inversement). Cette combinaison doit permettre d'amplifier un fragment hybride gène d'intérêt/T-DNA, c'est-à-dire l'allèle interrompu par le T-DNA. Cet amplicon permettra également de vérifier par séquençage le site d'insertion du T-DNA dans le gène au nucléotide près.

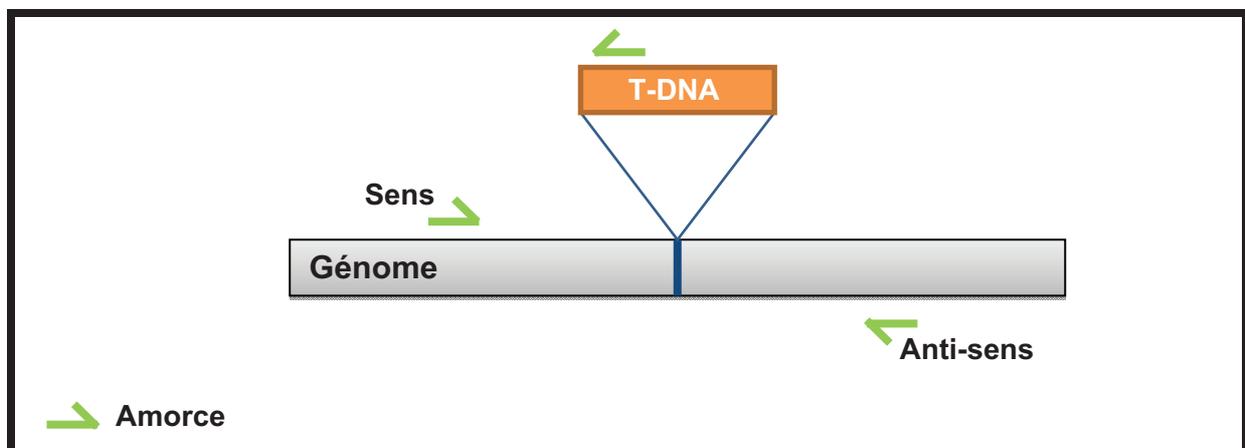


Figure 2-1 : Schéma illustrant la position des amorces utilisées pour le génotypage de plantes par PCR.

Le milieu réactionnel de PCR est composé de : 0,5 à 1 µl de solution d'ADN, Tampon GoTaq, MgCl₂ à (2 mM), 1µl dNTPs (0,4 µM), Primer A (0,4 µM), Primer B (0,4 µM), Taq polymérase (1 U), H₂O qsp 25 µl.

2.3.2.1 Programme PCR

L'ADN est d'abord dénaturé 2 min à 95°C, puis suivent 35 cycles d'amplification. Un cycle d'amplification comprend 30 s de dénaturation à 95 °C, 30 s d'hybridation des amorces à 56°C, 1 min de polymérisation à 72 °C. Pour terminer, 10 min à 72°C permettent une élongation finale.

2.3.2.2 Amorces utilisés pour le génotypage par PCR

Des amorces LP (sens) et RP (anti-sens) permettant le génotypage des mutants des lignées SALK sont décrites sur le site <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

Les amorces que nous avons utilisées sont :

Gène	Lignée	Amorce LP (5'→3')	Amorce RP (5'→3')
At5g63450	<i>cyp94b1-1</i>	cggggtacctaaatatacatcgaatcacattgct	gggaattcactttcgaatcc
At3g48520	<i>cyp94b3-1</i>	tggtttggttctcactgttcac	gaacgtgggaagcgagaggaagc
At2g27690	<i>cyp94c1-1</i>	tgtcttttgaaagtagcacc	gattccacggcctaaaagatc
At1g51760	<i>iar3-5</i>	gttctccacgtgcgttatagc	aaaaagccacactgttccatg
At1g51760	<i>iar3-6</i>	gttctccacgtgcgttatagc	acaccagtaacagcaactggg
At1g44350	<i>ill6-1</i>	gactatgcttctgtgtctgc	cgcacctctgaatacgtttc
At1g44350	<i>ill6-2</i>	gactatgcttctgtgtctgc	cgcacctctgaatacgtttc
Amorce T-DNA LBb1.3 (SALK)			atfttgccgatttcgaac
Amorce T-DNA o8409 (GABI-Kat)			atattgaccatcatactcattgc

2.3.3 Analyse des produits de PCR sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique permettant la séparation des fragments d'ADN, notamment des produits PCR, selon leur taille. Les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose 1 % dans du TAE 0,5 x. Du bromure d'éthidium permet de révéler l'ADN sous UV.

2.3.4 Séquençage d'ADN

Le séquençage des sites d'insertion des T-DNA a été effectué à la plateforme de séquençage de l'IBMP par A. Alioua selon une technique de séquençage basée sur la méthode de Sanger (Sanger et al., 1977). La technique utilisée repose sur l'incorporation aléatoire de 4 didéoxyribonucléotides (ddATP, ddTTP, ddGTP, et ddCTP) qui entraînent l'arrêt de l'élongation de la chaîne d'ADN. Chaque didéoxyribonucléotide est couplé à une fluorescéine ayant une longueur d'onde d'excitation qui lui est propre. Les molécules d'ADN sont séparées en fonction de leur taille dans des capillaires contenant un gel de polyacrylamide, puis la séquence de l'ADN à séquencer est déduite par suivi de la fluorescence correspondant à chaque didéoxyribonucléotide (séquenceur Abi Prism) (Prober et al., 1987).

2.3.5 Vérification de la perte d'expression des gènes d'intérêt

Afin de vérifier l'abolition de l'expression des gènes étudiés, les feuilles de plantes mutées homozygotes et d'un contrôle sauvage sont blessées pour induire l'expression puis récoltées après 1h. Puis l'ARN total est extrait et une transcription inverse est effectuée (les techniques d'extraction d'ARN totaux et de RT-qPCR sont expliquées paragraphe 2.13). L'expression du gène muté est ensuite évaluée par PCR quantitative en choisissant, dans le cas où l'insertion est située dans un exon, des amorces à cheval de part et d'autre du site d'insertion du T-DNA. De cette manière, seule une séquence d'ADNc sauvage peut à priori être amplifiée chez l'allèle muté, le transcrit aberrant ne permet en général pas d'amplification. Ceci permet de déterminer si la plante est Knock-down (diminution de l'expression) ou Knock-out (perte totale d'expression) pour le gène d'intérêt.

2.4 Blessure de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

La blessure de feuilles est un modèle biologique d'étude du métabolisme des jasmonates. Ce stress mécanique permet de stimuler de manière synchrone des réponses similaires à celles induites par une attaque d'insecte herbivore et induit fortement la synthèse de jasmonates ainsi que des réponses transcriptionnelles.

Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* adultes âgées de 6 à 7 semaines sont blessées à l'aide d'une pince hémostatique. Environ 6 feuilles par plante sont blessées en appliquant 3 à 4 pincements perpendiculaires à la nervure centrale. Les feuilles blessées sont récoltées et

congelées rapidement dans l'azote liquide à différents temps après blessure (30 min, 1 h, 2 h, 4 h et 8 h) afin de réaliser une étude cinétique. Concrètement, toutes les feuilles blessées de 4-5 plantes sont récoltées pour un point de cinétique. Les feuilles congelées sont stockées à -80°C jusqu'au moment des extractions d'ARN ou de métabolites.

2.5 Test de résistance à Botrytis

2.5.1 Préparation de l'inoculum et inoculation

Les spores de la souche B05.10 du champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* sont stockées à -80°C. Pour préparer l'inoculum, les spores sont reprises dans du PDB (Potato Dextrose Broth) 0,5 X pour atteindre une concentration de $2,5 \times 10^6$ spores/ml. La suspension est laissée 6 h à température ambiante avant l'inoculation des spores à des feuilles de plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 6-7 semaines. L'inoculation est effectuée par 2 dépôts de 5 µl de suspension, disposés de part et d'autre de la nervure centrale de la feuille. Entre 4 et 7 feuilles par plante sont inoculées. Les plantes inoculées sont disposées dans des mini-serres fermées contenant un fond d'eau afin d'assurer une humidité saturante propice au développement de *Botrytis cinerea*. Les mini-serres sont placées sous une photopériode de 12 h jusqu'au moment de la récolte. Les feuilles inoculées sont observées et récoltées au bout de 1, 2 ou 3 jours et la résistance de chaque génotype de plante est évaluée. Trois réplicats biologique sont récoltés indépendamment. Les feuilles récoltées destinées aux analyses moléculaires et métaboliques sont congelées dans un tube plongé dans l'azote liquide puis stocké à -80°C.

2.5.2 Evaluation de la résistance

2.5.2.1 Mesure des lésions

Une évaluation macroscopique du niveau de résistance est effectuée par mesure du diamètre des lésions 3 jours après inoculation à l'aide d'une loupe graduée. L'aire des lésions est ensuite calculée afin de comparer la taille des lésions chez les différents génotypes de plante.

2.5.2.2 Quantification relative de l'ADN de *Botrytis cinerea*

Une autre méthode utilisée pour comparer la résistance des différents génotypes de plante est la détermination de la quantité relative de champignon sur les feuilles infectées par PCR. Pour

ceci, les ADNs de plante et de pathogène sont extraits simultanément. Entre 50 et 100 mg de poudre de feuille infectée congelée sont broyées (broyeur Precellys (Bertin Technologies, Montigny-Le-Bretonneux, France), 5500 rpm, 30 sec) dans 400 µl de tampon d'extraction (TrisHCl 0,2 M pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5 %). Le broyat est centrifugé (18,000g, 5 min, 4°C) puis 300 µl de surnageant sont ajoutés à 300 µl d'isopropanol froid pour précipiter l'ADN (5 min à température ambiante). Une centrifugation (18,000g, 10 min, 4°C) permet d'obtenir un culot, qui est ensuite lavé avec 1 mL d'éthanol 70%. Après une nouvelle centrifugation, le culot est séché 15 min à 37°C. Un volume de 100 µl de TrisHCl (10 mM, pH 8) permet de reprendre le culot. Deux centrifugations successives permettent d'éliminer les derniers débris. Le surnageant de la dernière centrifugation sera utilisé pour évaluer les quantités relatives d'ADN de champignon et de plante par qPCR.

Des régions spécifiques des gènes de la cutinase A de *Botrytis cinerea* et du gène *actine 2* d'*Arabidopsis thaliana* sont amplifiés par qPCR pour quantifier l'ADN de chaque organisme. Le rapport quantité d'ADN de *Botrytis cinerea*/quantité d'ADN de plante permet de comparer la croissance du champignon sur les plantes de divers génotypes et à différents temps après inoculation.

2.6 Test de croissance racinaire d'*Arabidopsis thaliana* in vitro

Des graines stérilisées de type sauvage et de mutants *cyp94s* ont été semées en milieu solide supplémenté ou non avec de l'acide jasmonique (2 ou 10 µM). Au total, 30 graines par génotype et par condition de traitement ont été semées. Les graines ont été disposées en ligne (à 2 cm du bord) dans des boîtes de pétri carrées. Les boîtes ont été incubées à 4°C pendant 48h puis disposées verticalement en chambre de culture pendant 11 jours. Les plantules ont été photographiées et la longueur des racines mesurée avec l'outil « simple neurite tracer » du logiciel Fiji.

2.7 Traitement de feuilles adultes d'*Arabidopsis thaliana* par des jasmonates

Des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 6 semaines ont été coupées puis déposées verticalement dans des fioles en verre, le pétiole plongé dans une solution de JA-Ile, de 12OH-JA-Ile ou de 12COOH-JA-Ile à 10 µM. Les fioles ont été disposées à la lumière avec

une photopériode de 12 h. Les feuilles ont été récoltées à différents temps de traitement. Pour la récolte, les feuilles ont été brièvement séchées et rapidement congelées avec de l'azote liquide. Les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'au moment de l'extraction des ARNs.

2.8 Traitement de plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 7 jours par des jasmonates

L'utilisation de plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 7 jours cultivées en milieu liquide permet d'administrer des composés sans occasionner de stress pour les plantes. Cette méthode permet d'évaluer l'effet du traitement par des jasmonates sur l'expression de gènes, sans que l'effet du traitement ne soit masqué ou altéré par les réponses de jasmonates endogènes synthétisés inévitablement dans d'autres protocoles utilisant des feuilles excisées.

Des plantules cultivées *in vitro* dans du milieu MS liquide en armoire de culture pendant 7 jours ont été traitées par du MeJA, JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou du 12COOH-JA-Ile à 30 µM. Concrètement, 10,5 µl de composé à 10 mM (dans du méthanol) sont ajoutés délicatement au centre d'un puits contenant 3,5 ml de milieu MS et 10 à 12 plantules. Le cône utilisé ne touche pas les plantules pour ne pas les stresser. Un seul mouvement circulaire rapide de l'ensemble de la boîte est effectué pour homogénéiser le milieu. Les boîtes sont scellées (urgopore) pour éviter l'évaporation. Les plantules sont disposées dans l'armoire de culture (armoire SANYO, 16 h de luminosité / 8 h d'obscurité, 22°C, 65 % d'humidité) jusqu'au moment de la récolte.

Les plantules sont récoltées selon une cinétique. Pour chaque prélèvement, les plantules sont séchées brièvement par dépôt sur une feuille de papier absorbant, placées dans un tube à visser contenant des billes de verre puis immédiatement congelées à l'azote liquide. Les échantillons sont stockés à -80 °C jusqu'à extraction des ARNs.

2.9 Récolte de fleurs d'*Arabidopsis thaliana* fermées ou ouvertes

Les fleurs d'inflorescences secondaires obtenues après coupure de la hampe primaire ont été récoltées. Deux types d'échantillons ont été récoltés. Les « fleurs fermées » récoltées correspondent à la partie centrale de l'inflorescence et comportent tous les stades floraux avant ouverture et émergence des pétales (stades 1 à 12). Les « fleurs ouvertes » récoltées

correspondent aux stades floraux auxquels les pétales sont apparents jusqu'au stade de fleur totalement ouverte (stades 13 et 14).

Les échantillons sont récoltés manuellement à l'aide d'une pince et congelés immédiatement après prélèvement dans un tube plongé dans l'azote liquide. Les échantillons sont stockés à -80°C avant extraction des métabolites ou des ARNs.

2.10 Récolte de pollen d'*Arabidopsis thaliana*

Des inflorescences comportant un maximum de fleurs ouvertes sont prélevées à l'aide d'une pince et déposées dans un tube falcon de 50 ml (la quantité d'inflorescences récoltées correspond à un volume d'environ 20 ml). Puis 20 ml de PBS x1 (Tampon Phosphate Salin) sont ajoutés et le tout est agité vigoureusement. Le liquide est filtré sur une toile à bluter (50 µm) laissant passer les grains de pollen. A nouveau, 20 ml de PBS x1 sont ajoutés aux inflorescences et après agitation et filtration, les deux filtrats sont rassemblés. Une centrifugation (15 min, 4000g) permet de culoter les grains de pollen. Le surnageant est ôté délicatement puis le culot est repris dans 1 ml de PBS et transféré dans un microtube de 1,5 ml. Une nouvelle centrifugation (15 min, 5000g) permet d'obtenir un culot de pollen, repris dans 100 µl de PBS puis stocké à -30°C avant d'extraire les ARNs.

2.11 Observations au mini-microscope électronique à balayage

Le pollen des mutants affectés dans l'expression des *CYP94s* a été examiné. Afin de vérifier la présence de réticulations au niveau de l'exine à la surface des grains de pollen, des observations ont été effectuées avec un mini-microscope électronique à balayage (TM-1000 Hitachi). Les grains de pollen de fleurs ouvertes ont été déposés sur un morceau de gélose (LB agar) puis directement observés.

2.12 Colorations

2.12.1 Colorations GUS

La localisation de l'expression des gènes codant pour CYP94B3 et CYP94C1 a été étudiée par l'intermédiaire d'une fusion de leur promoteur avec la séquence codante d'un gène rapporteur (β -glucuronidase), technique décrite par (Jefferson et al., 1987). Ces lignées étaient

disponibles au laboratoire. La coloration est basée sur l'activité de la β -glucuronidase qui convertit le substrat X-Glc en un précipité bleu. Les tissus bleus correspondent donc aux cellules dans lesquelles le promoteur du gène d'intérêt est actif et permet une transcription de la β -glucuronidase. On peut donc en déduire les tissus dans lesquels la transcription du gène d'intérêt a lieu.

2.12.1.1 Colorations

Les tissus de plantes transformées avec la construction contenant le gène rapporteur sont infiltrés sous vide durant 5 à 10 min dans une solution X-Glc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique) 0,5 mg/ml, tampon phosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH 7, ferricyanate de potassium 1 mM, ferrocyanate de potassium 1 mM, 0,1 % Triton X-100. Après incubation pendant 8 à 20 h dans la solution-substrat à 37°C, les tissus sont décolorés dans des bains de concentrations croissantes d'éthanol. Les tissus colorés sont conservés à 4 °C dans une solution d'éthanol à 96 %.

2.12.1.2 Inclusions et coupes

Les tissus sont ensuite inclus dans du paraplast pour pouvoir réaliser des coupes. Pour cela, les échantillons sont baignés à 60°C dans des solutions d'histoclear de concentrations croissantes (Ethanol/Histoclear 3:1, puis 1:1, puis 1:3, v/v) pour terminer dans 100% d'histoclear. Ensuite les tissus sont baignés dans une solution histoclear/paraplaste (1:1, v/v) pendant environ 4 heures. Enfin, les échantillons sont baignés dans du paraplaste 100% pour 2 jours avant l'inclusion par refroidissement.

Les coupes de 10 μm sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome et déposées sur des lames silanées. Pour silaner des lames de verre, les lames sont plongées 1 min dans une solution d'acétone comportant 2,1% de silane (Fluka/sigma) puis l'excès de silane est enlevé dans une solution d'acétone 100% (30 s) et les lames sont rincées à l'eau. Celles-ci sont ensuite séchées une nuit à 42°C. Les observations des coupes sont ensuite faites sous un microscope Nikon E800.

2.12.2 Coloration d'Alexander : test de viabilité du pollen

La coloration d'Alexander est une technique simple permettant de déterminer si un grain de pollen est viable ou non. La coloration d'Alexander colore le protoplasme en rose et la paroi

du pollen en vert. Or, les grains de pollen qui avortent tôt ne possèdent pas de protoplasme (Barrow, 1983). Ces grains de pollen non viables ne sont donc pas colorés en rose et apparaissent vert, tandis que les grains de pollen viables sont roses.

Sur une lame de microscope, des fleurs sont déposées dans une goutte de solution d'Alexander (Alexander, 1969), les étamines sont dégagées et le tout est recouvert d'une lamelle. Après 10 min, les grains de pollen sont observés au microscope sous lumière blanche.

2.12.3 Coloration au bleu d'aniline : visualisation du tube pollinique

Pour visualiser la germination du pollen *in vivo*, les pistils de fleurs ouvertes (donc après déhiscence des anthères) sont prélevés puis coupés longitudinalement en deux parties égales. Ces échantillons sont fixés dans une solution éthanol / acide acétique (3:1, v/v) durant 1 h à température ambiante puis baignés dans une solution de NaOH 1 M pour une nuit. Les pistils sont lavés plusieurs fois dans de l'eau distillée puis plongés dans une solution d'aniline 0,1% (dissous dans 0,1 M de K₂HPO₄) pendant 3 h à l'obscurité. Les pistils sont ensuite mis entre lame et lamelle dans une goutte de glycérol et observés sous lumière UV ($\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$) d'un microscope à épifluorescence.

2.13 Analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR

L'extraction des ARNs totaux puis l'obtention d'ADNc par transcription inverse permettent de mesurer ensuite l'expression de gènes d'intérêt par PCR quantitative (qPCR) dans différents organes ou situations de stress.

2.13.1 Extraction des ARNs totaux

Les échantillons congelés de feuilles (100-150 mg), de fleurs (environ 80 mg) ou de plantules (10-12 plantules de 7 jours, correspondant à une vingtaine de mg) stockés dans des tubes à capuchon vissant contenant une dizaine de billes en verre sont additionnés de 1 ml de Trizol sur glace. Le broyage s'effectue avec un broyeur oscillant (Precellys, 5500 rpm, 2 x 30 sec avec 30 sec de pause). Pour les plantules, un second broyage est effectué avec le même programme. Après ajout de chloroforme (200 μl) et centrifugation (12000g, 15 min, 4°C), la phase aqueuse obtenue contenant les ARNs est extraite dans du phénol/chloroforme/alcool

isoamylique (25:24:1; v/v/v). Après centrifugation (12000g, 10 min, 4°C), 500 µl de surnageant sont transférés dans un microtube de 2ml contenant 500 µl d'isopropanol froid (500 µl) pour précipiter les ARN (10 min à température ambiante). Une centrifugation (12000g, 10 min, 4°C) permet d'obtenir un culot d'ARN, lavé ensuite à l'éthanol 70%, séché puis repris dans de l'eau (50 µl pour tous les échantillons excepté les plantules pour lesquelles le culot d'ARN est repris dans 15 µl). La concentration et la pureté des ARN obtenus sont évaluées par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm au nanodrop (Thermo).

2.13.2 Transcription inverse

La transcription inverse permet de synthétiser de l'ADN à partir d'ARN. On utilise la transcription inverse pour obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à ceux des ARN messagers. Ces ADNc serviront de matrice pour mesurer l'expression de gènes par qPCR. Des transcriptions inverses sont effectuées sur 1 µg d'ARN total extrait avec le kit ImPromIITM Reverse Transcription System (Promega) selon le protocole fourni.

A la fin de la réaction, les ADNc obtenus sont dilués 5 fois en ajoutant 80 µl d'eau aux 20 µl de réaction avant d'être utilisés pour la qPCR.

2.13.3 PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative ou en temps réel permet de mesurer précisément les quantités d'ADNc provenant des transcrits d'un gène présents dans un échantillon. Ainsi, cette technique est très utile pour comparer les niveaux d'expression d'un gène dans divers organes ou dans deux échantillons de plante différents, par exemple un échantillon de plante stressée et un échantillon de plante non stressée.

2.13.3.1 Milieu de réaction

Le milieu de réaction de PCR quantitative en temps réel est composé de 1 µl d'ADNc (dilués comme décrit ci-dessus), 5 µl de SYBR Green Master Mix, 2 µl d'eau et 2 µl du couple d'amorces (2,5 µM). Les amorces sont déposées manuellement en plaque de 384 puits, puis un mélange contenant les autres réactifs est assemblé pour chaque cDNA et distribué par un robot Biomek 3000 (Beckman Coulter).

2.13.3.2 Amorces utilisées

Les amorces utilisées ont été dessinées pour la plupart avec le logiciel Universal ProbeLibrary (UPL) Roche (<http://www.roche-applied-science.com/shop/CategoryDisplay?catalogId=10001&tab=&identifieur=Universal+Probe+Library#tab-3>). Le logiciel se base sur tout le génome d'*Arabidopsis thaliana* pour dessiner des amorces spécifiques au gène d'intérêt. Si le gène d'intérêt comporte des introns, des amorces sont choisies de part et d'autre d'un intron (le temps d'amplification par PCR étant court (15 sec), un tel couple d'amorce amplifiera préférentiellement des ADNc provenant de transcrits épissés, plutôt que de l'ADN génomique). La température d'hybridation optimale de chaque amorce est de 61 °C. La taille de l'amplicon est généralement de 60 à 100 nucléotides.

Les amorces utilisées pour les réactions de qPCR sont listées dans le tableau ci-dessous.

Amorces utilisées pour mesurer l'expression de gènes mutés chez les mutants T-DNA d'<i>Arabidopsis thaliana</i>			
Lignée	Gène	Amorce sens (5'→3')	Amorce anti-sens (5'→3')
<i>cyp94b1-1</i> (SALK_129672)	At5g63450	caatgaggctttaccaccag	aaatgctgctgtttgctgcat
<i>cyp94b3-1</i> (CS302217)	At3g48520	acgtgtcaagagaggagacaagtg	caccgggtcgggttaaactctctg
<i>cyp94c1-1</i> (SALK_55455)	At2g27690	ctcatctcttctctcacctt	agacgatggatgatgatgattg
<i>iar3-5</i> (SALK_069047)	At1g51760	ttgcttctgtaccctgct	tcggataagcaagtgaagga
<i>iar3-6</i> (SALK_042101)	At1g51760	gggctgatatggatgcactg	tgcattctccctggaacctt
<i>ill6-1</i> (GK412E11)	At1g44350	gtgtcccatatccatccaacgg	ggtccgacatacccatgatcc
<i>ill6-2</i> (SALK_024894)	At1g44350	cttggtgctgccatattct	tcatccaaagctccctcttc
Amorces utilisées pour mesurer l'expression de gènes non-mutés			
Gène d'<i>Arabidopsis thaliana</i>		Amorce sens (5'→3')	Amorce anti-sens (5'→3')
<i>CYP94B1</i>	At5g63450	caatgaggctttaccaccag	aaatgctgctgtttgctgcat
<i>CYP94B2</i>	At3g01900	caacgttgacggaaacctct	ggggtgaagtctgtgtagc
<i>CYP94B3</i>	At3g48520	tggcttacacgaaggctgtc	agtcccacgaaactggaggat
<i>CYP94C1</i>	At2g27690	ggcccggattacgaagattt	ggccggaacttacctctggt
<i>CYP94D1</i>	At1g34540	cctgtgccagtggacataaag	caaatgtcccatcaggcaat
<i>CYP94D2</i>	At3g56630	ccgtcgaatcaactagc	gcgaaccgctccaatagt
<i>EXP</i>	At4g26410	gagctgaagtggctcaatgac	ggtccgacatacccatgatcc
<i>GAPDH</i>	At1g13440	ttggtgacaacaggtcaagca	aaactgtgctcaatgcaatc

<i>OPR3</i>	At2g06050	gctcgcttaccttcacgttacac	cttgaaccgcgaaaccaaatccg
<i>VSP1</i>	At5g24780	ccgtcaatgttggatctttg	gctgtgttctcgggccata
<i>Actine 2</i>	At3g18780	cttgaccaagcagcatgaa	ccgatccagacactgtacttctt
<i>TIP41</i>	At4g34270	gtgaaaactgttgagagaagcaa	tcaactggataccctttcgca
<i>ST2a</i>	At5g07010	ggcttgcaactttcttagactt	cggcgatagccttcacaac
<i>IAR3</i>	At1g51760	gggctgatatggatgcaactg	tgcattctccctggaacctt
<i>ILL6</i>	At1g44350	ggctgatatggacgcactacc	tgcattttgctgcaacttt
<i>ILL1</i>	At5g56650	ttcaacaacatcgccaacatt	caacgttctcaacgctcct
<i>ILL2</i>	At5g56660	atgaacatcgccaccatttg	ctcatcttcttctgccactcaa
<i>ILL3</i>	At5g54140	tgttgctctccgtgctgata	tttctcttatgatcccactcaa
<i>ILR1</i>	At3g02875	actggatccactcgaagctg	tgcggtattacgtttgagca
<i>ILL5</i>	At1g51780	gtttcacgagaggcagatcct	tccgggatgacattaaaagca
<i>PR1</i>	At2g14610	catacactctgggtggccttac	cgagtctcactgactttctcaa
<i>PR4</i>	At3g04720	gccatctcattgttactaccaattt	atcaatggccgaacaagca
<i>PDF1.2</i>	At5g44420	caccctfatcttcgctgctctt	tacactgtgtgctgggaagac
<i>JAZ1</i>	At1g19180	ttctgagttcgtcgtagcc	cacgtctgtgagaagctagcc
<i>JAZ2</i>	At1g74950	gcctctttagcctcgaact	tggctcctttgatgtgatcc
<i>JAZ3</i>	At3g17860	ccaatgtaatggctccaacagt	aaaaacctagccagggatgct
<i>JAZ4</i>	At1g48500	gccggttcagattagttaccaag	attccggctagcaacatga
<i>JAZ5</i>	At1g17380	ttgctaaacggaaagacagagc	tgtctgcctctagtgttga
<i>JAZ6</i>	At1g72450	cttcacgattctttgctaaacg	cgatggagcaaccatctctg
<i>JAZ7</i>	At2g34600	tgagaagtcagacggttcgg	tcgagtcgaattgtttgggat
<i>JAZ8</i>	At1g30135	aatgtgtttttctcagatgttacc	ttctctgcttgcgatgatatt
<i>JAZ9</i>	At1g70700	catccttctcttgtccacga	ccgccataaaagattgtgagc
<i>JAZ10</i>	At5g13220	cgctcctaagcctaagtccag	tttcgaaatcgcaccttgaata
<i>JAZ11</i>	At3g43440	gatcgattcacgaagctaggtc	tcccaccaagataatagtaagttgag
<i>JAZ12</i>	At5g20900	cacatctaattgtggcatcacca	gcctccttgaataggtagatca
<i>VSP1</i>	At5g24780	ccgtcaatgttggatctttg	gctgtgttctcgggccata
<i>MYB21</i>	At3g27810	gatgggtgttggaaattctctcg	agtgatgtttccccgctgt
<i>MYB24</i>	At5g40350	tggaaactctctcgccaaatc	gcacatcaggtcggaggtag
<i>MYB27</i>	At3g53200	aacaggaagctcaaaactatggaa	ttgtgcaacaattcttctcctg
<i>MYC2</i>	At1g32640	gccgaaggaatacacgcaat	cgggttgtgaacgggcta
<i>ERF1</i>	At3g23240	aaagcagcttgatcgtagcc	attcgactagaaacggattaggg
<i>JR1</i>	At3g16470	tccaatactattccagcacaagg	tgtcgtgaacaccatcatcc
<i>JR2</i>	At4g23600	ggatccatatcaaagggatgg	gatcatgtagcgtgagccaac
Gène de <i>Vicia</i>		Amorce sens	Amorce anti-sens

<i>Vs CYP94A1</i>	cttaacaaaaccaacaacaagtatcttc	gcggtgcaggtttttctga
<i>Vs CYP94A2</i>	tggagcgacagctgaaagaag	acagattcggattccgactgtag
<i>Vs CYP94A3</i>	atcggaacagacagcggtta	ccaatgattccaacgctgatt
<i>mmVfUbiquitine</i>	tgaccggaagaccatcact	gagtacgaccgtctcaagc
Gène de <i>Botrytis cinerea</i>	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>Cutinase A</i>	Z69264	gatgtgacgggtcatctttgcc
		agatttgagagcggcgagg

Figure 2-2 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR quantitatives.

2.13.3.3 Programme

L'instrument de PCR quantitative en temps réel à haut débit (Light Cycler 480, Roche) est utilisé pour amplifier un fragment d'ADNc avec le programme suivant :

- dénaturation (95°C, 5 min),
- PCR (45 cycles : dénaturation des amplicons 10 s à 95°C, hybridation des amorces 15 s à 60°C, polymérisation 15 s à 72°C)

Puis un gradient de températures croissantes (entre 55 et 95°C) permet d'établir une courbe de fusion des amplicons et de vérifier la spécificité d'amplification pour chaque couple d'amorces.

2.13.3.4 Calculs des niveaux d'expression

Le Sybr Green est une molécule fluorescente lorsqu'elle est intercalée dans de l'ADN double brin. L'amplification des ADNc peut être suivie en temps réel en observant la fluorescence à chaque nouveau cycle lorsque les amplicons sont dénaturés. La fluorescence est proportionnelle à la quantité d'amplicons et reflète donc la quantité d'ADNc de départ tant que l'efficacité d'amplification est maximale, c'est-à-dire que le nombre de molécules est doublé à chaque cycle. L'efficacité d'amplification est maximale pour les premiers cycles de PCR. Le cycle seuil Ct (ou treshold) correspond au cycle à partir duquel une fluorescence est mesurable au-delà du bruit de fond. On estime que l'efficacité d'amplification est maximale au Ct. La quantité relative d'ADNc de départ, correspondant au niveau de transcrits dans l'échantillon, est calculée avec la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Les valeurs de l'expression d'un gène d'intérêt sont d'abord normalisées par rapport aux valeurs d'expression de deux gènes de référence, choisis pour leur expression stable dans le matériel végétal utilisé. Les gènes de référence que nous avons utilisés sont *EXP*

(At4g26410), *GAPDH* (At1g13440), TIP41 (At4g34270) et Actine2 (At3g18780) chez *Arabidopsis thaliana* et ubiquitine chez *Vicia sativa*.

Le taux d'induction de la transcription du gène cible est ensuite calculé en effectuant le rapport de l'expression du gène cible dans l'échantillon X et l'expression du gène cible dans l'échantillon biologique de référence. Dans les cinétiques de blessure par exemple, l'expression du gène cible dans un échantillon de feuille blessée est rapportée à son expression dans une feuille non blessée.

Toutes les réactions sont réalisées trois fois. Une moyenne des taux d'induction de ces triplicats techniques est calculée.

2.14 Tests enzymatiques des CYP94s recombinants

L'activité enzymatique des cytochromes P450s est étudiée au laboratoire grâce à l'expression hétérologue de ces enzymes dans la souche WAT11 de *Saccharomyces cerevisiae*, système décrit par Denis Pompon (Pompon et al., 1996). La séquence codant pour le P450 est clonée dans le vecteur *pYeDP60*, puis la souche WAT11 de *S. cerevisiae* est transformée avec ce plasmide recombinant. Cette souche de levure exprime une cytochrome P450 réductase d'*Arabidopsis thaliana*, nécessaire à l'activité enzymatique du cytochrome P450 que l'on souhaite étudier. L'expression du P450 dans la levure est contrôlée via un promoteur inductible au galactose. Après induction de l'expression de la protéine, des fractions membranaires sont préparées pour tester ensuite, *in vitro*, les capacités enzymatiques du P450.

Les clonages des 6 *CYP94s* d'*Arabidopsis thaliana* dans le plasmide *pYeDP60* ont été réalisés dans notre laboratoire par Pascaline Ullmann selon la théorie décrite par Denis Pompon (Pompon et al., 1996).

2.14.1 Transformation de levure

2.14.1.1 Préparation de levures compétentes

Les levures sont mises en culture sur boîtes de milieu complet YPGA 3 à 4 jours avant la pré-culture pour obtenir des colonies. Puis 50 ml de milieu YPGA liquide (10 g/l bactopeptone 10 g/l yeast extract, 20 g/l glucose, 200 mg/l adénine) sontensemencés avec une colonie de levure puis incubés durant une nuit à 30 °C sous agitation horizontale. L'absorbance A_{600} est

alors mesurée et la culture est diluée pour obtenir 50 ml à une A_{600} égale à 0,2. La culture est ensuite placée à 30°C sous agitation pendant 5 h. Après 5 h, les levures sont centrifugées (5500g, 4 °C, 10 min) puis reprises dans 1,5 ml d'eau stérile pour 10 ml de culture de départ et aliquotées par volume de 1,5 ml. Les levures sont centrifugées 10 s avec une centrifugeuse de paillasse et le culot est repris dans 1,5 ml d'AcLi/TE (Acétate de Lithium 10,2 g/l, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM ; pH 7,5). Les levures sont à nouveau centrifugées 10 s, puis reprises dans 50 µl d'AcLi/TE.

2.14.1.2 Transformation

Trente minutes avant la fin des 5 h de culture des levures, l'ADN de sperme de saumon est dénaturé (100 µg/transfection, 20 min, 100 °C). Les 100 µg d'ADN de sperme de saumon ainsi que 1 à 2 µg de plasmide recombinant sont déposés dans un microtube de 1,5 ml puis les levures compétentes préparées (50 µl dans AcLi/TE) sont ajoutées. Ensuite, 500 µl de PEG4000 40 % dans AcLi/TE sont additionnés et le tout est incubé sur un agitateur rotatif (30 min, 30 °C) puis au bain marie (15 min, 42 °C). Finalement, le microtube est centrifugé (10 s, 1900g) et le culot repris dans 500 µl d'eau stérile. Après nouvelle centrifugation (10 s, 1900g) le culot est repris dans 100 µl d'eau stérile ou de milieu SGI (1 g/l « bactocasamino acids », 7 g/l « yeast nitrogen base without amino acids (Sigma)», 20 g/l glucose, 20 mg/l tryptophane) puis étalé sur milieu SGI solidifié par 20 g/l d'Agar DIFCO (2 étalements : 90 et 10 µl de levures transformées).

2.14.2 Expression de la protéine

Du milieu SGI liquide (30 ml) estensemencé avec une colonie isolée de levure transformée puis incubé (30 °C, agitation horizontale) pendant 18 h. Le lendemain, 5 à 8 ml de pré-culture (qui a atteint une A_{600} de 1) sont utilisés pour ensemenecer 200 ml de milieu YPGE liquide (10 g/l bactopeptone, 10 g/l Yeast extract, 5g/l glucose, 30 ml/l éthanol). Après 30 heures de culture (30 °C, agitation horizontale), les levures sont récoltées par centrifugation (10 min, 4000g) puis reprises dans 200 ml de YPI (milieu d'induction de l'expression du P450 et de la Cytochrome P450 réductase (10 g/l bactopeptone, 10 g/l Yeast extract, 20 g/l galactose). La culture est incubée 17 h (30 °C, agitation horizontale), puis les levures sont récoltées par centrifugation (7500g, 4 °C, 10 min). L'extraction des microsomes de levures exprimant le P450 peut alors être effectuée.

2.14.3 Préparation de microsomes de levure

Les cytochromes P450 sont généralement localisés dans le réticulum endoplasmique des cellules. Les microsomes sont des fractions membranaires enrichies en réticulum endoplasmique et obtenues par centrifugations successives. Nous utilisons ainsi des microsomes pour tester l'activité des cytochromes P450 *in vitro*.

Pour l'extraction des microsomes, les levures sont reprises dans 4 ml de tampon TES (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, sorbitol 600 mM) puis transférées dans un tube conique de 50 ml et broyées à l'aide de billes de verres de 0,5 mm de diamètre (agitation énergique à la main 10 fois 30 s avec 30 s de pause dans la glace entre 2 agitations). Le broyat est repris dans 60 ml de tampon TES puis une première centrifugation est effectuée (10 000g, 10 min, 4 °C). Le surnageant est transféré dans un tube d'ultracentrifugation et centrifugé (100 000g, 1 h, 4°C). Après avoir retiré le surnageant, le culot de microsomes obtenu est repris dans 1 à 3 ml de tampon TEG (Tris-HCl 50mM pH 7.5, EDTA 1mM, glycérol 30%) par homogénéisation avec un potter-Elvehjem puis réparti en fractions aliquotes conservées à -20 °C avant les tests enzymatiques.

2.14.4 Dosage des protéines totales des microsomes par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines totales dans la préparation de microsomes donne une indication de la concentration en protéines contenues dans les microsomes et permet de mieux comparer les activités de P450s provenant de différentes préparations de microsomes. Les microsomes sont dilués 2000 ou 4000 fois et une gamme de BSA (Albumine de sérum bovin) entre 2,5 et 20 mg/l est effectuée. Le réactif de Bradford permet de détecter les protéines par spectrophotométrie (A_{600}). Les quantités de protéines contenues dans les microsomes sont calculées à partir de la relation A_{600} /concentration de protéines de la gamme de BSA.

2.14.5 Incubations de microsomes avec des jasmonates

Afin d'étudier les capacités enzymatiques des CYP94s, les microsomes de levure exprimant des CYP94s ont été incubés avec des jasmonates. Afin de minimiser tout risque d'adsorption du substrat sur les parois du tube, les incubations sont réalisées dans des tubes à hémolyse en verre borosilicaté.

Un volume de 10 µl de substrat à 1 mM en solution dans le méthanol est d'abord déposé au fond du tube. Le méthanol est ensuite évaporé sous argon de manière à ne pas perturber la réaction. Puis un tampon phosphate de sodium (20 mM, pH 7,4) et 30 à 40 µl de microsomes sont ajoutés au tube de manière à ce que le volume final soit de 100 µl. La réaction a ensuite lieu dans un incubateur à 27 °C sous agitation pendant 25-30 min. La réaction est initiée par addition de NADPH (1 mM final) et stoppée par ajout de 200 µl d'acétonitrile contenant 0,2 % d'acide acétique. Pour chaque réaction, un contrôle sans NADPH est réalisé. Les produits d'incubation seront extraits avec de l'acétonitrile puis analysés par UPLC-MS/MS (voir paragraphe 2.15.2.2 et 2.15.3).

2.15 Analyses métaboliques

Des analyses métaboliques ont été réalisées par Chromatographie Liquide Ultra-Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (UPLC-MS) sur deux types d'échantillons : d'une part, pour identifier et quantifier les jasmonates dans des incubations enzymatiques et d'autre part, pour établir le profil quantitatif des jasmonates présents dans des échantillons de feuille ou de fleur.

L'UPLC-MS/MS permet de rechercher et quantifier des molécules connues pour lesquelles nous disposons de standards synthétiques. Cet instrument permet également la caractérisation de nouveaux composés de structure connue ou présumée, par exemple des produits de réaction formés dans les tests enzymatiques.

D'une part, les analyses par chromatographie liquide ne nécessitent pas de dérivation des jasmonates, ce qui est un avantage par rapport à la chromatographie gazeuse. D'autre part, la durée d'analyse de plus d'une quinzaine de molécules d'un échantillon est rapide, inférieure à 20 min. Ces caractéristiques nous ont permis d'analyser un grand nombre d'échantillons, notamment des séries d'échantillons provenant de cinétiques de blessure sur plusieurs génotypes de plantes.

2.15.1 Jasmonates de synthèse utilisés

Les molécules synthétiques ont été utilisées d'une part comme substrat lors de tests enzymatiques et d'autre part comme standards pour identifier et quantifier les produits de réaction ou les jasmonates extraits de plantes. Des composés synthétiques ont également été

utilisés pour des expériences de traitement de plantes. La structure des composés utilisés est présentée en figure 2-3.

2.15.1.1 Composés synthétiques issus de collaborations avec des chimistes

Différents jasmonates ont été synthétisés par Laurent Désaubry (Laboratory of Therapeutic Innovation, UMR7200, Illkirch, F-67401, France) et principalement en collaboration avec Laurence Miesch, chimiste dans l'équipe de Michel Miesch (Laboratoire de Chimie Organique Synthétique-UDS-CNRS UMR7177, Strasbourg F-67008, France). Plus particulièrement, la molécule de jasmonoyl-phénylalanine a été synthétisée par Clément Heinrich sous la direction de L. Miesch.

2.15.1.1.1 Standards internes

Les composés dhJA (9,10-dihydro-JA) et dhJA-Ile (9,10-dihydro-JA-Ile) ont été ajoutés comme standard interne dans la solution d'extraction employée pour extraire les jasmonates de plantes. Ces molécules correspondent respectivement au JA et au JA-Ile dont la double liaison (position 9,10) de la chaîne latérale a été réduite.

2.15.1.1.2 Jasmonates

Les jasmonates synthétiques utilisés, synthétisés à partir de méthyle jasmonate commercial, sont : JA-Ile (jasmonoyl-isoleucine), 12OH-JA-Ile, 12COOH-JA-Ile (synthèse complète décrite dans la publication Widemann et al. (2013), 12OH-JA (acide tubéronique), 12COOH-JA, JA-Phe (jasmonoyl-phénylalanine), JA-Tyr (jasmonoyl-tyrosine).

2.15.1.2 Composés commerciaux

D'autres composés synthétiques, commerciaux, ont été utilisés dans différentes expériences : JA (acide jasmonique), OPDA (acide 12-oxo-phytodiénoïque), C12:0 (acide dodécanoïque, acide laurique), ω OH-C12 (acide 12-hydroxy-dodécanoïque), diCOOH-C12 (acide dodécandioïque), C16:0 (acide hexadécanoïque, également appelé acide palmitique), ω OH-C16 (acide 16-hydroxy-hexadécanoïque), MeJA (méthyle jasmonate) (Sigma-Aldrich).

L'acide laurique radioactif $^{14}\text{C}12:0$ (ARC, American Radiolabeled Chemicals), utilisé pour les tests d'activité enzymatique *in vitro*, est marqué au ^{14}C au niveau de la fonction acide carboxylique ($^{14}\text{COOH}$).

2.15.1.3 Structures des composés utilisés

Les structures des composés de référence synthétisés dans le cadre d'une collaboration avec nos collègues chimistes et les composés commerciaux utilisés sont listés dans le tableau ci-dessous.

JASMONATES	
Nom	Structure
OPDA ; acide 12-oxo-phytodiénoïque	
JA ; acide jasmonique	
MeJA ; méthyle jasmonate	
12OH-JA ; acide tubéronique	
12COOH-JA	
dhJA ; 9,10-dihydro-JA	
dhJA-Ile ; 9,10-dihydro-JA-Ile	
JA-Ile ; jasmonoyl-isoleucine	

12OH-JA-Ile	
12COOH-JA-Ile	
12-HSO4-JA	
12-O-Glc-JA ; TA-Glc	
JA-Phe ; jasmonoyl-phénylalanine	
JA-Tyr ; jasmonoyl-tyrosine	
ACIDES GRAS	
Nom	Structure
C12:0 ; acide dodécanoïque ; (acide laurique)	
ω OH-C12 ; acide 12-hydroxy-dodécanoïque	
diCOOH-C12 ; acide dodécadioïque	

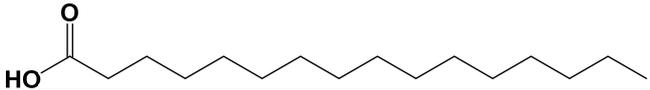
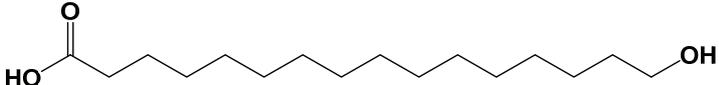
C16:0 ; acide hexadécanoïque ; (acide palmitique)	
ω OH-C16 ; acide 16-hydroxy- hexadécanoïque	

Figure 2-3 : Noms et structure des composés utilisés.

Tous les composés sont stockés à -20°C à l'exception du MeJA qui est stocké à 4°C . Les acides gras sont dissous dans l'éthanol et les jasmonates dans du méthanol.

2.15.2 Extraction de jasmonates

2.15.2.1 Extraction de jasmonates de feuille ou de fleur

En vue d'analyser les jasmonates de feuilles de plantes traitées ou de fleurs, un extrait méthanolique clarifié est préparé. Ce protocole simple a donné les meilleurs résultats parmi 4 procédures différentes testées au début de nos travaux.

Les tissus congelés sont pré-broyés avec une tige de verre pour obtenir une poudre. La poudre est introduite dans un tube de 2 ml à visser contenant des billes de verre (une quinzaine de billes de 1 mm de diamètre) puis re-congelée. Ces étapes sont réalisées en présence d'azote liquide pour ne pas décongeler les tissus. La masse exacte de poudre pesée, entre 130 et 150 mg, est notée afin de calculer le volume de solution d'extraction à ajouter. Pour les fleurs, on n'effectue pas de pré-broyage mais la masse précise de fleurs est notée au moment de la récolte. La proportion masse de l'échantillon et volume de solution d'extraction est la suivante : 150 mg de poudre pour 750 μl de solution. Nous avons choisi du méthanol 90% comme solvant d'extraction, car il est parfaitement miscible à l'eau et permet d'extraire efficacement les jasmonates des tissus.

Les composés synthétiques dhJA et dhJA-Ile (la liaison 9,10 est hydrogénée par rapport aux jasmonates endogènes) sont ajoutés comme standards internes dans la solution de méthanol 90%, à une concentration finale de 10 μM . On estime que les comportements des JA / dhJA et JA-Ile / dhJA-Ile sont similaires lors de l'extraction car les propriétés physico-chimiques de ces molécules saturées et insaturées sont très proches. Le signal obtenu pour chaque standard permet d'estimer les pertes des composés d'intérêt au cours de la procédure. Pour la quantification de l'acide salicylique, l'acide gentisique est ajouté comme standard dans la solution d'extraction (33 μM).

Une fois la solution d'extraction ajoutée à la poudre, les échantillons sont broyés (broyeur Precellys, 5500 rpm, 2 x 30 avec 30 s de pause) puis homogénéisés 25 min sur agitateur rotatif à 4°C. Une centrifugation (18,000g, 15 min, 4°C) permet de culoter les débris. Un volume de 450 µl de surnageant est ensuite prélevé puis concentré sous flux d'azote jusqu'à atteindre un volume de 200 µl. Après une nuit à -30°C, une dernière centrifugation (18,000g, 15 min, 4°C) élimine les précipités et le surnageant est transféré dans des vials pour être analysé par UPLC-MS/MS.

2.15.2.2 Extraction des jasmonates des milieux d'incubation de microsomes

Les jasmonates produits lors des incubations de microsome de levure exprimant les CYP94s sont extraits pour être identifiés par UPLC-MS/MS. Les mélanges milieu d'incubation de microsomes additionnés d'acétonitrile/acide acétique ajouté pour stopper la réaction sont homogénéisés à l'aide d'un vortex (20 secondes) puis les tubes à hémolyse sont centrifugés pour culoter les microsomes (10 min à 2000g). Le surnageant contenant les jasmonates est alors filtré (Millex^R-GV membrane PVDF 0,22 µm) et le filtrat est transféré dans un vial avant analyse par UPLC-MS/MS.

2.15.3 Analyse et caractérisation de jasmonates par UPLC-MS/MS

2.15.3.1 L'UPLC-MS/MS

Les jasmonates ont été analysés par UPLC-MS/MS ou UPLC-3Q-MS, chromatographie liquide ultraperformance (UPLC, Waters Mildorf, MA), équipé d'une source électrospray (ESI) et couplée à un spectromètre de masse triple quadrupolaire (Waters Quattro Premier XE). La chromatographie liquide ultraperformante permet de séparer finement les molécules de l'échantillon injecté en fonction de leur polarité et avec une forte résolution. A la sortie de la colonne, les molécules sont ionisées grâce à une source électrospray utilisée en mode positif ESI(+) ou négatif ESI(-), qui permettent généralement d'ajouter ou de retirer un proton H⁺ respectivement à la molécule de départ. Le spectromètre de masse permet ensuite de sélectionner les ions formés et éventuellement de les fragmenter. Un appareil permet de détecter finalement les ions sélectionnés puis un chromatogramme représentant l'intensité des signaux en fonction du temps de chromatographie est visualisable.

Le spectromètre de masse peut être utilisé avec différents modes d'analyse (figure 2-4).

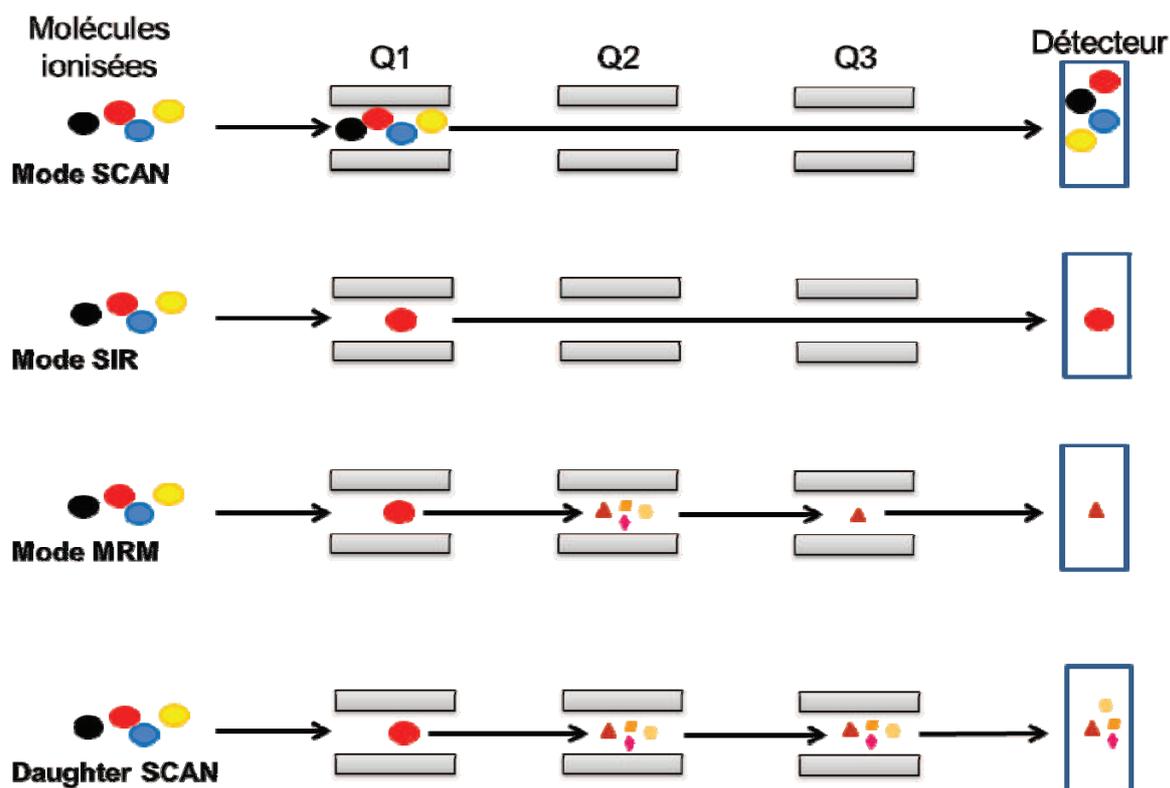


Figure 2-4 : Schéma illustrant différents modes d'utilisation du spectromètre de masse triquadrupolaire.

Le mode SCAN permet de détecter tous les ions d'un intervalle de masse/charge (m/z) choisi. Le mode SCAN est utilisé pour avoir une vue d'ensemble des composés majeurs du mélange injecté et permet également la détection d'ions de composés encore non identifiés. Si cette méthode présente l'avantage de visualiser énormément d'ions différents, elle est en revanche peu sensible.

Le mode SIR (Selected Ion Recording) est plus sensible puisqu'il sélectionne un ion de m/z précis, ce qui réduit le bruit de fond.

Enfin, le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) est la méthode la plus spécifique et la plus sensible pour identifier et quantifier un composé connu. Cette méthode que nous avons abondamment utilisée est très puissante car elle permet d'identifier avec une grande confiance et de quantifier précisément des composés particuliers dans une matrice complexe de plante, sans fractionnement préalable. Pour la méthode MRM, un ion « parent » de m/z spécifique est d'abord sélectionné par le premier quadripôle (Q1). Puis le deuxième quadripôle (Q2) est activé et agit comme cellule de collision dans laquelle l'ion parent sélectionné va être

fragmenté. Cette fragmentation produit des ions « fils ». Un ion fils spécifique peut ensuite être sélectionné par le troisième quadropôle (Q3). La sélection d'un ion parent puis d'un ion fils rend la méthode MRM très spécifique. La transition MRM d'une molécule s'écrit :

$$m/z \text{ de l'ion parent} > m/z \text{ de l'ion fils}$$

Afin de mettre au point la transition MRM d'une molécule, un daughter-SCAN est pratiqué pour visualiser l'ensemble des ions fils produits à partir de l'ion parent sélectionné. Ceci permet de choisir l'ion fils le plus abondant après fragmentation de l'ion parent (avec une énergie de collision précise) et d'optimiser la transition MRM. Des exemples de mise au point de transitions MRM sont détaillés dans les résultats (partie 3) pour les composés oxydés de JA-Phe.

2.15.3.2 Les méthodes d'analyse utilisées

Les jasmonates issus de plantes et d'incubations enzymatiques ont été analysés par UPLC-MS/MS.

Entre 3 et 5 μL d'échantillon sont injectés. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Acquity UPLC BEH C18 (100×2.1 mm, particules de 1.7 μm ; Waters) équipée d'une pré-colonne. La phase mobile est composée d'eau (solvant A) et de méthanol (solvant B) contenant chacun 0,1% d'acide formique. La séparation commence par 2 min à 95% de A, puis un gradient linéaire est appliqué jusqu'à atteindre 100% de B à 12 min. Entre 12 et 14 min, 100% de B sont maintenus. Le retour aux conditions initiales est atteint en 3 min. La durée totale du run est de 17 min. La température de la colonne est de 35°C et le débit de 0,35 ml/min. La colonne permet l'élution séquentielle des métabolites par la phase mobile sur la base de leur polarité. Sur cette colonne en phase inverse, les métabolites les plus polaires seront les premiers à être élués.

Une source électrospray est utilisée pour ioniser les molécules. De l'azote est utilisé comme gaz asséchant et pour la nébulisation. Le flux de gaz pour nébuliser est fixé à 50 l/h et le flux de gaz pour la désolvatation est paramétré à 900 l/h. La température de l'interface est fixée à 400°C et celle de la source à 135°C. Le voltage du capillaire est fixé à 3,4 kV. Pour toutes les expériences MS, la tension de cône est fixée à 25 V. Pour les expériences MS/MS (MRM et daughter SCAN), la tension de cône et l'énergie de collision ont été testées entre 8 V et 32 V

puis les valeurs optimales ont été sélectionnées pour chaque composé selon le ratio signal sur bruit.

Les transitions MRM utilisées sont présentées dans la figure 2-5.

Composé	Temps de rétention (min)	ES+	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)	ES-	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)
12CO-JA-Ile	8,43	338.2 > 132.1	16	16			
12CO-JA-Phe	8,6	372 > 166	22	14			
12COOH-JA	6,49	241 > 117.2	16	16			
12COOH-JA-Ile	8,39				352 > 130	25	23
12COOH-JA-Phe	8,6	388 > 120	22	35			
12-HSO4-JA	5,72				305.2 > 97	30	32
12-O-Glc-JA	6,22	227.1 > 149.1	24	16	387 > 206.8	25	20
12OH-JA	6,56				225 > 59	25	25
12OH-JA-Ile	8,44				338 > 130	25	23
12OH-JA-Phe	8,63	374 > 120	22	28			
acide gentisique	4,88	154,8 > 137	21	14			
dhJA	9,8	213 > 153	25	20			
dhJA-Ile	10,6	326 > 280	25	20			
dhJA-Ile	10,6	326 > 85.9	24	24			
IAA	7,46	176 > 130	20	17			
IAA-Ala	7,07	247 > 130	25	17			
Ile	1,66	132.2 > 85.7	15	10			
JA	9,19				209 > 59	25	23
JA-Ile	10,28	324 > 151	25	20			
JA-Phe	10,28	358.15 > 119.9	25	32	356.2 > 163.9	49	17
JA-Tyr	8,92	374.1 > 151	25	17			
OPDA	11,42	293.4 > 275.3	25	15			
SA	7,97				137 > 93	25	16
JA-Ile-MeOX	10,97	353>322	24	8			
12CO-JA-Ile-2MeOX	10,18	396>365	24	8			

Figure 2-5 : Temps de rétention et méthodes MRM des composés analysés par UPLC-MS/MS.

2.15.3.3 La méthyoxamination pour identifier des fonctions aldéhydes

La méthyoxamination est une méthode de dérivation chimique mettant en évidence les fonctions carbonyles d'une molécule. En effet, en présence de méthyoxamine hydrochloride, le groupement carbonyle d'une fonction aldéhyde ou cétone est remplacée par un groupement NOCH₃. Cette dérivation correspond à l'ajout d'une masse de 29 sur la molécule de départ et modifie son temps de rétention, ce qui permet de différencier la molécule dérivatisée de la molécule non-dérivée par UPLC-MS. Cette dérivation est spécifique car elle ne s'applique pas aux fonctions carboxyles. Nous avons utilisé cette méthode de dérivation pour identifier de nouvelles molécules portant une fonction aldéhyde, 12CO-JA-Ile et 12CO-JA-Phe. L'identification de 12CO-JA-Ile par cette méthode est décrite dans une publication soumise au journal *Metabolomics* (partie 3 des résultats) et celle de 12CO-JA-Phe est détaillée dans la partie 3 des résultats.

Le protocole de réaction chimique de dérivation que nous avons utilisé est adapté de la publication de Di Donna et al. (2013). Une solution de méthyoxamine hydrochloride est préparée à 126 mg/ml dans de l'eau dé-ionisée, traitée aux UV et filtrée (0,22 µm). Les échantillons sont dérivatisés par ajout de la solution de méthyoxamine hydrochloride dans des proportions 84 :16 (v/v) afin d'obtenir une concentration finale de méthyoxamine d'environ 20 mg/ml. Les échantillons sont agités à 900 rpm pendant 90 min à 40°C avant analyse UPLC-MS.

2.15.3.4 Le logiciel MassLynx

Le logiciel MassLynx (Waters, Mildorf, MA) permet d'acquérir, de visualiser et d'exploiter les données générées par l'UPLC-MS/MS. Le signal détecté par le détecteur est présenté sous forme de chromatogramme, avec l'intensité du signal en fonction du temps d'élution. Pour les analyses en mode MRM, la partie QuanLynx du logiciel MassLynx permet une intégration automatique de l'aire des pics des chromatogrammes obtenus. Connaissant le temps de rétention de la molécule d'intérêt, on demande au logiciel de rechercher dans le chromatogramme un pic à ce temps de rétention et de l'intégrer. Cette automatisation étant plus ou moins efficace, il est tout de même nécessaire de vérifier la présence de pic et son intégration correcte pour chaque chromatogramme. La valeur d'aire sous le pic obtenue peut ensuite être exportée dans excel pour le calcul des concentrations de jasmonates de l'échantillon.

2.15.4 Calculs des concentrations de jasmonates de l'échantillon

L'aire de chaque pic du chromatogramme est représentative de l'abondance de la molécule dans l'échantillon. Cependant, l'efficacité de détection d'un composé par l'UPLC-MS/MS est spécifique à chaque molécule, notamment en fonction de la qualité de son ionisation. Une même valeur d'aire peut correspondre, selon les composés, à des abondances très différentes dans l'échantillon. Pour cette raison, l'aire obtenue doit être corrigée par l'efficacité de détection. Pour ceci, le composé synthétique est injecté à différentes concentrations. On obtient ainsi une droite de gamme étalon indiquant l'aire détectée y en fonction de la concentration x du composé.

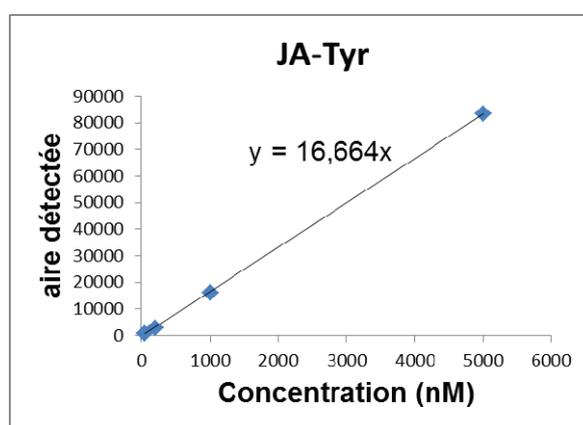


Figure 2-6 : Gamme étalon établissant la relation entre aire détectée et concentration du composé.

Le coefficient directeur de la droite permet ainsi de calculer la concentration du composé dans l'échantillon injecté à partir de l'aire du pic intégré.

L'échantillon injecté est issu de plusieurs étapes de préparation (extraction des jasmonates décrite paragraphe 2.15.2.). La concentration du composé dans l'échantillon injecté doit donc être corrigée par les variations liées à l'extraction. Les standards dhJA-Ile et dhJA, présents dans le solvant utilisé pour l'extraction, subissent également toutes les étapes de préparation de l'échantillon. La comparaison de la quantité de standard dans le solvant utilisé pour l'extraction et la quantité de standard détectée dans l'échantillon extrait injecté permet de calculer le rendement d'extraction pour chaque échantillon.

Un autre paramètre à prendre en compte pour connaître la concentration des composés dans l'échantillon de plante avant extraction est l'étape d'évaporation de l'échantillon sous azote, à l'issue de laquelle l'échantillon est concentré 2,25 fois. Les standards de la solution d'extraction sont donc aussi concentrés 2,25 fois lors de cette étape.

Par ailleurs, pour exprimer la concentration de jasmonates par gramme de poids frais, le rapport volume de solvant d'extraction/masse d'échantillon (en proportion 750 µl pour 150 mg, soit 1 l pour 200 g) est pris en compte.

Finalement, le calcul appliqué pour connaître la concentration d'une molécule de jasmonates au départ dans l'échantillon de plante (en nmol/g de poids frais) est :

Aire JA échantillon extrait

$$\frac{\text{aire dhJA échantillon extrait}}{2,25 \times \text{aire dhJA solvant d'extraction}} \times \text{coefficient directeur de la droite de la gamme étalon} \times 2,25 \times 200$$

2.16 Statistiques

Des analyses statistiques ont été effectuées par Yann Aubert. Des tests ANOVA à deux facteurs suivis de corrections de Bonferroni ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism version 5.01.

RESULTATS

RESULTATS partie 1 :
Catabolisme de JA-Ile et homéostasie
de jasmonates au cours de la réponse
à la blessure

3 CATABOLISME OXYDATIF DE JA-ILE PAR LES CYTOCHROMES P450 DE LA FAMILLE CYP94 LORS DE LA BLESSURE MECANIQUE

3.1 Introduction

Le métabolisme des jasmonates est fortement stimulé par une blessure mécanique ou par des herbivores au niveau des feuilles (Chung et al., 2008; Glauser et al., 2008). De manière cohérente avec le rôle majeur des jasmonates dans les réponses induites, les niveaux de JA-Ile sont contrôlés dynamiquement. Son accumulation est transitoire (Glauser et al., 2008), suggérant l'existence de mécanismes de modifications pouvant éliminer rapidement l'hormone active dans les cellules stimulées, lorsque la signalisation doit être atténuée. Nous avons proposé que les formes oxydées de JA-Ile, les 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile accumulés après blessure (Glauser et al., 2008), pourraient être des produits formés par des P450s et que ces oxydations correspondraient à une inactivation de l'hormone.

CYP94C1 a été caractérisée préalablement dans notre laboratoire comme une ω -hydroxylase d'acides gras catalysant la carboxylation du méthyle terminal de la chaîne aliphatique via un intermédiaire hydroxyle (Kandel et al. (2007) et figure 1-5). Or JA-Ile est synthétisée à partir d'acides gras (C16 :3 ou C18:3) et la chaîne latérale aliphatique de la partie JA du conjugué JA-Ile correspond à l'extrémité ω de l'acide gras précurseur. Nous avons donc émis l'hypothèse que CYP94C1 pourrait catalyser la formation de 12OH-JA-Ile et/ou de 12COOH-JA-Ile (figure 3-1).

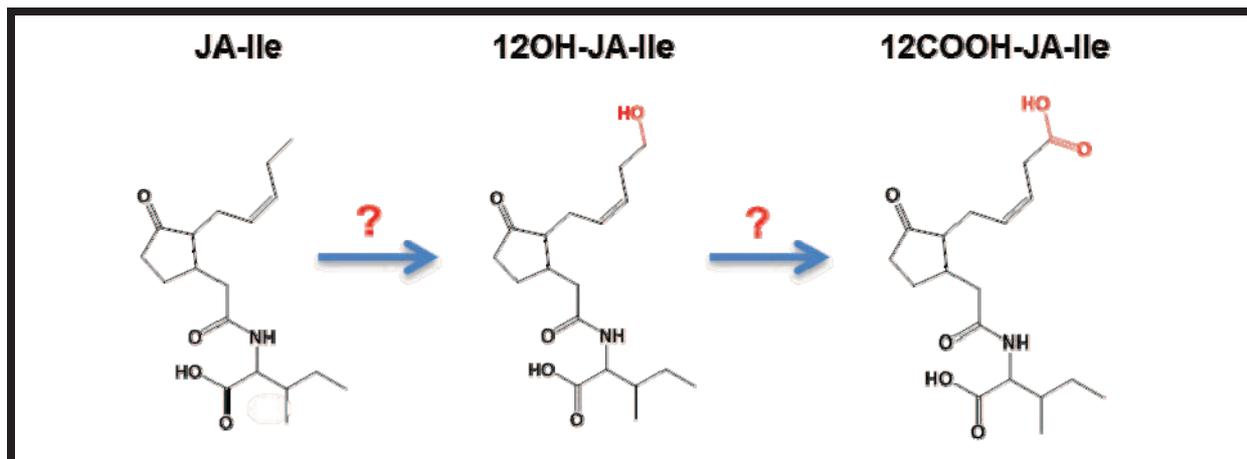


Figure 3-1 : Hypothèse de l'inactivation de JA-Ile par oxydation. L'hormone pourrait être hydroxylée en position ω puis carboxylée au niveau du carbone terminal de la chaîne latérale par CYP94C1.

De plus, la recherche de gènes d'enzymes dont l'expression est co-régulée avec celle de gènes impliqués dans la voie JA (données de centaines de microarrays disponibles sur Expression Angler, Toufighi et al. (2005)) a permis de mettre en évidence que l'expression du cytochrome P450 *CYP94C1* est co-régulée avec celle de plusieurs gènes de biosynthèse de JAs (figure 3-2).

	Gène	Valeur R
Bait :	CYP94C1	1
	
	Disease resistance	0,955
	
	OPR3	0,931
	
	LOX3	0,910
	OPCL1	0,907
	ILL6	0,901
	
	AOC3	0,895
	
	JAZ6	0,886

Figure 3-2 : L'expression du gène *CYP94C1* est co-régulée avec celles de gènes de biosynthèse de jasmonates. Les gènes *OPR3*, *LOX3*, *OPCL1* et *AOC3* codent pour des enzymes de biosynthèse de JAs. Le gène du répresseur *JAZ6* est induit par la blessure. D'après des données de microarray disponibles sur le serveur Expression Angler http://bbc.botany.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi.

Nous avons développé une panoplie d'outils génétiques, enzymologiques et analytiques pour permettre l'analyse fonctionnelle des CYP94s et l'étude de leur implication dans le métabolisme oxydatif de l'hormone JA-Ile.

3.2 Publication : Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone Jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover (Heitz et al., 2012)



jbc The Journal of
Biological Chemistry
AFFINITY SITES

ASBMB
American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Plant Biology:
**Cytochromes P450 CYP94C1 and
CYP94B3 Catalyze Two Successive
Oxidation Steps of Plant Hormone
Jasmonoyl-isoleucine for Catabolic
Turnover**



Thierry Heitz, Emilie Widemann, Raphaël
Lugan, Laurence Miesch, Pascaline Ullmann,
Laurent Désaubry, Emilie Holder, Bernard
Grausem, Sylvie Kandel, Michel Miesch,
Danièle Werck-Reichhart and Franck Pinot

J. Biol. Chem. 2012, 287:6296-6306.

doi: 10.1074/jbc.M111.316364 originally published online January 3, 2012

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M111.316364](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316364)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2012/01/03/M111.316364.DC1.html>

This article cites 46 references, 15 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/287/9/6296.full.html#ref-list-1>

Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 Catalyze Two Successive Oxidation Steps of Plant Hormone Jasmonoyl-isoleucine for Catabolic Turnover[§]

Received for publication, October 21, 2011, and in revised form, December 30, 2011. Published, JBC Papers in Press, January 3, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.316364

Thierry Heitz^{1,1}, Emilie Widemann^{4,5,2}, Raphaël Lugañ⁵, Laurence Miesch⁶, Pascaline Ullmann⁵, Laurent Désaubry^{||}, Emilie Holder¹, Bernard Grausem⁵, Sylvie Kandel⁹, Michel Miesch⁴, Danièle Werck-Reichhart⁵, and Franck Pinot⁵

From the ¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche 2357 CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France, the ²Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche 2357 CNRS, Université de Strasbourg, 28 rue Goethe, 67083 Strasbourg Cedex, France, the ³Laboratoire de Chimie Organique Synthétique, Institut de Chimie, Unité Mixte de Recherche 7177, Université de Strasbourg, CNRS, 1 rue Blaise Pascal 67008 Strasbourg Cedex, France, and the ⁴Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Unité Mixte de Recherche 7200, Université de Strasbourg, CNRS, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France

Background: Oxidized derivatives of the plant hormone jasmonoyl-isoleucine accumulate in wounded *Arabidopsis* leaves.

Results: Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 cooperate to catalyze the formation of 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile.

Conclusion: CYP94C1 and CYP94B3 define a major route for JA-Ile catabolism.

Significance: Elucidation of CYP94-mediated JA-Ile oxidation opens new avenues for understanding jasmonate metabolism and signaling.

The jasmonate hormonal pathway regulates important defensive and developmental processes in plants. Jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) has been identified as a specific ligand binding the COI1-JAZ co-receptor to relieve repression of jasmonate responses. Two JA-Ile derivatives, 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile, accumulate in wounded *Arabidopsis* leaves in a COI1- and JAR1-dependent manner and reflect catabolic turnover of the hormone. Here we report the biochemical and genetic characterization of two wound-inducible cytochromes P450, CYP94C1 and CYP94B3, that are involved in JA-Ile oxidation. Both enzymes expressed in yeast catalyze two successive oxidation steps of JA-Ile with distinct characteristics. CYP94B3 performed efficiently the initial hydroxylation of JA-Ile to 12OH-JA-Ile, with little conversion to 12COOH-JA-Ile, whereas CYP94C1 catalyzed preferentially carboxy-derivative formation. Metabolic analysis of loss- and gain-of-function plant lines were consistent with *in vitro* enzymatic properties. *cyp94b3* mutants were largely impaired in 12OH-JA-Ile levels upon wounding and to a lesser extent in 12COOH-JA-Ile levels. In contrast, *cyp94c1* plants showed wild-type 12OH-JA-Ile accumulation but lost about 60% 12COOH-JA-Ile. *cyp94b3cyp94c1* double mutants hyperaccumulated JA-Ile with near abolition of 12COOH-JA-Ile. Distinct JA-Ile oxidation patterns in different plant genotypes were correlated with specific JA-responsive transcript profiles, indicating that JA-Ile oxidation status affects signaling. Interestingly, exaggerated JA-Ile levels were associated with JAZ repressor hyperinduction but did not enhance durably defense gene induction, revealing a novel negative feedback signaling loop. Finally, interfering with *CYP94* gene

expression affected root growth sensitivity to exogenous jasmonic acid. These results identify CYP94B3/C1-mediated oxidation as a major catabolic route for turning over the JA-Ile hormone.

Hormonal control is of crucial importance for plant development and their adaptation to ever changing environmental conditions (1, 2). Molecular genetics combined with biochemical and metabolic approaches have revealed major actors and mechanisms in the biosynthesis, perception, and cellular signaling of several plant hormones. As hormonal responses are orchestrated in a temporal and spatial manner, homeostasis of active compounds requires tight control of both biosynthetic and catabolic processes. Plant hormonal metabolism largely involves cytochrome P450 (CYP)³ enzymes to either activate or inactivate a wide range of compounds (3). CYPs form an important family of heme-containing oxygenases that catalyze a wide variety of monooxygenation/hydroxylation reactions in primary and secondary metabolism (4). CYP-catalyzed enzymatic conversions are, therefore, important regulatory points in hormonal pathways (3), and accordingly, misexpression of CYPs in both biosynthetic and catabolic steps perturbs hormone homeostasis and provokes serious plant development defects. For example, overexpression of CYP707 ABA-8'-hydroxylases depletes ABA pools upon germination, resulting in seed hyperdormancy (5). Severe growth defects were observed when overexpressing brassinolide- or gibberellin-oxidizing CYP enzymes (6, 7).

Jasmonic acid (JA) is a well characterized fatty acid-derived hormone playing prominent roles in the reproduction of plants and in their responses to attacks by insects or microbial patho-

[§] This article contains supplemental Figs. S1–S4 and Table S1.

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: 33-388614442; E-mail: thierry.heitz@ibmp-cnrs.unistra.fr.

² Supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

³ The abbreviations used are: CYP, cytochrome P450; JA, Jasmonic acid; UPLC, ultra performance liquid chromatography; OPDA, 12-oxo-phytyldienoic acid.

gens (8–11). Significant advances in the knowledge of JA biosynthesis, perception, and signaling has been recently gained, whereas in contrast, our understanding of the termination of the hormonal signal lags behind (8, 12–14). JA-related compounds are common in plants and are collectively referred to as jasmonates (14). JA is a prohormone that needs to be activated by conjugation to isoleucine by the enzyme JAR1. The resulting JA-isoleucine conjugate (JA-Ile) promotes the assembly of a co-receptor composed of the F-box protein CO11 and members of the family of JAZ proteins (15, 16). JAZ proteins are transcriptional repressors that under low JA-Ile levels prevent transcription of JA-responsive genes (17). Upon JA-Ile binding to the receptor, the JAZ repressors undergo ubiquitination by the SCF^{CO11} E3 ubiquitin ligase and are targeted for proteolytic degradation by the 26 S proteasome, resulting in the de-repression of downstream responses (18, 19).

Jasmonate metabolism is strongly stimulated upon mechanical wounding or herbivory in *Arabidopsis* leaves (20, 21). Consistent with its role as a major regulator of induced defense responses, the levels of JA-Ile are controlled dynamically, suggesting the existence of a modification mechanism(s) that rapidly clears the active hormone from stimulated cells when JA signaling must be switched off. Among the numerous wound-induced jasmonates are the hydroxylated derivatives 12OH-JA (known as tuberonic acid) and 12OH-JA-Ile (21–23). In addition, a more oxidized, dicarboxy derivative, 12COOH-JA-Ile, was described recently (Ref. 21; Fig. 1A). Such oxidative conversions likely reflect critical changes in the biological activity of jasmonates as; for example, tuberonic acid has biological properties that are distinct from those of JA (22). The widespread occurrence of oxidized jasmonates raises the questions of the genes/enzymes involved in their formation and of which conversion routes are predominant *in planta*. For example, JAR1 is essentially inactive in conjugating 12OH-JA to Ile (24); therefore, 12OH-JA-Ile formation likely occurs by oxidizing JA-Ile. In addition to being an intermediate for further oxidation to 12COOH-JA-Ile, 12OH-JA-Ile may represent an alternative source of unconjugated hydroxylated jasmonates. Enzymatic oxidation of the terminal ω -carbon of an aliphatic chain is a typical feature of the action of a subclass of CYP enzymes, acting usually as fatty acid ω -hydroxylases (25). We describe in this paper the involvement of two *Arabidopsis* CYP genes of the CYP94 family in the wound-induced accumulation of hydroxylated and di-carboxylated JA-Ile. Two recent reports have identified CYP94B3 as a JA-Ile-12-hydroxylase (26, 27), accounting for most of 12OH-JA-Ile accumulating in damaged leaves. Here we used a combination of genetic, enzymatic, and metabolic approaches to show that CYP94C1, a second wound-responsive member of this subclade, is the main enzyme for JA-Ile carboxylation and that deficiency in the two oxidases in the double mutant *cyp94b3cyp94c1* prevents the accumulation of 12COOH-JA-Ile. These results highlight the critical role of two CYP94 enzymes in oxidative turnover of the JA-Ile hormone.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Growth and Treatments—*Arabidopsis thaliana* genotypes used were all in the Col0 ecotype and were grown under a 12-h/12-h photoperiod in a growth chamber. T-DNA insertion

lines used were: *coi1-1*, *jar1-1*, *cyp94c1-1* (SALK_55455) and *cyp94b3-1* (CS302217), all obtained from the Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC). For generating RNAi lines, a CYP94C1 cDNA fragment (nucleotides 451–750) was PCR-amplified and cloned in both orientations in the pFGC5941 vector. Overexpressing lines were generated by cloning the CYP94C1 ORF successively in the Gateway (Invitrogen) vectors pDONR207 and pB7WG2 downstream of the cauliflower mosaic virus 35 S 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 4 and 6 fully expanded leaves of 6–7-week-old plants were wounded 3 times across the midvein with a hemostat. At increasing time points after mechanical damage, leaf samples were quickly harvested and flash-frozen in liquid nitrogen before storing at -80°C until use.

For root growth inhibition assays, surface-sterilized seeds were sown on square plates with sucrose-containing (1%) Gamborg B5 medium supplemented or not with JA. Plates were incubated for 48 h at 4°C and then vertically under standard growth conditions for the remainder of the experiment. Root length was measured 11 days later using the simple neurite tracer tool of Fiji software.

RT-Quantitative PCR Gene Expression Assays—Total RNA was extracted from plant leaves with TRIzol reagent (Molecular Research Center). 1 μg of RNA was reverse-transcribed using the ImProm-II reverse transcription system (Promega, Madison, WI). Real-time PCR was performed on 10 ng of cDNA as described in Berr *et al.* (28) using a LightCycler 480 II instrument (Roche Applied Science). The housekeeping genes *EXP* (At4g26410) and *GAPDH* (At1g13440) were used as internal references. Gene-specific primer sequences used for quantitative PCR are listed in supplemental Table S1.

Recombinant CYP94 Protein Production and Enzymatic Assays—For functional expression of CYP94C1 and CYP94B3 we used a yeast expression system specifically developed for the expression of P450 enzymes. Coding sequences were amplified from an *Arabidopsis* genomic library and were cloned in the plasmid pYeDP60 and introduced into *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 strain. Yeast has only three cytochromes P450, which are expressed at a negligible level under growth condition used. Yeast cultures were grown and cytochrome P450 expression was induced as described in Pompon (29). 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 EDTA and 600 mM sorbitol. The homogenate was centrifuged for 10 min at $10,000 \times g$. The resulting supernatant was centrifuged for 1 h at $100,000 \times g$. 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 is proportional to the weight of 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 $0-4^{\circ}\text{C}$. The cytochrome P450 content was measured by the method of Omura and Sato (30). For determination of enzymatic activities, the

Dual Jasmonoyl-isoleucine Oxidation by CYP94 Enzymes

standard assay (0.1 ml) contained yeast microsomes with 0.22 nmol of cytochrome P450 in 20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 1 mM NADPH, and substrate (100 μ M). The reaction was initiated by the addition of NADPH and was stopped after 20 min by the addition of 150 μ l of methanol. The mixture was centrifuged for 1 min at 2000 \times g, and the supernatant was cleared by filtration through a 0.22- μ m filter. Metabolites in incubation media were directly analyzed by UPLC-MS/MS as described below.

Jasmonate Profiling—Jasmonates were identified and quantified in plant extracts and enzymatic incubations by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) using MS transitions determined from pure standards (JA-Ile and 12OH-JA-Ile) or published data (21). The synthesis of jasmonic derivatives will be reported as a full paper in a more specialized journal. The relative quantification in samples was achieved by reporting MS peak areas relative to internal standard peak area and mass of biological material. Absolute quantifications of JA-Ile and 12OH-JA-Ile were determined by comparison of sample signal with dose-response curves established with pure compounds. For plant extraction, five volumes of ice-cold 90% methanol containing 9,10-dihydro-JA-Ile as an internal standard were added to one fresh weight (100–150 mg preweighed) of frozen leaf powder in a screw-capped tube containing glass beads. Material was ground twice for 30 s with a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-Le-Bretonneux, France). Homogenates were cleared by two successive centrifugations at 20,000 \times g, and supernatants were saved for UPLC-MS analysis. All analyses were performed using a Waters Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA) equipped with an electrospray ionization source and coupled to an Acquity UPLC system (Waters). Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 \times 2.1 mm, 1.7 μ m; Waters) and precolumn. The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B), both containing 0.1% formic acid. The run started by 2 min of 95% A, then a linear gradient was applied to reach 100% B at 12 min followed by isocratic run using B during 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 $^{\circ}$ C with a flow rate of 0.35 ml/min, injecting 3- μ l samples. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. The nebulizer gas flow was set to 50 liters/h, and the desolvation gas flow was set to 900 liters/h. The interface temperature was set to 400 $^{\circ}$ C, and the source temperature was set to 135 $^{\circ}$ C. The capillary voltage was set to 3.2 kV, cone voltage was set 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. Data acquisition and analysis were performed with the MassLynx software. The transitions were, in negative mode, 12-OH-JA-Ile 338 > 130 and 12-COOH-JA-Ile 352 > 130, and in positive mode, JA-Ile 324 > 151. Collision energy was 20 V.

RESULTS

JA-Ile Oxidative Turnover Correlates with CYP94 Gene Expression upon Wounding and Is COI1- and JAR1-dependent—Plant hormone oxidation, essentially through hydroxylation,

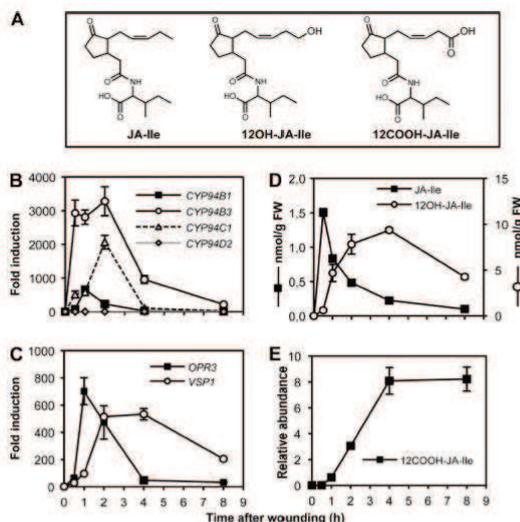


FIGURE 1. *CYP94B1*, *CYP94B3*, and *CYP94C1* gene expression precedes the accumulation of 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile upon wounding in *Arabidopsis* wild-type leaves. **A**, structures of JA-Ile, 12OH-JA-Ile, and 12COOH-JA-Ile are shown. **B** and **C**, real-time PCR analysis of the expression of *CYP94*, *OPR3* and *VSP1* genes in mechanically wounded leaves is shown. Expression is represented as -fold induction relative to level at time 0 that was set to 1 for each gene. Expression was normalized with two reference genes. **D**, shown is the time course of JA-Ile and 12OH-JA-Ile accumulation in wounded leaves. Samples from the same plants as used in **B** were extracted for jasmonate determination by LC/MS. Note that 12OH-JA-Ile levels are expressed in a specific scale on the right of graph. **FW**, fresh weight. **E**, time course of 12COOH-JA-Ile accumulation in wounded leaves is shown. All analyses are the means \pm S.E. from three biological samples.

has been reported to be catalyzed by cytochrome P450 enzymes in several cases (3). We hypothesized that formation of 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile in wounded tissue could possibly be accounted for by enzymes of the CYP94 family, based on two conclusions from our previous work on *CYP94C1* (31). First, the *CYP94C1* gene was found to be transiently induced by mechanical wounding and by methyl-JA treatment in *Arabidopsis* leaves. Second, the *CYP94C1* enzyme, when prepared as microsomes from recombinant yeast cells, displayed the unique capacity of catalyzing the formation of ω -hydroxy and dicarboxylic derivatives of linear fatty acids, particularly lauric acid (C12:0). The two novel JA-Ile derivatives are also oxidized on the terminal, 12th carbon of the jasmonate moiety (Fig. 1A). By mining genome-wide public expression databases (32, 33), we found that three *CYP94* genes, *CYP94B1* (At5g63540), *CYP94B3* (At3g48520), and *CYP94C1* (At2g27690), are wound- and JA-inducible. In addition, three other genes, *CYP94B2* (At3g01900), *CYP94D1* (At1g34540), and *CYP94D2* (At3g56630), belong to the *Arabidopsis* CYP94 subfamily that branches closest to the CYP86 subfamily of fatty acid hydroxylases (25, 27).

To investigate the possible relevance of *CYP94* gene expression to JA-Ile oxidation, we monitored the temporal expression of all six *CYP94* genes and the levels of JA-Ile and its two oxidized derivatives in a kinetic analysis of wounded leaves (Fig. 1).

CYP94B2 and *CYP94D1* expression was undetectable, and *CYP94D2* displayed a weak and constant expression in wounded tissues (Fig. 1B). In contrast, *CYP94B1*, *CYP94B3*, and *CYP94C1* were expressed at very low levels in non-stimulated leaves and exhibited a massive and transient induction concomitant with the JA biosynthetic gene *OPR3* whose expression precedes induction of the late wound response gene *VSP1* (compare Fig. 1, B and C). *CYP94B3* transcripts showed the most ample burst, with high transcript levels maintained between 0.5 to 2 h post-wounding, whereas *CYP94B1* and *CYP94C1* displayed sharp expression peaks at 1 and 2 h, respectively. Jasmonate conjugates were then quantified by LC-MS/MS in the corresponding plant samples. As expected, JA-Ile and its derivatives were essentially undetectable in unstressed leaves (Fig. 1, D and E). JA-Ile accumulation rose very rapidly to maximal levels at 0.5 h. Its decline was accompanied by a concomitant accumulation of 12OH-JA-Ile that peaked at 4 h before decreasing slowly (Fig. 1D). The levels of 12COOH-JA-Ile were found to increase even later, peaking between 4 and 8 h post-wounding (Fig. 1E), in accordance with a previous report (21). Taken together, these results indicate a clear correlation between the expression of 3 *CYP94* genes and the oxidative turnover of JA-Ile upon wounding.

We then examined *CYP94* gene expression and accumulation of oxidized JA-Ile derivatives in *jar1* and *coi1* mutants affected in the JA pathway. The expression of all three *CYPs*, *CYP94B1*, *CYP94B3*, and *CYP94C1*, was nearly abolished in *coi1* (supplemental Fig. S1A, left panels). This was accompanied by a strong reduction in 12OH-JA-Ile and by a near suppression of 12COOH-JA-Ile (supplemental Fig. S1B, left panels) compared with WT plants. Consistent with earlier studies reporting reduced JA-Ile turnover in tobacco or tomato *coi1* mutants (23), JA-Ile accumulated to high levels despite of low JA precursor (supplemental Fig. S1B, left panels). In *jar1*, *CYP94* expression was only moderately depressed compared with WT (supplemental Fig. S1A, right panels), but the two oxidized JA-Ile derivatives were at very low levels, probably because of the limited availability of JA-Ile substrate (supplemental Fig. S1B, right panels). Altogether, these results support the simple hypothesis that most 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile directly derive from JAR1-generated JA-Ile through the COI1-dependent expression of *CYP94* enzymes.

***CYP94C1* and *CYP94B3* Specifically Catalyze Two Successive Oxidation Steps of JA-Ile**—To directly assess the involvement of the candidate *CYP94s* in the formation of oxidized JA-Ile, biochemical studies of *CYP94C1* and *CYP94B3* were conducted after heterologous expression in yeast. Fig. 2 shows LC-MS/MS chromatograms obtained after incubation of JA-Ile with microsomes from yeasts expressing *CYP94C1* (Fig. 2A, panels a–f) or *CYP94B3* (Fig. 2A, panels g–l). After 20 min in presence of NADPH, 12OH-JA-Ile (Fig. 2A, panel e) and 12COOH-JA-Ile (Fig. 2A, panel f) were detected in incubations performed with microsomes containing *CYP94C1*. NADPH-dependent formation of these two compounds was also catalyzed by *CYP94B3* (Fig. 2A, panels k and l). These metabolites were not detected when incubations were performed in the absence of NADPH (Fig. 2A, panels b and c and panels h and i) or with microsomes from yeast transformed with a void plasmid (not shown), con-

firming involvement of *CYP94C1* and *CYP94B3* in their formation. Strikingly, *CYP94C1* and *CYP94B3* generated distinct patterns of JA-Ile oxidation, visualized by different ratios of the three compounds. *CYP94C1* was most efficient in catalyzing double oxidation to 12COOH-JA-Ile, but significant levels of 12OH-JA-Ile also accumulated. *CYP94B3* produced mainly 12OH-JA-Ile, with minor conversion to 12COOH-JA-Ile. Activities of both enzymes on JA-Ile or 12OH-JA-Ile were estimated by separate incubations with either substrate and carbon monoxide spectra quantification of CYP proteins. As shown in Fig. 2B (left panel), when JA-Ile was provided as substrate, 12OH-JA-Ile accumulation was almost 3 times higher with *CYP94B3* than with *CYP94C1*. In contrast, when 12OH-JA-Ile was used as substrate, *CYP94C1* was about 6 times more efficient than *CYP94B3* in converting 12OH-JA-Ile to 12COOH-JA-Ile (Fig. 2B, right panel). These *in vitro* results demonstrate a functional specialization of *CYP94B3* and *CYP94C1* enzymes for each oxidation step.

To further explore substrate specificity of *CYP94C1* and *CYP94B3*, we tested their capacity to oxidize different jasmonates and the bacterial phytotoxin coronatine. As shown in Fig. 2C, unconjugated jasmonic acid was not metabolized, extending a previous study on *CYP94B3* (26). However, weak, NADPH-dependent activities were detected with related jasmonates. Methyl-jasmonate was hydroxylated and carboxylated by *CYP94C1*, whereas it was not metabolized by *CYP94B3*. The JA precursor OPDA was oxidized by both enzymes to a compound with the expected mass for a hydroxyl derivative. However, no compound with the mass of the corresponding carboxylated derivative was detected. Coronatine is a structural mimic of JA-Ile and a potent agonist of the COI1-JAZ receptor (34, 35). In our conditions, no metabolization of coronatine by *CYP94C1* or *CYP94B3* was detected.

***CYP94C1* Is Involved in Wound-induced Synthesis of 12COOH-JA-Ile in Vivo**—To obtain direct genetic evidence for the involvement of *CYP94C1* in JA-Ile oxidation and turnover *in planta*, we used a T-DNA insertion mutant line (N55455, *cyp94c1-1*) that is a null allele of the gene (supplemental Fig. S2A). As no second suitable insertion allele was available, we also generated RNAi lines that specifically target *CYP94C1* for silencing (supplemental Fig. S2B). JA-Ile and oxidized derivatives were determined for both mutant lines in kinetic wounding experiments. Both *cyp94c1-1* (Fig. 3A, left panels) and RNAi plants (Fig. 3A, right panels) showed similar profiles. Essentially identical JA-Ile and 12OH-JA-Ile profiles were recorded in mutant and WT plants. In contrast, accumulation of 12COOH-JA-Ile in *CYP94*-deficient lines was reduced and never exceeded 40–45% that of control levels between 4 and 8 h post-wounding. We then generated and analyzed plants overexpressing *CYP94C1* under the strong cauliflower mosaic virus 35 S promoter. *CYP94C1*-OE3B (OE3B) and *CYP94C1*-OE3F (OE3F) lines were selected that represented two levels of transgene expression, which was higher in OE3B than in OE3F line (supplemental Fig. S2C). A reduction in peak accumulation of JA-Ile and 12OH-JA-Ile was marked in OE3B and only detectable at 4–8 h after wounding in OE3F (Fig. 3B, left panels). Consistently, subtle but statistically significant increases in 12COOH-JA-Ile levels relative to WT were measured in

Dual Jasmonoyl-isoleucine Oxidation by CYP94 Enzymes

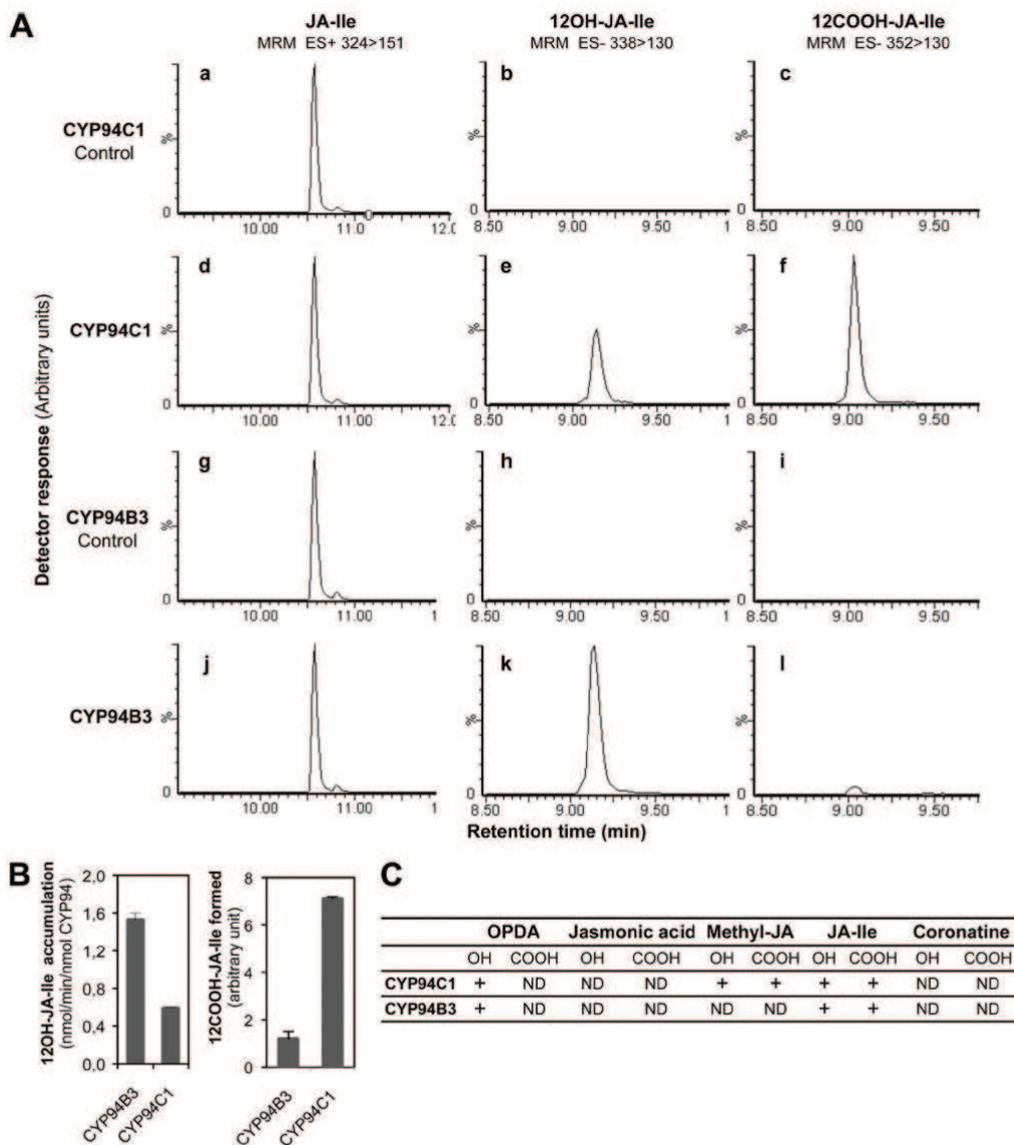


FIGURE 2. Catalytic activities of recombinant CYP94C1 and CYP94B3. A, shown are LC chromatograms of residual JA-Ile, 12OH-JA-Ile, and 12COOH-JA-Ile produced in incubations of microsomes of yeast expressing CYP94C1 (panels a–f) or CYP94B3 (panels g–l). Incubations were performed in the absence (panels a–c and g–i) or in presence (panels d–f and j–l) of NADPH. Reaction products were identified by LC-MS/MS based on their retention times and detection in multiple reaction monitoring (MRM, m/z 324 > 124 for JA-Ile, m/z 338 > 130 for 12OH-JA-Ile, and m/z 352 > 130 for 12COOH-JA-Ile). B, shown is a comparison of hydroxylase (left panel) and carboxylase (right panel) activities of CYP94B3 and CYP94C1. Microsomes containing 84 pmol of P450 protein were incubated for 20 min with 100 μ M JA-Ile (left panel) or 12OH-JA-Ile (right panel). Metabolite formation was monitored by LC-MS/MS analysis. Values are the means \pm S.E. of triplicate determinations. C, microsomes of yeast expressing CYP94C1 or CYP94B3 were incubated with 100 μ M concentrations of different jasmonates tested as substrates in the presence of NADPH. Hydroxylated (OH) and carboxylated (COOH) metabolites were searched for by LC-MS/MS analysis. ND, not detected. +, detection of oxidized product. ES+, electrospray positive ionisation; ES–, electrospray negative ionisation.

CYP94C1-overexpressing lines at early time points (up to at least 2 h post-wounding), but levels were similar to WT in the later response (Fig. 3B, lower panels). These antagonistic effects

of CYP94C1 depletion or overexpression on jasmonate levels are consistent with the *in vitro* catalytic activity and demonstrate that CYP94C1 is responsible for the accumulation of

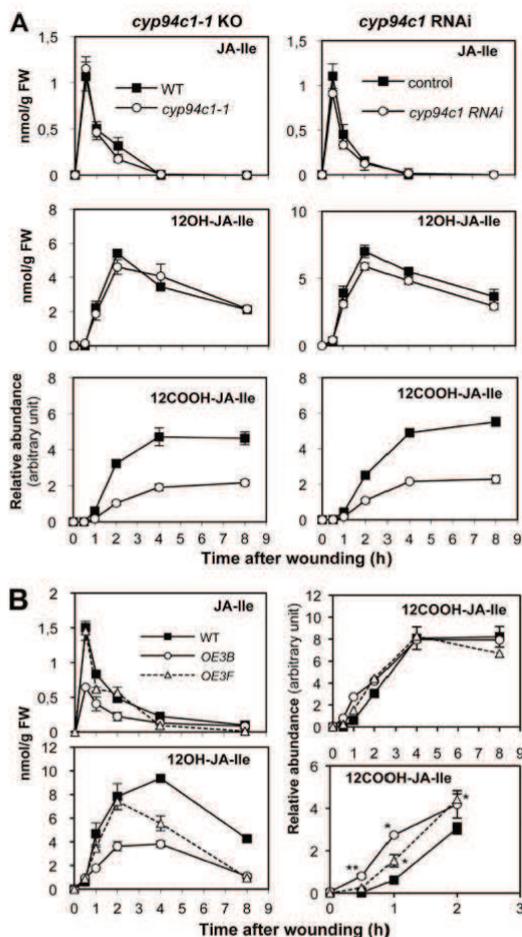


FIGURE 3. CYP94C1 is involved in 12COOH-JA-Ile accumulation in wounded leaves. Leaves were harvested at increasing times after wounding and extracted for jasmonate determination. *A*, shown is the time course of JA-Ile (top panels), 12OH-JA-Ile (middle panels), and 12COOH-JA-Ile (bottom panels) accumulation in wounded leaves of wild-type and T-DNA insertion (*cyp94c1-1*, left panels) or CYP94C1 RNAi lines (right panels). Similar results were obtained with additional, independent RNAi lines. *B*, shown is the time course of JA-Ile and oxidized derivative accumulation in wounded leaves of wild-type and CYP94C1-overexpressing lines. The bottom right panel is a close-up of 0–2 h data shown in the top right panel. Data are the means \pm S.E. from three biological samples. Asterisks denote a significant difference compared with WT value at same time point using Student's *t* test (*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$).

more than half of the 12COOH-JA-Ile detected in wounded leaves. They also suggest the existence of an additional enzyme(s) contributing to the formation of this JA-Ile metabolite *in planta*.

CYP94B3 and CYP94C1 Cooperate to Control Oxidative JA-Ile Turnover in Response to Wounding—The fact that CYP94B3 and CYP94C1 are both able to catalyze JA-Ile oxidation *in vitro* led us to address the extent of *in vivo* redundancy between these

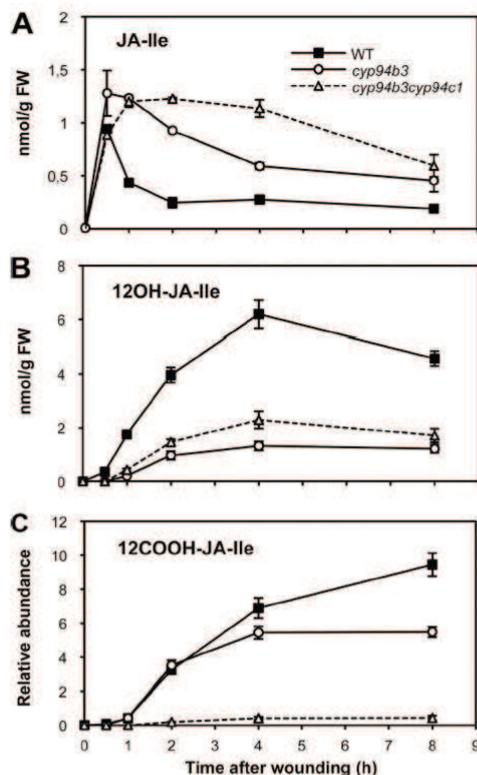


FIGURE 4. CYP94B3 and CYP94C1 cooperate *in vivo* to control oxidative JA-Ile turnover. Leaves of WT, *cyp94b3-1*, or *cyp94b3cyp94c1* plants that were mechanically wounded and harvested at increasing time points were extracted for jasmonate determination. *A*, JA-Ile levels. *B*, 12OH-JA-Ile levels. *C*, 12COOH-JA-Ile levels. Data are the means \pm S.E. from three biological samples.

two enzymes. We generated a double *cyp94b3cyp94c1* mutant and analyzed its wound-induced oxidized JA-Ile profile relative to *cyp94b3* mutant and WT plants. The *cyp94b3* mutation reduced drastically the levels of 12OH-JA-Ile (Fig. 4*B*) and consequently increased those of precursor JA-Ile (Fig. 4*A*), confirming the critical role of CYP94B3 in hydroxylating JA-Ile *in planta* that was described recently (26, 27). The levels of 12COOH-JA-Ile in *cyp94b3* were similar to WT at early time points (up to 2 h post-wounding) but never exceeded 60% of WT between 4 and 8 h. The double mutant presented a remarkable jasmonate profile. *cyp94b3cyp94c1* exhibited the most persistent JA-Ile accumulation compared with *cyp94b3* and WT plants (Fig. 4*A*). Double mutant 12OH-JA-Ile levels were intermediate between the low levels in *cyp94b3* and WT levels (Fig. 4*B*). In contrast, the wound-induced increase of 12COOH-JA-Ile was nearly abolished in the double mutant. Taken together, these profiling results indicate that CYP94B3 and CYP94C1 are both involved in oxidative JA-Ile turnover *in vivo* and that the concerted activities of CYP94B3 and CYP94C1 account for more than 90% 12COOH-JA-Ile accumulation.

Dual Jasmonoyl-isoleucine Oxidation by CYP94 Enzymes

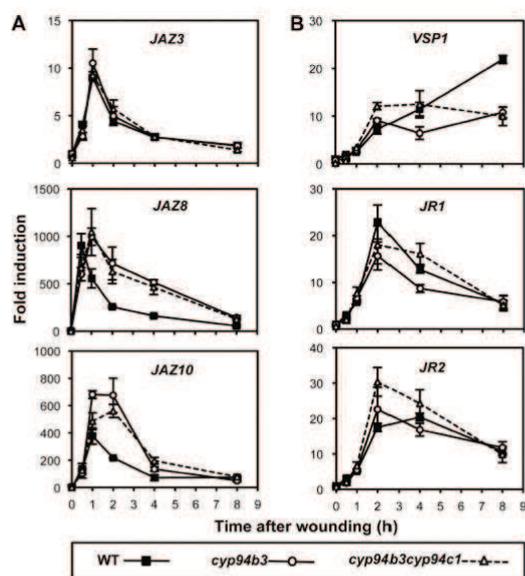


FIGURE 5. Impaired JA-Ile oxidation in single or double CYP94-deficient plants differentially affects jasmonate-responsive genes upon wounding. Leaves of WT, *cyp94b3*-1, or *cyp94b3cyp94c1* plants (same plant set as used in Fig. 4) were mechanically wounded and harvested for RNA extraction. Gene expression time courses were established by real time PCR. Expression is represented as -fold induction relative to the level at time 0 in WT plants, which was set to 1 for each gene. **A**, shown are early response *JAZ* genes. **B**, shown are wound- and jasmonate-responsive defense genes. Data are the means \pm S.E. from three replicate samples.

Impact of CYP94C1 and CYP94B3 Deregulation on Jasmonate-dependent Responses—*cyp94b3* plants display elevated wound-induced levels of the hormonally active JA-Ile because of impaired oxidation to less active 12OH-JA-Ile (this study and Koo *et al.* (27)). This metabolic alteration was reportedly associated with enhanced expression of early JA-responsive genes. As *cyp94b3cyp94c1* mutants maintain near maximal JA-Ile levels for a longer time period than *cyp94b3* plants (Fig. 4A), we anticipated that hyperinduction of JA-responsive genes may be even more pronounced in the double mutant. Fig. 5A shows that expression of the early response genes *JAZ8* and *JAZ10* is persistently enhanced in *cyp94b3* and *cyp94b3cyp94c1* mutants compared with WT plants, whereas *JAZ3* expression profile was the same in all three genotypes. When defense genes with slower dynamics (36) were analyzed, a different picture emerged (Fig. 5B). No gain in *VSP1*, *JR1*, or *JR2* expression was found associated with high JA-Ile persistence in *cyp94b3* plants. In the double mutant, a transiently enhanced expression was observed for *VSP1* and *JR2* 2 h after wounding. We similarly analyzed *cyp94c1-1* single mutant plants that display reduced 12COOH-JA-Ile levels but near WT JA-Ile and 12OH-JA-Ile contents (Fig. 3A). Expression of the three *JAZ* genes analyzed was slightly enhanced at early time points (Fig. 6A), but amplitude of defense gene induction was reduced in *cyp94c1-1*, with the exception of *VSP1* expression, which was boosted 8 h post-wounding (Fig. 6B). Very similar trends were observed in an

independent experiment with *cyp94c1* RNAi plants (supplemental Fig. S3). In all these experiments, the effects of *cyp94* inactivation appear at a later time point(s) for *VSP1* transcript levels (8 h) than for those of *JR1/2* (2–4 h). Therefore, preventing JA-Ile oxidation to various extents in these mutants has differential impacts on the induction of jasmonate-responsive genes upon wounding.

To begin evaluating physiological consequences of JA-Ile oxidation on jasmonate sensitivity, we conducted root growth inhibition assays on the different CYP94-modified plant lines generated in the study. Single mutations in the two CYP94 genes had only marginal effects on root growth. In contrast, double *cyp94b3cyp94c1* mutant was more sensitive to exogenous JA than WT, particularly at 10 μ M JA (supplemental Fig. S4). Conversely, roots of the most CYP94C1-overexpressing line, CYP94C1-OE3B, displayed an enhanced resistance to JA by growing longer roots. These data indicate that CYP94C1 acts in concert with CYP94B3 to modulate sensitivity to exogenous JA.

DISCUSSION

In a previous report we described CYP94C1 as a fatty acid hydroxylase that generates dicarboxylic acids from a range of fatty acids, lauric acid (C12:0) being one of the preferred *in vitro* substrates (31). Dicarboxylic fatty acids are abundant cutin monomers in *Arabidopsis*; however, *cyp94c1* mutants displayed no altered cutin composition.⁴ The rapid and transient wound induction of CYP94C1 and its co-regulation with the jasmonate pathway argued in favor of its involvement in a biological process not related to cutin synthesis. The description of two hydroxy and carboxy derivatives of JA-Ile in wounded tissues (21) that are also oxidized on the carbon 12 of the JA moiety made these compounds strong candidates for being *in vivo* products of CYP94C1 activity. During the course of this work, two reports appeared that provided genetic evidence for CYP94B3 being a JA-Ile-12-hydroxylase that contributes to partial inactivation of the JA-Ile hormone (26, 27). We describe here novel biochemical characterization of CYP94C1 and CYP94B3 and provide genetic evidence that these two enzymes are major players in the two-step oxidative turnover of JA-Ile.

Among the six CYP94 genes in the *Arabidopsis* genome, four were found expressed in mature leaves, CYP94D2 transcript levels being unaffected by wounding. In contrast, as predicted by microarray data and previous analysis (27), CYP94B1, CYP94B3, and CYP94C1 were strongly and transiently induced by mechanical wounding with typical kinetics of early responsive genes in the JA pathway. This gene expression window enclosed the sharp peak accumulation (0.5–1 h post-wounding) of JA-Ile, the putative substrate, and preceded the sequential accumulation of potential reaction products 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile. The use of *jar1* and *coi1* mutants provided further evidence for a link with the JA pathway. *jar1* maintained most CYP94 expression, but its JA-Ile deficiency is the likely cause of the near absence of 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile accumulation. In contrast, the loss of CYP94 expression in *coi1* was correlated with a severe reduction in

⁴ F. Pinot, unpublished information.

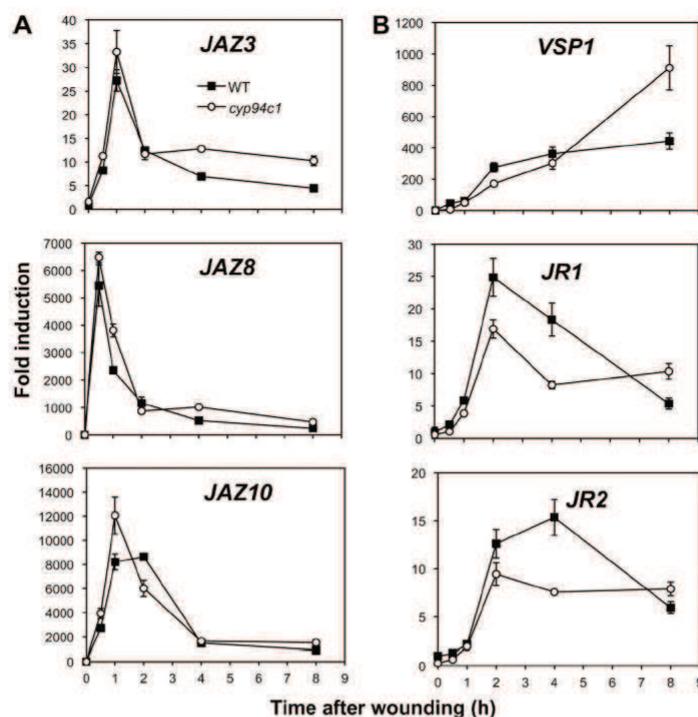


FIGURE 6. JA-responsive gene expression in CYP94C1-deficient plants upon wounding. Leaves of WT and *cyp94c1-1* plants (same plant set as used in Fig. 3A) were mechanically wounded and harvested for RNA extraction. Gene expression time courses were established by real time PCR. Expression is represented as -fold induction relative to level at time 0 in WT plants that was set to 1 for each gene. *taw*, time after wounding. A, early responsive JAZ genes are shown. B, wound- and jasmonate-responsive defense genes are shown. Data are the means \pm S.E. from three replicate samples.

12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile levels, consistent with the reduced capacity of *coi1* plants to turnover JA-Ile that was reported in Solanaceous species (23, 37). The remaining 12OH-JA-Ile in *coi1* plants may originate from residual CYP94B3 expression (supplemental Fig. S1A, left panels) or alternatively from an unknown, COI1-independent enzyme(s). This correlative evidence strengthens the hypothesis of a causal link between CYP94 genes and oxidative metabolism of JA-Ile.

We used our long-standing established procedures to produce yeast microsomes containing active CYP94 enzymes and investigated their activity on jasmonates. Consistent with its dual activity on linear fatty acids (31), CYP94C1 catalyzed two successive oxidations on JA-Ile, with partial conversion of 12OH-JA-Ile to the carboxy-derivative. We established that CYP94B3 was also able to produce 12COOH-JA-Ile, although to a lesser extent than CYP94C1. This property was missed in previous reports (26, 27), probably because of poor activity of enzymatic preparations. In their work, Koo *et al.* (27) reported less than 1% of JA-Ile metabolism in their enzymatic assay, meaning that 12OH-JA-Ile was in competition with ~99% residual JA-Ile for further metabolism. Our results indicate that the two enzymes are not redundant *in vitro*, as they produce a distinct blend of oxidized compounds. The relative activities of CYP94C1 and CYP94B3 for each oxidation reaction were

determined and illustrated the cooperative nature of the two enzymes, although the knowledge of the precise ratio between hydroxy and carboxy derivatives of JA-Ile awaits the availability of the latter pure compound in sufficient amounts. Alternatively, the ancient evolutionary origin of the CYP94 family and high conservation of CYP94C1 and CYP94B3 homologs in plant species (38) could be indicative of specific roles for each enzyme. The substrate specificity of CYP94C1 and CYP94B3 was further addressed in incubations with different jasmonates. Their total lack of activity on free JA indicates that 12OH-JA, which can be abundant in plant tissues (22), must be formed by another enzyme(s). In contrast, the detection of oxidized derivatives of methyl jasmonate or OPDA is intriguing, although the physiological relevance of this finding is unclear. Despite high levels of OPDA, we could not detect hydroxy-OPDA in plant extracts, which is consistent with the distinct cellular localizations of OPDA in chloroplasts and of CYP94 enzymes presumably in the endoplasmic reticulum. Coronatine is a structural mimic of JA-Ile that is used by *Pseudomonas* bacteria as a virulence factor to promote disease by inducing jasmonate responses that suppress salicylic acid defenses (35, 39). We show that CYP94C1 and CYP94B3, both highly active on JA-Ile, did not evolve the capacity to metabolize coronatine. In addition to its very high affinity for the COI1-JAZ receptor, the

Dual Jasmonoyl-isoleucine Oxidation by CYP94 Enzymes

potency of this phytotoxin may be strengthened by escaping inactivation by plant enzymes.

It was of particular interest to investigate how the similar yet distinct enzymatic activities recorded for recombinant CYP94C1 and CYP94B3 contribute to the wound-induced accumulation of oxidized JA-Ile derivatives *in planta*. In the different plant genotypes analyzed, jasmonate profiles were consistent with *in vitro* data, although we cannot exclude that CYP94C1 and CYP94B3 metabolize additional substrates *in planta*. Depleting CYP94C1 expression by T-DNA insertion in the *cyp94c1-1* line or by silencing the gene in RNAi lines generated similar changes in jasmonate pools. The persistence of about 40% 12COOH-JA-Ile levels in these lines points to the existence of at least a second enzyme involved in its formation. The WT levels of 12OH-JA-Ile in CYP94C1-deficient plants suggest that this compound is equally a substrate and a product of CYP94C1. CYP94C1-overexpressing lines presented opposite changes that were correlated with transgene expression. The low gain in 12COOH-JA-Ile levels observed at early time points may be limited by substrate availability or by further metabolism of 12COOH-JA-Ile. Together, this set of results shows that CYP94C1 is the major enzyme forming 12COOH-JA-Ile from JA-Ile upon wounding and that this enzyme does not affect the apparent size of the 12OH-JA-Ile pool. It was reported previously that CYP94B3 deficiency severely compromises the formation of 12OH-JA-Ile, with a concomitant hyperaccumulation of JA-Ile (27). We extended these studies, and genetic analysis identified CYP94B3 as a second enzyme contributing to *in planta* 12COOH-JA-Ile accumulation. Combining both mutations confirmed that the concerted action of CYP94C1 and CYP94B3 is required to achieve WT levels of 12COOH-JA-Ile. The slight elevation in 12OH-JA-Ile in the double mutant compared with *cyp94b3* single mutant likely reflects the proportion of this compound normally oxidized by CYP94C1. Because they are strongly impaired in JA-Ile turnover, *cyp94b3cyp94c1* plants hyperaccumulate the hormone even longer than *cyp94b3* single mutants (27). These findings demonstrate that CYP94B3/C1-mediated oxidation is a major catabolic route for clearing JA-Ile and that these conversions shape the transient nature of the JA-Ile peak after leaf wounding. CYP94B1, which is coregulated with the two CYP94 genes described in this study, awaits characterization and may account for the residual JA-Ile oxidizing activity detected in wounded *cyp94b3cyp94c1* plants. To our knowledge this is the first case of catabolism of a plant hormone by the successive conversion of a methyl to hydroxy and carboxy derivatives by single enzymes, as CYP-mediated inactivation of other hormones occurs by hydroxylation or epoxidation. In plants, many CYPs belonging mainly to families CYP86, CYP94, CYP704, CYP92, and CYP78 are able to hydroxylate a methyl group. So far, only CYP94C1 and CYP94B3 together with CYP94A5 from tobacco (40) share the unique capacity of catalyzing the complete oxidation of a methyl to a carboxyl group in aliphatic chains, which may proceed through the formation of a *gem*-diol (41).

It has been demonstrated that the jasmonate pathway is under strong stereochemical control along biosynthetic steps, with a *cis* configuration introduced into OPDA by allene oxide

cyclase (42), which is maintained through the natural (+)-7-*iso*-JA stereoisomer (14). The highly stereospecific JAR1 then exclusively produces the (+)-7-*iso*-JA-Ile epimer (43), that is a ligand of the COI1-JAZ coreceptor (15, 34). The rapid jasmonate extraction and UPLC-MS analysis procedures used here for fresh, underivatized plant samples analysis are likely to preserve the endogenous stereochemistry of jasmonates better than more complex GC-MS methods with derivatized samples that were reported previously (43, 44). Therefore, it is likely that the oxidized JA-Ile derivatives measured here are in their native configuration. To formally answer this question, specific studies are required to determine if CYP94B3- and CYP94C1-catalyzed oxidation of JA-Ile maintains the *cis* stereochemistry or if a change in configuration at oxidation steps could represent a novel regulatory level in jasmonate catabolism. What could be the physiological function of a two-step oxidation of JA-Ile? The formation of a carboxyl group may prepare the compound for further modifications, like shortening of the side chain by β -oxidation or conjugation. It was established that the introduction of a hydroxyl group on the terminal carbon of the JA moiety by CYP94B3 corresponds to a partial switch-off of biological activity in COI1-JAZ binding assays (27). Accordingly, ectopic CYP94B3 overexpression increases the oxidation status of JA-Ile and recapitulates JA-insensitive phenotypes. We extended this finding and showed that interfering with CYP94C1 expression alone or in combination with CYP94B3 inactivation alters the sensitivity of root growth to exogenous JA. This indicates that CYP94C1-mediated JA-Ile catabolism also impacts JA response physiology. The availability of *cyp94c1* and *cyp94b3* single and double mutants that display specific oxidized jasmonate profiles also allowed us to monitor the behavior of JA-regulated genes when catabolism of JA-Ile is gradually impaired. In this respect, the high JA-Ile content in *cyp94b3* has been previously associated with enhanced expression of wound-responsive genes (27). Our data show that this effect is limited to early genes and that high JA-Ile content has no major enhancing effect on defense responses. The slight and transient enhancement in defense transcripts (see Fig. 5, *VSP1* and *JR2*) may be reflective of an initial positive impact of persistent high JA-Ile levels, but this increased output of the pathway is rapidly dampened by hyperinduction of some, but not all, JAZ genes. The second oxidation step leading to 12COOH-JA-Ile may be needed for full hormonal inactivation by loss of affinity for the receptor. In CYP94C1-deficient plants accumulating less 12COOH-JA-Ile despite near WT JA-Ile and 12OHJA-Ile levels, JAZ genes were slightly overinduced, whereas peak accumulation of defense transcripts was depressed. These alterations suggest that 12COOH-JA-Ile levels are not neutral in terms of jasmonate signaling, and therefore, its formation may not serve only catabolic purposes. The correlation between hyperinduction of JAZ genes and defense attenuation in CYP94-deficient plants points to the existence of a negative feed-back loop exerted by JAZ repressor proteins on transcription of target genes under high JA-Ile levels. In support to this view, *JAZ10* that is hyperinduced in CYP94-deficient lines, produces truncated, proteolysis-resistant splice variants (for example JAZ10.4) that mediate target gene repression (45). Further investigations are needed to determine if JAZ hyperinduction

Downloaded from <http://www.jbc.org/> by guest on July 1, 2014

under high JA-Ile may also limit the intensity of other responses. This could for example explain why root growth inhibition phenotypes observed in *cyp94* mutants are relatively modest (supplemental Fig. S4). One possibility to terminate signaling would be that JA-Ile catabolites and newly synthesized JAZ proteins desensitize the receptor to render high JA-Ile levels temporarily inactive. Complex interactions between multiple JAZ proteins and additional partners appear as crucial for proper regulation of later responses (46). Such a tight control of the jasmonate signaling pathway may complicate the biotechnological strategy aiming at enhancing JA-mediated defense and herbivore resistance by reducing JA-Ile catabolism. It would also illustrate how plant evolution has optimized hormone dynamics and signaling circuits to allow maximal defensive output while minimizing resource allocation costs. Clearly, additional research is needed to understand the physiological meaning of 12COOH-JA-Ile formation and its cellular fate at later phases of jasmonate signaling.

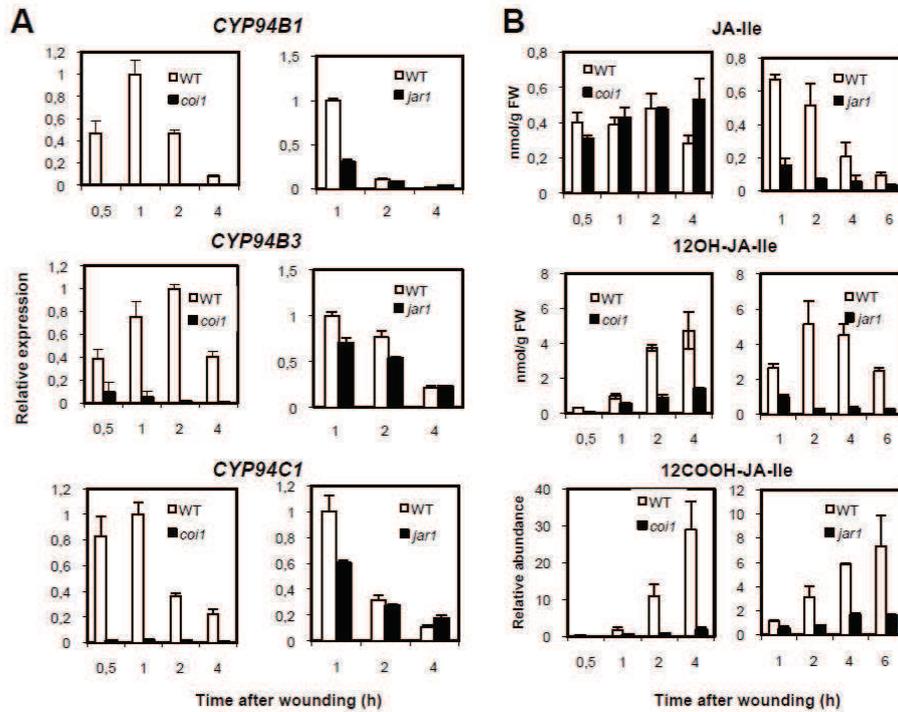
Acknowledgments—We are grateful to Michel Legrand for critical reading of the manuscript. We thank Dimitri Heintz for initial jasmonate analysis, Malek Alioua for help with real-time PCR and DNA sequencing, the gardener team for producing the numerous plants used in this study, and the Nottingham Arabidopsis Stock Center for providing seeds of T-DNA insertion lines. The UPLC-MS/MS system was cofinanced by the CNRS, the Université de Strasbourg, the Région Alsace, the Institut National de la Recherche Agronomique, and the Tepral Company.

REFERENCES

- Depuydt, S., and Hardtke, C. S. (2011) Hormone signaling cross-talk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* **21**, R365–R367
- Santner, A., and Estelle, M. (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* **459**, 1071–1078
- Mizutani, M., and Ohta, D. (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 291–315
- Schuler, M. A., and Werck-Reichhart, D. (2003) Functional genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 629–667
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., and Mizutani, M. (2004) *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol.* **134**, 1439–1449
- 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., and Neff, M. M. (2005) BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant J.* **42**, 23–34
- Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang, R., Li, P., Zhu, X., Mander, L. N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and He, Z. (2006) Elongated Uppermost Internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18**, 442–456
- Browse, J. (2009) Jasmonate passes muster. A receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 183–205
- Howe, G. A., and Jander, G. (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 41–66
- Spoel, S. H., and Dong, X. (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* **3**, 348–351
- Wu, J., and Baldwin, I. T. (2010) New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 1–24
- Chung, H. S., Niu, Y., Browse, J., and Howe, G. A. (2009) Top hits in contemporary JAZ. An update on jasmonate signaling. *Phytochemistry* **70**, 1547–1559
- Fonseca, S., Chico, J. M., and Solano, R. (2009) The jasmonate pathway. The ligand, the receptor, and the core signaling module. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 539–547
- Wasternack, C., and Kombrink, E. (2010) Jasmonates. Structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem. Biol.* **5**, 63–77
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F. F., Sharon, M., Browne, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., and Zheng, N. (2010) Jasmonate perception by inositol phosphate-potentiated CO11-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, 400–405
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D. (2009) The *Arabidopsis* coronatine-insensitive 1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**, 2220–2236
- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., and Farmer, E. E. (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**, 2470–2483
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L., and Solano, R. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. *Nature* **448**, 666–671
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., and Browse, J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(CO11) complex during jasmonate signaling. *Nature* **448**, 661–665
- Chung, H. S., Koo, A. J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. D., and Howe, G. A. (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* jasmonate ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* **146**, 952–964
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E. E., and Wolfender, J. L. (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J. Biol. Chem.* **283**, 16400–16407
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., and Wasternack, C. (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* **177**, 114–127
- Paschold, A., Bonaventure, G., Kant, M. R., and Baldwin, I. T. (2008) Jasmonate perception regulates jasmonate biosynthesis and JA-Ile metabolism. The case of CO11 in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1165–1175
- Guranowski, A., Miersch, O., Staswick, P. E., Suza, W., and Wasternack, C. (2007) Substrate specificity and products of side reactions catalyzed by jasmonate-amino acid synthetase (JAR1). *FEBS Lett.* **581**, 815–820
- Pinot, F., and Beisson, F. (2011) Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants. Characterization and physiological roles. *FEBS J.* **278**, 195–205
- Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawai, H., Matsui, H., Nabeta, K., and Matsuura, H. (2011) *Arabidopsis* CYP94B3 encodes jasmonyl-L-isoleucine 12-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of jasmonate. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1757–1765
- Koo, A. J., Cooke, T. F., and 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
- Berr, A., McCallum, E. J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T., and Shen, W. H. (2010) *Arabidopsis* histone methyltransferase set domain group 8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol.* **154**, 1403–1414
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., and Urban, P. (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* **272**, 51–64
- Omura, T., and Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370–2378
- Kandel, S., Sauveplane, V., Compagnon, V., Franke, R., Millet, Y., Schreiber, L., Werck-Reichhart, D., and 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

Dual Jasmonoyl-isoleucine Oxidation by CYP94 Enzymes

32. Ehrling, 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 Biol.* **8**, 47
33. Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., and Provart, N. J. (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718
34. Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., and Solano, R. (2009) (+)-7-iso-jasmonoyl-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 344–350
35. Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y., and Howe, G. A. (2008) CO11 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7100–7105
36. León, J., Rojo, E., Titarenko, E., and Sánchez-Serrano, J. J. (1998) Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca^{2+} /calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 412–419
37. VanDoorn, A., Bonaventure, G., Schmidt, D. D., and Baldwin, I. T. (2011) Regulation of jasmonate metabolism and activation of systemic signaling in *Solanum nigrum*. CO11 and JAR4 play overlapping yet distinct roles. *New Phytol.* **190**, 640–652
38. Nelson, D., and Werck-Reichhart, D. (2011) A P450-centric view of plant evolution. *Plant J.* **66**, 194–211
39. Brooks, D. M., Bender, C. L., and Kunkel, B. N. (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 629–639
40. Le Bouquin, R., Skrabs, M., Kahn, R., Benveniste, I., Salaün, J. P., Schreiber, L., Durst, F., and Pinot, F. (2001) CYP94A5, a new cytochrome P450 from *Nicotiana tabacum*, is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the ω -alcohol and to the corresponding diacid. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3083–3090
41. Scheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F., and Schunck, W. H. (1998) Oxygenation cascade in conversion of n-alkanes to α,ω -dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.* **273**, 32528–32534
42. Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganai, M., and Wasternack, C. (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J. Biol. Chem.* **275**, 19132–19138
43. Suza, W. P., Rowe, M. L., Hamberg, M., and Staswick, P. E. (2010) A tomato enzyme synthesizes (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine in wounded leaves. *Planta* **231**, 717–728
44. Wasternack, C., and Xie, D. (2010) The genuine ligand of a jasmonic acid receptor. Improved analysis of jasmonates is now required. *Plant Signal. Behav.* **5**, 337–340
45. Chung, H. S., Cooke, T. F., Depew, C. L., Patel, L. C., Ogawa, N., Kobayashi, Y., and Howe, G. A. (2010) Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *Plant J.* **63**, 613–622
46. Pauwels, L., and Goossens, A. (2011) The JAZ proteins. A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**, 3089–3100

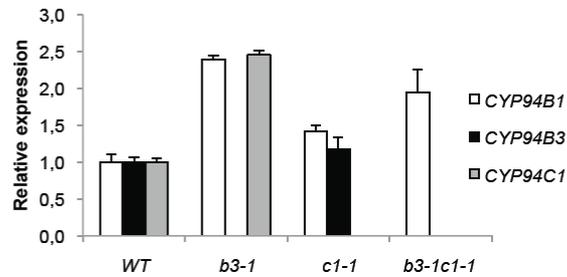


Supplemental Figure S1 Heitz et al

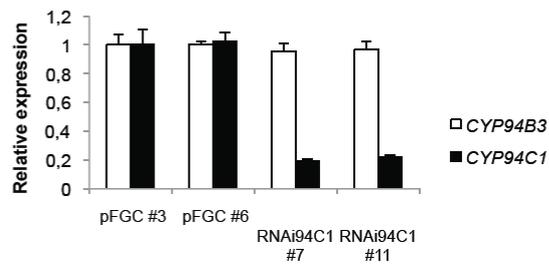
Expression of CYP94 genes and JA-Ile oxidation in *jar1* and *coil* mutants upon wounding. *A*, real-time PCR determination of CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 expression in WT, *coil-1* (left) and *jar1-1* (right) plants. All expression values are relative to expression at 1 h post-wounding in WT which was set to 1 for each gene. *B*, time course of JA-Ile (upper), 12OH-JA-Ile (middle) and 12COOH-JA-Ile (bottom) accumulation in wounded leaves of wild-type and *coil-1* (left) or *jar1-1* mutants (right). Data are means \pm SE from three replicate samples. Two independent experiments were performed with similar results.

T-DNA insertion lines used :
 cyp94b3-1 : N302217
 cyp94c1-1 : SALK_055455

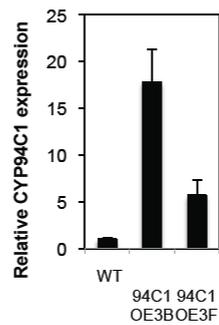
A Relative expression of *CYP94* genes 1h post-wounding in selected F2 progeny of a cross between *cyp94b3-1* and *cyp94c1-1*. *CYP94B1* was used as a stimulation control.



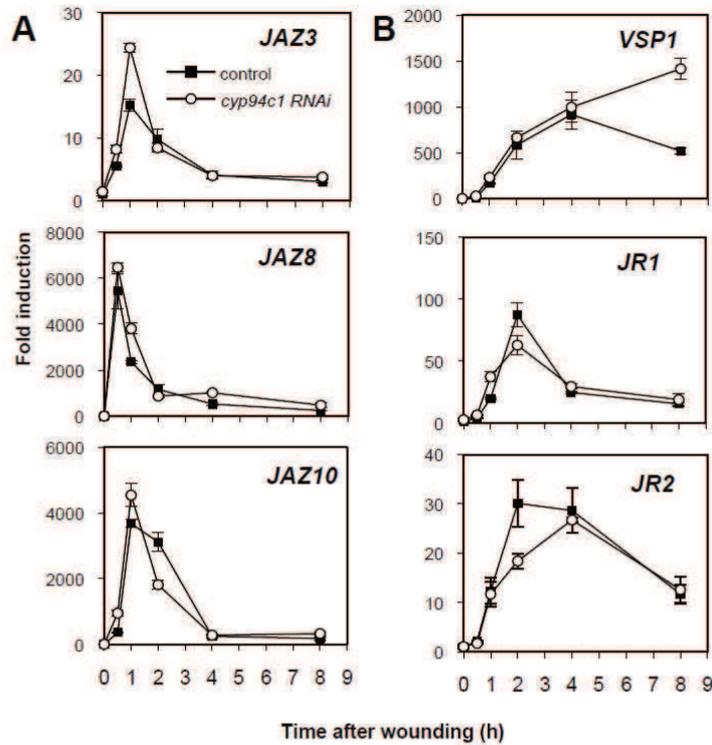
B Relative expression of *CYP94B3* and *CYP94C1* genes 1h post-wounding in T2 control (pFGC) plants and plants expressing a silencing construct (RNAi). *CYP94B1* was used as a stimulation control.



C Relative expression of *CYP94C1* in T3 plants of 35S::*CYP94C1* lines 1h post-wounding, relative to WT T0

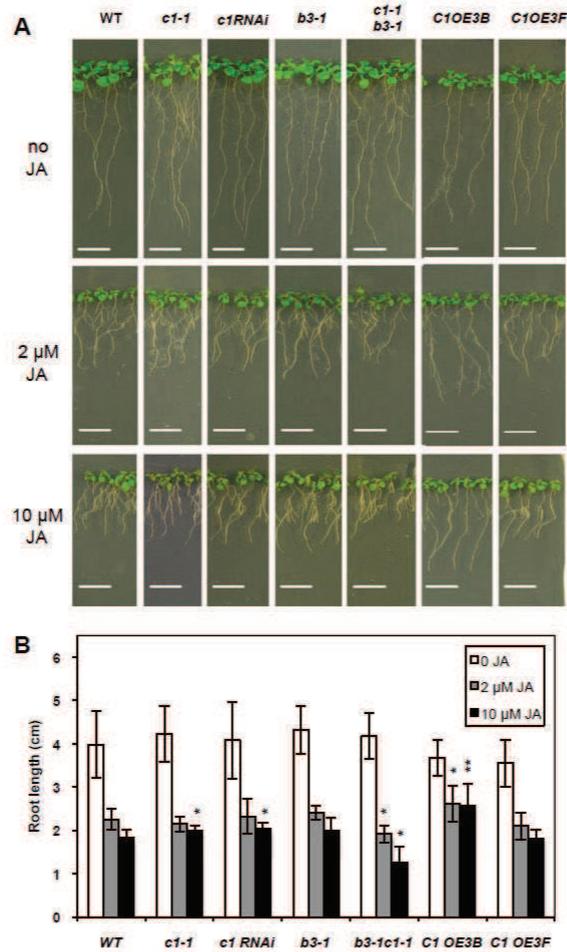


Supplemental Figure S2 : Heitz et al
CYP94B3 or/and *CYP94C1* gene expression levels in modified plant lines.



Supplemental Figure S3 : Heitz et al.

JA-responsive gene expression in CYP94C1-deficient plants upon wounding. Leaves of control (transformed with an empty pFGC vector) and CYP94C1 RNAi plants (same plant set as used in Figure 3A) were mechanically wounded and harvested for RNA extraction. Gene expression time courses were established by real time PCR. Expression is represented as fold induction relative to level at T0 in WT plants that was set to 1 for each gene. *A*, early- responsive JAZ genes. *B*, wound- and jasmonate-responsive defense genes. Data are means \pm SE from three replicate samples.



Supplemental Figure S4 : Heitz et al

JA-sensitivity of *CYP94*-modified plant lines. Root growth inhibition assay was performed with WT and *CYP94*-modified plant lines. *A*, Photographs showing root length of seedlings grown for 13d in absence or in presence of the indicated JA concentrations. Scale bar, 1 cm. *B*, Quantification at d11 of primary root length of seedlings show in *A*. Data shown are mean \pm SD ($n > 12$). Asterisks indicate a significant difference between WT and indicated genotype (t test, * : $p < 0.001$; ** : $p < 0.0001$).

Table S1 : Primers used in this study (Heitz et al)

Use	Gene/Allele (locus)	Primer name	Sequence (5' -> 3')
qPCR	<i>CYP94B1</i> (At5g63450)	CYP94B1 qPCR F62	caatgaggctttaccaccag
		CYP94B1 qPCR R62	aaatgctcgtctgttgcgcat
	<i>CYP94B2</i> (At3g01900)	CYP94B2-F	caacgttgacggaaacctct
		CYP94B2-R	gggggtgaagtcgtgtgtagc
	<i>CYP94B3</i> (At3g48520)	CYP94B3 qPCR F62	tgctttacacgaaggcttgc
		CYP94B3 qPCR R62	agtccacgaaactggaggat
		CYP94B3 1.15-F*	acgtgtcaagagaggagacaaagtg
		CYP94B3 1.25-R*	caccggttcgggttaactcttctg
	<i>CYP94C1</i> (At2g27690)	CYP94C1 qPCR F63	ggccccgattacgaagagttt
		CYP94C1 qPCR R63	ggccggaacttaccttctgt
		94C1-F-N55455**	ctcatctcttctctcacctt
		94C1-R-N55455**	agacgatggfgaatgatatgattag
	<i>CYP94D1</i> (At1g34540)	CYP94D1-F	cctgtgccagtggacataaag
		CYP94D1-R	caaatgtccatcaggcaat
	<i>CYP94D2</i> (At3g56630)	CYP94D2-F	ccgtcgaatcaacactagge
CYP94D2-R		gcgaaccgctccaatagt	
<i>OPR3</i> (At2g06050)	OPR3-F	gctcgcttaccttcacgttacac	
	OPR3-R	cttgaaccgcgaaccaaafccg	
<i>VSP1</i> (At5g24780)	VSP1-F	ccgtcaatgtttggatctttg	
	VSP1-R	gctgtgttctcgtgcccata	
* and ** : primers used for <i>cyp94b3-1</i> * or <i>cyp94c1-1</i> ** lines			
<i>CYP94C1</i> RNAi construct			
	<i>CYP94C1</i>	CYP94C1 RNAi NX	gatgccatggtctagagatttggaaactggaagtg
		CYP94C1 RNAi AB	cattggcgcgccgatccgttttcataacagaggaaacg
<i>CYP94C1</i> construct for overexpression in planta			
	<i>CYP94C1</i>	CYP94C1-SK63S	aaaaagcaggctatgttactaatcatatcattcacc
		CYP94C1-SK63R2	agaaagctgggtctaactcctttcttgatcataac
<i>CYP94</i> expression in yeast			
	<i>CYP94B3</i>	CYP94B3-pYEDP60-F	tcccccgggatggcatttcttgagtttttgatactagc
		CYP94B3-pYEDP60-R	ccggaaattcttaaacgttgaagatgtgacttctctc
	<i>CYP94C1</i>	CYP94C1-pYeDP60-F	ccccccccgggatgttactaatcatatcattc
		CYP94C1-pYeDP60-R	cccccgagctcctaagtgtgatggfagactcctttcttgatcat
T-DNA genotyping			
	T-DNA	LBb1.3 (SALK)	atfttgccgatttcgaac
		o8409 (GABI-Kat)	atattgaccatcatactcattgc
	<i>cyp94b3-1</i>	CYP94B3-0,72F	gaacgtgggaagcgaagggaagc
		BO1BG68	tggtttggttctcactgttcac
	<i>cyp94c1-1</i>	SALK_055455 LP	tgtctttttgaaagtacacc
		SALK_055455 RP	gattccacggcctaaaagatc

4 CATABOLISME PAR CLIVAGE DE JA-ILE ET DE 12OH-JA-ILE ET PRODUCTION DE 12OH-JA PAR LES AMIDO-HYDROLASES IAR3 ET ILL6 LORS DE LA BLESSURE

4.1 Introduction

A l'issue de la caractérisation de la voie catabolique oxydative, l'utilisation continue des outils de co-régulation a montré la présence du gène *ILL6* parmi les gènes les plus co-régulés avec *CYP94C1* et les gènes marqueurs de la voie des jasmonates (figure 4-1).

	Gène	Valeur R
Bait :	CYP94C1	1
	
	Disease resistance	0,955
	
	OPR3	0,931
	
	LOX3	0,910
	OPCL1	0,907
	ILL6	0,901
	
	AOC3	0,895
	
	JAZ6	0,886

Figure 4-1 : Les expressions des gènes *ILL6* et *CYP94C1* sont co-régulées avec celles de gènes de biosynthèse de jasmonates. Les gènes *OPR3*, *LOX3*, *OPCL1* et *AOC3* codent pour des enzymes de biosynthèse de JAs. Le gène du répresseur *JAZ6* est induit par la blessure. D'après des données de microarray disponibles sur Expression Angler http://bbc.botany.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi.

Par ailleurs, *IAR3* est connu de longue date comme le gène *JR3* (*Jasmonate Responsive 3*), dont l'expression est inductible par la blessure et les jasmonates (Titarenko et al., 1997). *IAR3* pourrait donc éventuellement jouer un rôle dans le métabolisme de ces derniers. Plus particulièrement, ce marqueur de la voie JA a été identifié comme une amidohydrolase qui a la capacité d'hydrolyser IAA-Ala (Davies et al., 1999), un conjugué portant un acide aminé aliphatique. Le conjugué JA-Ile comprend également un acide aminé aliphatique. Nous avons donc formulé l'hypothèse qu'*IAR3* pourrait catalyser l'hydrolyse de JA-Ile lors de la blessure pour inactiver cette hormone (figure 4-2).

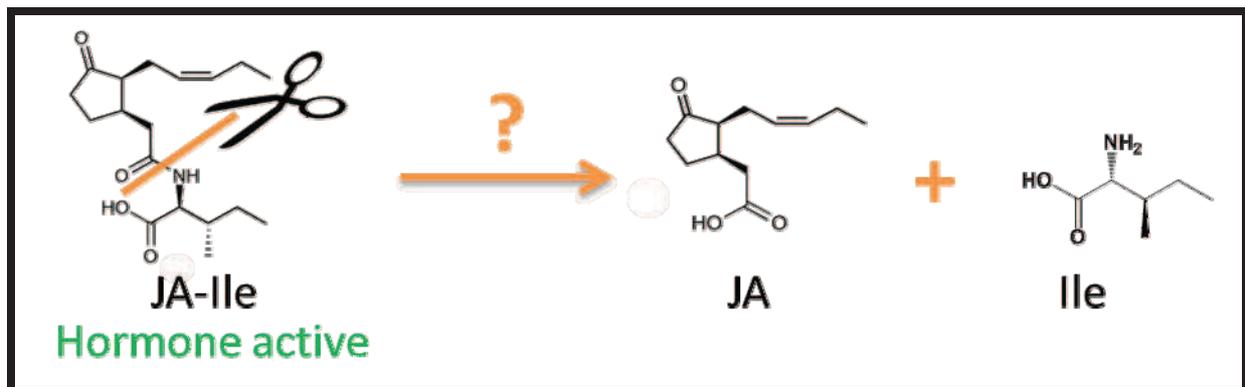


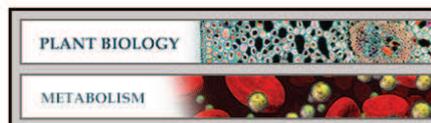
Figure 4-2 : Hypothèse d'une inactivation de JA-Ile par hydrolyse. Le conjugué JA-Ile pourrait être hydrolysé au niveau de la liaison amide par des amidohydrolases de la famille d'*IAR3*.

Une stratégie similaire à celle utilisée pour l'étude des CYP94s a donc été poursuivie dans le but d'évaluer si une voie hydrolytique pouvait coexister avec la voie oxydative.

4.2 Publication : The amidohydrolases *IAR3* and *ILL6* contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves (Widemann et al., 2013)



Plant Biology:
**The Amidohydrolases IAR3 and ILL6
Contribute to Jasmonoyl-Isoleucine
Hormone Turnover and Generate
12-Hydroxyjasmonic Acid Upon Wounding
in *Arabidopsis* Leaves**



Emilie Widemann, Laurence Miesch, Raphaël
Lugan, Emilie Holder, Clément Heinrich,
Yann Aubert, Michel Miesch, Franck Pinot
and Thierry Heitz

J. Biol. Chem. 2013, 288:31701-31714.

doi: 10.1074/jbc.M113.499228 originally published online September 19, 2013

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M113.499228](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499228)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2013/09/19/M113.499228.DC1.html>

This article cites 47 references, 19 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/288/44/31701.full.html#ref-list-1>

The Amidohydrolases IAR3 and ILL6 Contribute to Jasmonoyl-Isoleucine Hormone Turnover and Generate 12-Hydroxyjasmonic Acid Upon Wounding in *Arabidopsis* Leaves^{*S}

Received for publication, July 5, 2013, and in revised form, September 9, 2013. Published, JBC Papers in Press, September 19, 2013, DOI 10.1074/jbc.M113.499228

Emilie Widemann^{†S1}, Laurence Miesch[¶], Raphaël Lugañ[¶], Emilie Holder[¶], Clément Heinrich[¶], Yann Aubert[‡], Michel Miesch[¶], Franck Pinot[¶], and Thierry Heitz^{‡2}

From the [†]Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche 2357 du Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France, the [¶]Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche 2357 du Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 28 rue Goethe, 67083 Strasbourg Cedex, France, and the [‡]Laboratoire de Chimie Organique Synthétique, Institut de Chimie, Unité Mixte de Recherche 7177, Université de Strasbourg, Centre National de la Recherche Scientifique, 1 rue Blaise Pascal, 67008 Strasbourg Cedex, France

Background: The plant hormone jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) undergoes oxidative catabolism mediated by cytochrome P450 enzymes.

Results: Two amidohydrolases catalyze the cleavage of JA-Ile conjugates and generate 12OH-JA during *Arabidopsis* wound response.

Conclusion: IAR3 and ILL6 define an additional pathway for JA-Ile turnover and establish a biosynthetic route for 12OH-JA.

Significance: New enzymatic steps unravel the complexity in jasmonate metabolism.

Jasmonates (JAs) are a class of signaling compounds that mediate complex developmental and adaptive responses in plants. JAs derive from jasmonic acid (JA) through various enzymatic modifications, including conjugation to amino acids or oxidation, yielding an array of derivatives. The main hormonal signal, jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile), has been found recently to undergo catabolic inactivation by cytochrome P450-mediated oxidation. We characterize here two amidohydrolases, IAR3 and ILL6, that define a second pathway for JA-Ile turnover during the wound response in *Arabidopsis* leaves. Biochemical and genetic evidence indicates that these two enzymes cleave the JA-Ile signal, but act also on the 12OH-JA-Ile conjugate. We also show that unexpectedly, the abundant accumulation of tuberonic acid (12OH-JA) after wounding originates partly through a sequential pathway involving (i) conjugation of JA to Ile, (ii) oxidation of the JA-Ile conjugate, and (iii) cleavage under the action of the amidohydrolases. The coordinated actions of oxidative and hydrolytic branches in the jasmonate pathway highlight novel mechanisms of JA-Ile hormone turnover and redefine the dynamic metabolic grid of jasmonate conversion in the wound response.

Recent years have seen significant progress in our understanding of how hormonal pathways orchestrate plant development and their adaptation to environmental cues. This is particularly the case for jasmonates (JAs),³ a term that refers to jasmonic acid (JA) and its derivatives, for which mechanistic insights into the biosynthesis, perception/action, and modification have been reported (1, 2).

JAs regulate important steps in plant development, but their roles are best documented as mediators of inducible responses to herbivorous insects and necrotrophic pathogens (3–5). These aggressors trigger the JA pathway, which in turn up-regulates overlapping yet distinct sets of genes that lead to the accumulation of a specific arsenal of chemical defenses and proteins (6, 7). Jasmonate metabolism is strongly stimulated by mechanical leaf wounding in *Arabidopsis* (8, 9) and in other plant species, and triggers many responses induced by leaf-eating insects (10).

The processes and enzymes leading to jasmonic acid (JA) biosynthesis are relatively well described (2), but the nature of the initial molecular event triggering the pathway is still elusive. In *Arabidopsis*, partially redundant lipases release the precursor fatty acid α -linolenic acid from plastidial membranes where it is converted to 12-oxo-phytodienoic acid through the sequential action of 13-lipoxygenases, the cytochrome P450 allene oxide synthase, and allene oxide cyclase. 12-Oxo-phytodienoic acid is then translocated to peroxisomes where it is reduced by 12-oxo-phytodienoic acid reductase 3 before three

* This work was supported in part by Agence Nationale de la Recherche Contract ANR-12-BSV8-005 (to Y. A.).

^S This article contains supplemental Methods S1.

¹ Supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

² To whom correspondence should be addressed: Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, 12 rue du Général Zimmer 67084 Strasbourg Cedex, France. Fax: 33-388614442; E-mail: thierry.heitz@ibmp-cnrs.unistra.fr.

³ The abbreviations used are: JA, jasmonates or jasmonic acid; TA, tuberonic acid; JA-Ile, (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine; JAR1, JASMONATE RESISTANT 1; COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; JAZ, Jasmonate ZIM domain; IAA-Ala, indole acetic acid-alanine; UPLC, ultra performance liquid chromatography; ANOVA, analysis of variance; qPCR, quantitative PCR.

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberonic Acid Formation

rounds of β -oxidation of the side chain. JA has been viewed initially as the active jasmonate in plants, due to its abundance and relative stability, and also because JA treatment recapitulates most known jasmonate responses.

JA is subjected to many enzymatic modifications that generate an array of derivatives, including oxidized and/or sulfonated forms or amino acid or sugar conjugates (2, 11). These individual jasmonates vary in abundance, biological activity, and distribution under various stimuli and in different tissues. For example, the JA metabolite 12OH-JA was first described in potato and *Solanaceous* species for its tuber-inducing activity, hence its trivial name tuberonic acid (TA) (12). More recently, TA and its sulfonated or glucosylated derivatives were found as commonly occurring metabolites of JA, particularly in the wound response (13, 14), but the mode of formation of TA and biological activity of its derivatives are still largely unknown. TA formation has, however, been proposed as a partial switch-off in JA signaling (14). However, TA could also be a metabolic intermediate, for example, TA-glucoside was described as a specific signal triggering leaf closing in the rain tree *Samanea saman* (15).

Among many existing JA modification routes, the JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1)-catalyzed formation of (+)-7-*iso*-jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile) is the critical signal activation step (16). JAR1 is a member of the GH3 family of acyl amidosynthases, whose other described members conjugate auxin to amino acids (17), indicating possible metabolic cross-talk between auxin and JA pathways. JA-Ile specifically promotes assembly of a co-receptor composed of the F-box protein CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) and Jasmonate ZIM domain (JAZ) proteins. JAZ proteins constitute a family of transcriptional repressors that under low JA-Ile content prevent the transcription of target genes. JA-Ile-triggered co-receptor assembly results in JAZ ubiquitination by the SCF^{COI1} E3 ligase and their subsequent proteolytic removal by the 26S proteasome, leading to the derepression of target genes, and the deployment of the JA response (18, 19).

Plants have also evolved mechanisms to reset JA signaling to pre-stimulation conditions. For example, the strong JAZ repressor gene co-induction with the JA metabolic pathway is believed to rapidly restore a repressed state on JA-responsive promoters (10). Another means to terminate signaling is to modify or eliminate the hormonal signal. We and others have recently described a cytochrome P450 (CYP)-based catabolic pathway that contributes to the turnover of JA-Ile. CYP94B3 and CYP94C1 oxidize JA-Ile at the C12 position, leading to sequential accumulation of the oxidized derivatives 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile (20–22). This oxidative metabolism accounts largely for the transient nature of JA-Ile accumulation after wounding and, similarly to other plant hormones (23), corresponds to the attenuation of the hormonal signal, as plants with perturbed JA-Ile oxidizing activity have an altered JA response (20, 22).

Phytohormone conjugation to amino acids is generally associated with storage or inactivation purposes (24) like in the case of auxin, but the fascinating counter example of JA-Ile activity suggests that de-conjugation could be used to readily inactivate

this hormone. Gene families encoding auxin amidohydrolases and their regulation by interacting microorganisms have been described in *Brassica rapa* (25) and *Medicago truncatula* (26). In *Arabidopsis*, they form a 7-gene family (*IAR3*, *ILL1*, *ILL2*, *ILL3*, *ILL5*, *ILL6*, and *ILR1*) with several members known to cleave auxin-amino acid conjugates (27). *IAR3*, encoding an indole acetic acid-alanine (IAA-Ala) hydrolase (28), was initially described as a wound- and jasmonate-induced gene named Jasmonate Responsive 3 (*JR3*) and used as a robust JA pathway marker (29). Recently, Woldemariam *et al.* (40) reported the characterization of the *IAR3*-related jasmonoyl-isoleucine hydrolase 1 (*JIH1*), an herbivore-induced amidohydrolase from the wild species *Nicotiana attenuata*, which contributes to JA-Ile signal attenuation by cleaving the hormone into JA and Ile. We describe here the characterization of *IAR3* and *ILL6*, two of three amidohydrolase genes that are co-regulated with the JA pathway in *Arabidopsis*. *IAR3* was previously characterized in the context of auxin conjugate hydrolysis (28), but no data were available for *ILL6*. Starting from a metabolic analysis of several JA pathway mutants, we hypothesized the action of amidohydrolases to explain the particular jasmonate profiles in these lines. Indeed, recombinant *IAR3* and *ILL6* were found to cleave JA-Ile *in vitro*, consistent with a role in hormonal turnover upon wounding. Interestingly, the enzymes also seem to act on the hydroxylated JA-Ile conjugate, with important consequences on the homeostasis of oxidized jasmonates. Particularly, we elucidate an unexpected mode of TA formation that, instead of direct hydroxylation of JA, proceeds through the cleavage of JAR1- and CYP94-generated 12OH-JA-Ile.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Growth and Treatment—*Arabidopsis thaliana* genotypes used were all in the Col0 ecotype and grown under a 12/12-h photoperiod in a growth chamber. T-DNA insertion lines used were: *coi1-1*, *jar1-1*, the double mutant between *cyp94c1-1* (SALK_55455) and *cyp94b3-1* (CS302217) described in Ref. 20, *iar3-5* (SALK_069047), *iar3-6* (SALK_042101), *ill6-1* (GK412E11), and *ill6-2* (SALK_024894), all obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC). For wounding experiments, between 4 and 6 fully expanded leaves of 6–7-week-old plants were wounded three times across the midvein with a hemostat. At increasing time points following mechanical damage, leaf samples were quickly harvested and flash-frozen in liquid nitrogen before storing at -80°C until use.

RT-Quantitative PCR (qPCR) Gene Expression Assays—Total RNA was extracted from plant leaves with TRIzol reagent (Molecular Research Center). One μg of RNA was reverse transcribed using the ImProm-II reverse transcription system (Promega, Madison, WI). Real-time PCR was performed on 10 ng of cDNA as described in Ref. 30 using a LightCycler 480 II instrument (Roche). The housekeeping genes *EXP* (At4g26410) and *GAPDH* (At1g13440) were used as internal references. *GAPDH* was replaced by *At4g26410* encoding an unknown protein (31) in the experiments with *coi1* plants. Gene-specific primer sequences used for qPCR are listed in Table 1.

Chemical Synthesis of Oxidized Jasmonates—JA-Ile was obtained according to the reported method (32). 12-OH-JA-Ile was obtained as described in Refs. 21 and 33. The

TABLE 1
Primers used in this study

Use	Gene/allele (locus)	Primer name	Sequence (5' → 3')	
qPCR	<i>CYP94B1</i> (At5g63450)	CYP94B1 qPCR F62	caatgagctttaccaccag	
		CYP94B1 qPCR R62	aaatgctcgtttgctgcat	
		CYP94B3 qPCR F62	tgcttacacgaagctgtgc	
	<i>CYP94B3</i> (At3g48520)	CYP94B3 qPCR R62	agtcccaagaactgaagat	
		CYP94C1 qPCR F63	ggccggattacgaagattt	
		CYP94C1 qPCR R63	ggccggaacttacctcgtt	
	<i>IAR3</i> (At1g51760)	IAR3 qPCR-F	ggcctgatggatgcacttg	
		IAR3 qPCR-R	tgcatctccctggaacctt	
		IAR3-69047-q ^{Fa}	ttgctctgtacccttct	
		IAR3-69047-q ^{Ra}	tccgataagcaagtgaagga	
		<i>ILL1</i> (At5g56650)	ILL1 qPCR-F	ttcaacaacatcgccaacatt
			ILL1 qPCR-R	caacgttctcaagctctct
			<i>ILL2</i> (At5g56660)	ILL2 qPCR-F
		ILL2 qPCR-R		ctcatctcttctcctcaactaa
		<i>ILL3</i> (At5g54140)	ILL3 qPCR-F	ttgtctctcgtgctgata
			ILL3 qPCR-R	tttgccttatgatcccaactaa
		<i>ILL5</i> (At1g51780)	ILL5 qPCR-F	gtttcacgagaggagatcct
			ILL5 qPCR-R	tccggaatgacattaaagca
	<i>ILL6</i> (At1g44350)	ILL6 qPCR-F	ggctgataggacactacc	
		ILL6 qPCR-F	tgcatcttgcctgcaacttt	
		ILL6-GK412-F ^a	gtgtcccatccatccaaggg	
		ILL6-GK412-R ^a	ggtccgacataccatgatcc	
		ILL6-024894-F ^a	cttggctgcccattctt	
		ILL6-024894-R ^a	Tcatcacaagctccgtcttc	
	<i>ILR1</i> (At3g02875)	ILR1 qPCR-F	Actggatccactcaagctg	
		ILR1 qPCR-R	Tgcggtattactgtttgagca	
		<i>ST2a</i> (At5g07010)	ST2a qPCR-F	Gccttgcaactcttagagctt
	ST2a qPCR-R		Cggcgtagacctcaaac	
	<i>EXP</i> (At4g26410)	EXP-qPCR-F	Gagctgaagtggctcaatgac	
		EXP-qPCR-R	Ggtccgacataccatgatcc	
	<i>GAPDH</i> (At1g13440)	GAPDH-qPCR-F	Ttggtagacaaggtcaagca	
		GAPDH-qPCR-R	Aaactgtcgtcaatgcaatc	
		<i>At4g26410</i>	At4g26410-qPCR-F	Gagctgaagtggctccatgac
At4g26410-qPCR-R	Ggtccgacataccatgatcc			
<i>IAR3</i> and <i>ILL6</i> cloning in pENTR1a for recombinant protein expression	<i>IAR3</i>	Sall-IAR3ΔN-F	Ctggctgactcctcaatgggttatctcaaac	
		EcoRI-IAR3ΔN-R	Tgtgaattcaagttcatctttttgtaactct	
		Sall-ILL6ΔN-F	Gtggctgacaccaacttacctcttttgaagt	
<i>ILL6</i>	<i>ILL6</i>	EcoRI-ILL6ΔN-R	Caagaattcttatgaattgattcatttaagtatctc	
T-DNA genotyping	T-DNA	LBb1.3 (SALK)	Attttggcatttggac	
		o8409 (GABI-Kat)	Atattgacataactcattgc	
		SALK_069047-LP	Gttctccagctgcttatagc	
		SALK_069047-RP	Aaaaagcaactgttccatg	
		SALK_042101-LP	Gttctccagctgcttatagc	
		SALK_042101-RP	Acaccgtaacagcaactggg	
		GK412E11-LP	Gactatccttggctgctgc	
		GK412E11-RP	Cgcaccttgaatcgttcc	
SALK_024894-LP	Gactatccttggctgctgc			
SALK_024894-RP	Cgcaccttgaatcgttcc			

^a Primers used for *iar3* and *ill6* T-DNA lines.

hydroxyl group and carboxyl function of 12OH-JA-Me-Ile were successively protected to provide 12-OAc-dioxaspiro-JA-Me-Ile. After saponification of the latter, the primary alcohol was oxidized using tetrapropylammonium perruthenate-*N*-methylmorpholine-*N*-oxide (34). Deprotection of the dioxolane function afforded 12COOH-JA-Me-Ile. Saponification of the carbomethoxy group was achieved using Me₃SnOH (35) to yield the desired 12-COOH-JA-Ile. The complete procedures, the characterization of intermediates, and final product are given in supplemental Methods S1.

Recombinant IAR3 and ILL6 Production and Enzymatic Hydrolase Assay—For heterologous expression of IAR3 and ILL6, open reading frame sequences deleted of the 25 N-terminal signal peptide-encoding codons were amplified using Phusion *Taq* Polymerase (Thermo Scientific) prior to cloning in the pENTR1a (Invitrogen) plasmid in the DH5α *Escherichia coli* strain. Inserts with error-free sequences were recombined into

the expression vector pHMGWA using GatewayTM technology (Invitrogen). Plasmids were further transformed into *E. coli* SoluBL21 strain (AMS Biotechnology, Abingdon, UK). Ice-cold bacterial pellets from isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside-induced cultures were collected and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mg/ml of lysozyme, 1 mM PMSE, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20) at an A₆₀₀ of 20. Bacteria were lysed by sonication on ice for 2 min. Clarified protein lysates were filtered and loaded on a 1-ml HisTrap HP column (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 5% glycerol installed on an Äkta Purifier10 Liquid chromatography system. The column was washed with equilibration buffer and bound protein was eluted with equilibration buffer complemented with 500 mM imidazole. Eluate was desalted on PD10 columns and the protein concentration was determined by polyacrylamide gel electrophoresis using a bovine serum albumin standard series.

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberic Acid Formation

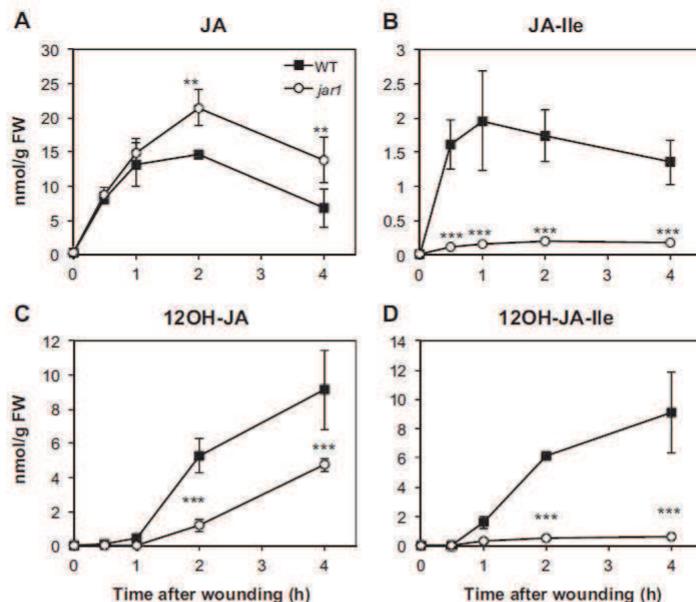


FIGURE 1. Kinetic analysis of jasmonate accumulation in wild-type (WT) and in *jar1* mutant plants upon leaf wounding. Leaves were harvested at increasing times after wounding and extracted for jasmonate determination by UPLC-MS/MS. A, JA; B, JA-Ile; C, 12OH-JA; D, 12OH-JA-Ile. Data are mean \pm S.E. from three biological samples. Asterisks indicate significant differences between mutant and WT at $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) (two-way ANOVA). Similar results were obtained in two independent experiments.

Incubation conditions were based on those described for IAR3 activity with IAA-Ala (Sigma) (36). Incubations were performed in 200 μ l containing 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM MnCl₂, 1 mM dithiothreitol, and 50 μ M JA-Ile or 12OH-JA-Ile or 12COOH-JA-Ile synthesized as described in the previous section as substrate. Control reactions were run with a similar amount of purified maltose-binding protein. Reactions were incubated at 30 °C and stopped by addition of 40 μ l of 1 M HCl before extraction with 240 μ l of ethyl acetate. After brief vortexing and centrifugation, the upper organic phase was dried under N₂ flow, and reconstituted with 150 μ l of MeOH before UPLC-MS analysis as described below.

Jasmonate Profiling—Jasmonates were identified and quantified in plant extracts and enzymatic incubations by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), using MS transitions determined from pure standards (JA, 12OH-JA, JA-Ile, 12OH-JA-Ile, or 12COOH-JA-Ile). The relative quantification in samples was achieved by reporting MS peak areas relative to internal standard peak area and mass of biological material. Absolute quantifications of JA, 12OH-JA, JA-Ile, 12OH-JA-Ile, or 12COOH-JA-Ile were determined by comparison of a sample signal with dose-response curves established for each pure compound. For plant extraction, 5 volumes of ice-cold 90% methanol containing 9,10-dihydro-JA and 9,10-dihydro-JA-Ile as internal standards were added to one fresh weight (100–150 mg pre-weighed) of frozen leaf powder in a screw-capped tube containing glass beads. Material was ground twice for 30 s with a

Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-Le-Bretonneux, France). Homogenates were cleared by two successive centrifugations at 20,000 \times g and supernatants were saved for UPLC-MS analysis. The conditions for analyzing jasmonates in enzymatic incubations or in plant extracts were described in Ref. 20. The multiple reaction monitoring transitions used for detection were (in negative mode): JA 209 > 59; 12OH-JA 225 > 59; 12OH-JA-Glc 387 > 89; 12-HSO₄-JA 305 > 97; 12OH-JA-Ile 338 > 130; 12COOH-JA-Ile 352 > 130; IAA-Ala 247 > 130 and in positive mode: JA-Ile 324 > 151, IAA 176 > 130.

Statistical Analysis—All statistical analysis were established by two-way ANOVA with Bonferroni post test using GraphPad Prism version 5.01.

RESULTS

Tuberic Acid Abundance Is Not Correlated with JA Levels but with 12OH-JA-Ile Levels in *JAR1*- or *CYP94B3/C1*-deficient Plants Upon Wounding—12OH-JA (tuberic acid, TA) as well as its glucoside (12-O-Glc-JA, TA-Glc) and its sulfated derivative 12-HSO₄-JA have been identified as common JA metabolites in several plant species (14). TA was further shown to accumulate in *N. attenuata* (37), tomato (14), and *Arabidopsis* (8) after leaf wounding. A kinetic analysis shows that TA is nearly undetectable in unstressed leaves and maximal levels are reached by 4 h after injury (Fig. 1C) in wild-type (WT) plants, which is later than those of JA that peak generally between 1 and 2 h (Fig. 1A). Despite the lack of data about TA biosynthesis, it

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberonic Acid Formation

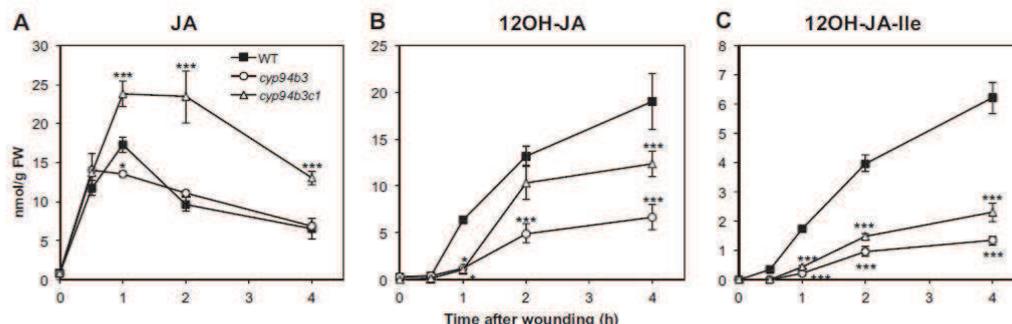


FIGURE 2. Kinetic analysis of hydroxylated jasmonate accumulation in wild-type (WT), *cyp94b3*, and *cyp94b3c1* mutant plants upon leaf wounding. Leaves were harvested at increasing times after wounding and extracted for jasmonate determination by UPLC-MS/MS. A, JA; B, 12OH-JA; C, 12OH-JA-Ile. Data are mean \pm S.E. from three biological samples. Asterisks indicate significant differences between mutant and WT at $p < 0.05$ (*) or $p < 0.001$ (***) (two-way ANOVA).

is commonly thought that TA formation occurs through JA hydroxylation. In the course of the characterization of the impact of JA conjugation on the accumulation of oxidized JA-Ile derivatives (20), we analyzed the jasmonate profiles in *jar1*, a mutant impaired in JA-Ile formation. Levels of JA were increased (Fig. 1A) and those of JA-Ile depressed (Fig. 1B) in wounded *jar1* compared with WT leaves, as expected for a block in JA-conjugating activity. Unexpectedly, despite JA overaccumulation, TA levels were reduced compared with WT (Fig. 1C). TA levels were severely reduced in *jar1* at 2 h post-wounding and did not exceed 50% WT levels at 4 h, suggesting that excess JA in *jar1* does not seem to function as a substrate for direct hydroxylation to form TA. Reduced TA levels were correlated with the strongly impaired accumulation of JA-Ile (Fig. 1B) and 12OH-JA-Ile (Fig. 1D). These observations suggest that the active hormone JA-Ile and/or the hydroxylated compound 12OH-JA-Ile are necessary for TA formation.

To determine which of these compounds is required for full TA accumulation, we examined the levels of TA in the *cyp94b3* and *cyp94b3c1* oxidation mutants in which JA-Ile is durably overaccumulated (20) and 12OH-JA-Ile is strongly reduced compared with WT (Fig. 2C). We observed in both mutants a significantly reduced build-up of TA (Fig. 2B), demonstrating that prolonged JA-Ile accumulation is not sufficient to achieve high TA levels when 12OH-JA-Ile levels are decreased, and arguing that 12OH-JA-Ile is a precursor for TA formation. This latter hypothesis is also supported by 12OH-JA-Ile levels in *cyp94b3c1*, exceeding levels in *cyp94b3* because of the impaired conversion to 12COOH-JA-Ile in the double mutant, which are correlated with commensurate effects on TA levels. Our previous *in vitro* data indicated that neither CYP94B3 nor CYP94C1 exhibited detectable JA-hydroxylase activity (20), therefore the reduced accumulation of TA in *cyp94b3* and *cyp94b3c1* mutants is unlikely due to a lack of CYP94-mediated JA hydroxylase activity. Similarly to *jar1*, JA is overaccumulated in *cyp94b3c1* (Fig. 2A), yet TA levels are lower than in WT (Fig. 2B).

Together, these metabolic studies in different genetic backgrounds indicate that a large part of TA accumulation is dependent on JAR1 conjugation and on CYP94 conjugate ox-

idation activities, pointing to the hypothesis that 12OH-JA-Ile may be an important precursor for TA formation. This indirect evidence prompted us to investigate the missing step leading to the formation of TA, and namely to explore the possibility that it may proceed through cleavage of the 12OH-JA-Ile conjugate.

Several Amidohydrolase Genes Are Wound and COI1 Regulated in Arabidopsis—Woldemariam *et al.* (40) have recently described the herbivory-induced JIH amidohydrolase that cleaves JA-Ile to JA in *N. attenuata*. JIH defines an alternative JA-Ile hormone inactivation pathway that contributes to the attenuation of the JA-Ile burst. *Arabidopsis* possesses a family of 7 related amidohydrolases (36), with several members described as cleaving auxin conjugates (27, 28, 38). Recent large scale transcriptional analysis of public microarray data using core-regulation tools (39) revealed a strong coregulation of *IAR3*, *ILL5*, and *ILL6* with the jasmonate metabolic and signaling pathways (data not shown), which includes the two CYP94 genes acting in JA-Ile catabolism (20–22). Experimental examination of the 7 gene expression profiles confirmed a rapid and transient wound induction of *IAR3*, *ILL5*, and *ILL6* transcripts (Fig. 3, A–C). Kinetics were typical of early responsive genes, peaking by 1–2 h, and largely paralleled those of *CYP94B1*, *CYP94B3*, and *CYP94C1* (20). The analysis also revealed the wound-responsive expression of *ILR1*, with a slight delay (Fig. 3D). Up-regulation of *IAR3*, *ILL5*, and *ILL6* was essentially lost in the JA-insensitive mutant *coi1* (Fig. 3, A–C), and strongly attenuated for *ILR1*. This suggests a functional link between these hydrolases and the JA pathway, and extends the previous report of COI1-dependent induction of *IAR3* (29). Moderate (*ILL1*) or weak (*ILL2* and *ILL3*) constitutive expression was evidenced for other genes, with *ILL1* and *ILL2* being down-regulated, and *ILL3* unaffected by leaf wounding (data not shown). Among inducible genes, *IAR3* had the highest basal expression level in leaves and *ILL5* had the lowest (Fig. 3E), explaining the strong difference in induction factors between these genes in WT plants (Fig. 3). Furthermore, when induction factors are multiplied by basal expression, maximal expression levels appear about 20-fold lower for *ILR1* than for *IAR3*, *ILL5*, or *ILL6*. These results prompted us to focus on the impact of the

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberonic Acid Formation

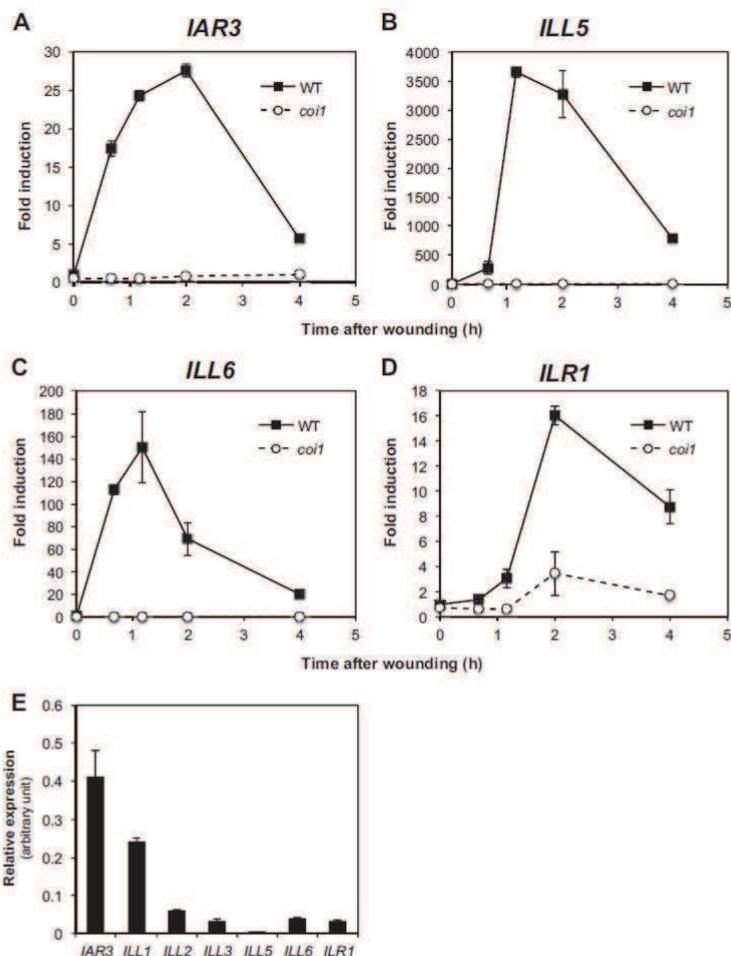


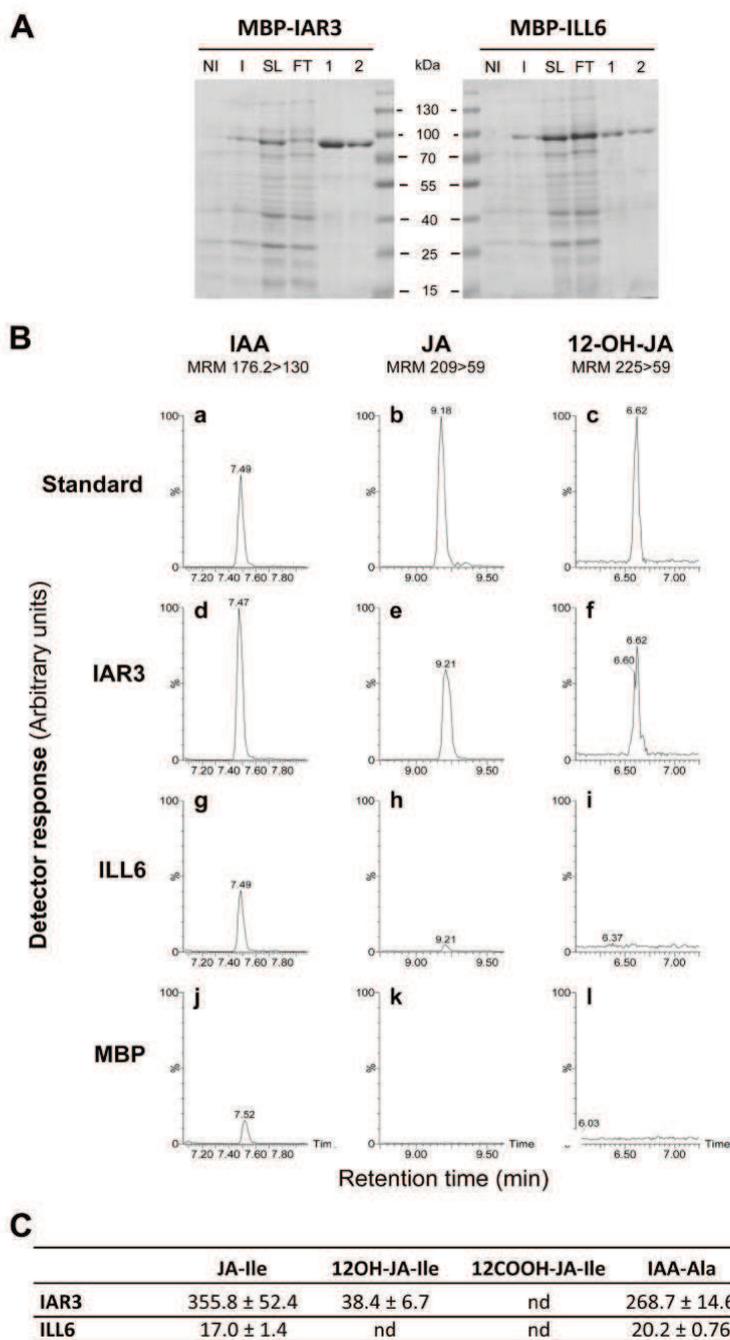
FIGURE 3. Amidohydrolase gene expression in wounded WT and *coi1* plants. Leaves were harvested at increasing times after wounding and submitted to RNA extraction. One μg of total RNA was reverse transcribed and expression of *IAR3* (A), *ILL5* (B), *ILL6* (C), and *ILR1* (D) was determined by real-time PCR using two reference genes. Expression is represented as fold-induction relative to the level at time 0 in WT that was set to 1 for each gene. E, relative expression of the 7 gene members of the *Arabidopsis* *ILR1* family in un-stressed leaves. Triplicate determinations \pm S.E. are shown.

three wound-responsive, highly expressed amidohydrolase genes *IAR3*, *ILL5*, and *ILL6* on jasmonate metabolism.

Amidohydrolase Activity of Recombinant *IAR3* and *ILL6* on JA-Ile and Oxidized Derivatives—Recombinant *IAR3*, *ILL1*, *ILR1*, and *ILL2* were described as cleaving several auxin-amino acid conjugates, with *ILL2* displaying very high activity on IAA-alanine (28, 36). Accordingly, roots from several amidohydrolase mutants displayed altered growth responses to exogenously supplied conjugates (27, 36). In contrast, no conditions were found in which glutathione *S*-transferase-*ILL6* fusions hydrolyze IAA-amino acids (36). Recently, the *IAR3*-related JIH protein, whose gene is wound- and jasmonate-induced in *N. attenuata*, was shown to cleave similarly JA-Ile and IAA-Ala *in vitro* (40). We expressed recombinant *IAR3* and *ILL6* devoid

of their N-terminal signal peptides in *E. coli* as maltose-binding protein fusions before affinity purification through their His tag (Fig. 4A). *ILL5* protein was not further studied here as its cloned cDNA was repeatedly found to bear a 7-nucleotide deletion introducing a frameshift and a premature stop codon compared with the TAIR gene model, comforting an earlier suspicion that *ILL5* may be a pseudogene (28). Purified *IAR3* and *ILL6* were incubated in parallel with synthetic JA-Ile, 12OH-JA-Ile, 12COOH-JA-Ile, and IAA-Ala, and corresponding unconjugated compounds were searched for as a measurement of cleaving activity. Fig. 4B shows typical UPLC-MS/MS chromatograms obtained with either fusion protein or maltose-binding protein as a control. Both enzymes were found to release JA from JA-Ile (Fig. 4B, e and h) and IAA from IAA-Ala (Fig. 4B, d

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberonic Acid Formation



Downloaded from <http://www.jbc.org/> at Université Louis Pasteur on March 17, 2014

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberic Acid Formation

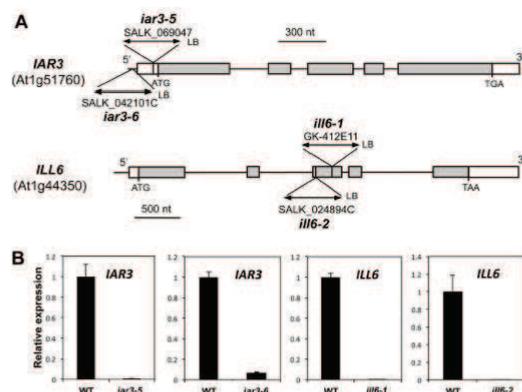


FIGURE 5. Molecular characterization of *iar3* and *ill6* insertion alleles. A, positions of T-DNA insertions in the different mutant lines are shown, and for each allele the position of the left border (LB) is indicated. Boxes denote exons and thin vertical lines denote introns or promoter regions. White boxes depict untranslated regions and gray boxes coding regions. B, RT-qPCR analysis of gene expression in WT and mutant leaves. Leaves were harvested 1 h after wounding and abundance of transcript regions spanning the insertion site was monitored. Expression in mutant lines was calculated relative to WT levels set to 1. Expression was normalized using two reference genes.

and g), recombinant ILL6 appearing less active than IAR3 on all compounds tested. When incubated with 12OH-JA-Ile, TA signal was detected only with IAR3 (Fig. 4B, f), whereas after incubation with 12COOH-JA-Ile, no cleavage activity was evidenced with either enzyme (data not shown). The different activities were evaluated quantitatively after establishing standard curves with pure compounds. Under the conditions used IAR3 was about 20-fold more active on JA-Ile than ILL6, and IAR3 was itself 9-fold more active on JA-Ile than on 12OH-JA-Ile (Fig. 4C). These results from *in vitro* experiments show that IAR3 and ILL6 release JA from JA-Ile and that at least IAR3 can also generate TA by cleaving 12OH-JA-Ile.

Amidohydrolase Mutants Display Elevated Oxidized JA-Ile Conjugates and Reduced TA Levels—To obtain direct genetic evidence for amidohydrolase involvement in jasmonate metabolism during the wound response, we used T-DNA insertion mutant lines that are impaired in the expression of *IAR3* and *ILL6*. The EMS alleles *iar3-1* through *iar3-4* were previously described (28), therefore we named the T-DNA alleles used here *iar3-5* and *iar3-6* (Fig. 5A). No *ill6* alleles were previously reported, and we introduce in this study *ill6-1* and *ill6-2*. All alleles were found to have undetectable transcript levels, except *iar3-6*, which had an insertion in the promoter region and appeared as a strong knock-down allele (Fig. 5B). The wound-induced content in five JAs of *iar3-5*, *ill6-1*, and *iar3-6*, *ill6-2* plants was determined relative to WT in two independent

series of kinetic experiments. As shown in Fig. 6A, JA-Ile was found similar to WT levels, except in *iar3-5* that showed increased levels at early time points, a result that is consistent with the respective *in vitro* JA-Ile cleaving activities found for IAR3 and ILL6. Mutations had little impact on JA levels that fluctuated near WT levels in the different alleles (Fig. 6B). We next examined the profiles of oxidized jasmonates. 12OH-JA-Ile was significantly hyperaccumulated in *ill6* and in *iar3* mutants (Fig. 6C), and this increase was accompanied by a corresponding reduction in 12OH-JA (TA) levels in all examined alleles (Fig. 6D). By 4 h post-wounding, amidohydrolase mutants accumulated about 50–60% WT TA levels. Finally, we quantified 12COOH-JA-Ile levels *in planta*, the second oxidation product, generated mainly by CYP94C1 (20). This required its prior chemical synthesis that is extensively described under supplemental Methods S1 as an original method. We determined that 12COOH-JA-Ile accumulated abundantly to about 10–25 nmol/g of fresh weight by 4 h post-wounding (Fig. 6E), making it a highly abundant jasmonate in wounded *Arabidopsis* leaves. Its levels were further enhanced in amidohydrolase mutants relative to WT, particularly in *iar3-5* and *ill6-1*. The overall differences in levels of metabolites, especially of Ile conjugates, in the two independent experiments (Fig. 6, left versus right panels) may illustrate adaptation of jasmonate dynamics to different growth periods or slight changes in experimental setup. The milder chemotypes recorded for all compounds in *iar3-6* are consistent with this line being a weaker allele than *iar3-5* (Fig. 5B). The simplest interpretation of these genetic data are that similarly to JIH in *N. attenuata* (40), IAR3 and ILL6 readily hydrolyze JA-Ile *in vivo* and the two *Arabidopsis* enzymes likely also act on 12OH-JA-Ile. Consequently, they establish that a significant part of the TA accumulated in response to wounding is generated via the cleavage of 12OH-JA-Ile.

TA, one of the products of amidohydrolase activity, is also known to undergo further metabolism via two competing routes (2), one leading to the TA glucoside (TA-Glc), the other yielding the sulfonated derivative 12-HSO₄-JA (13, 14). We therefore investigated if differential TA conversion could result in variable TA levels in the different mutant backgrounds. Transcripts of *ST2a*, the gene encoding the TA-sulfotransferase (13), were strongly up-regulated in wounded leaves in a *coi1*-dependent manner (Fig. 7A), whereas this induction was similar to WT in *jar1* (Fig. 7B) or in *iar3-6* or *ill6-2* mutants (Fig. 7C). Therefore, consumption of TA substrate by *ST2a* is not predicted to be affected differentially in these latter lines. Direct measurement of 12-HSO₄-JA established the rather late wound accumulation of this compound, and its relative abundance was reduced by about 60% in *jar1* and 40% in amidohy-

FIGURE 4. Purification and enzymatic activity of recombinant IAR3 and ILL6 amidohydrolases. A, purification steps were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Total proteins from bacteria transformed with plasmids expressing fusion proteins were analyzed before (non-induced, NI) and after (induced, I) induction with 0.5 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside for 4 h. Fusion proteins are visible after induction. His-tagged proteins present in soluble lysate (SL) were purified by affinity chromatography. FT, flow through. 1 and 2, elution fractions 1 and 2. Molecular mass markers are indicated. Proteins were visualized by Coomassie staining. B, 20 μg of either protein were incubated with the following amino acid conjugates as candidate substrates: IAA-Ala, JA-Ile, and 12OH-JA-Ile. LC chromatograms are shown where the cleavage products IAA (panels a, d, g, and j), JA (panels b, e, h, and k), or 12OH-JA (panels c, f, i, and l) were separated by UPLC-MS/MS and detected by their indicated multiple reaction monitoring transitions. C, specific activities (pmol/h/mg of protein) were determined by incubation of purified enzymes for 90 min with 100 μM substrates and quantification of cleavage products with authentic standards curves. Values represent mean ± S.E. (n = 3). nd, not detected.

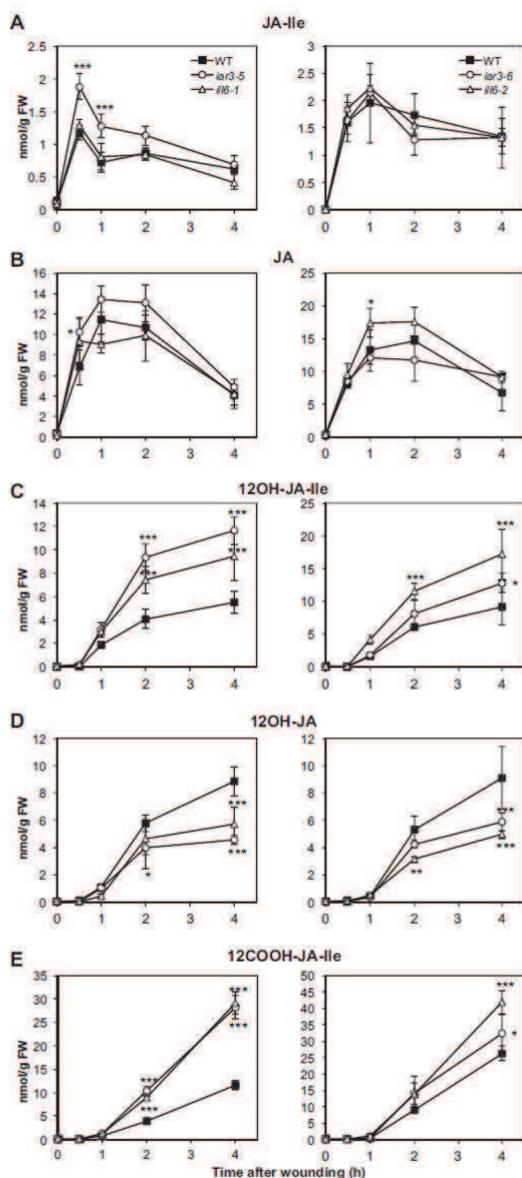


FIGURE 6. Kinetic analysis of jasmonate accumulation in wild-type (WT) and in *iar3* and *ill6* mutant plants upon leaf wounding. *iar3-5* with *ill6-1* and *iar3-6* with *ill6-2* lines were analyzed along with WT plants in independent experiments. Leaves were harvested at increasing times after wounding and extracted for jasmonate determination by UPLC-MS/MS. A, JA-Ile; B, JA; C, 12OH-JA-Ile; D, 12OH-JA; E, 12COOH-JA-Ile. Data are mean \pm S.E. from three biological samples. Asterisks indicate significant differences between mutant and WT at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), or $p < 0.001$ (***) (two-way ANOVA).

drolase mutants by 4 h (Fig. 7D). No TA-specific glucosyltransferase is characterized in *Arabidopsis*, but such an activity has been described in rice (41). We found that TA-Glc accumulation was strongly impaired in *jar1* and significantly reduced in *iar3-6* or *ill6-2* mutants (Fig. 7E). Collectively, these results suggest that the two known TA conversion pathways are not enhanced in *iar3-6* or *ill6-2* and that reduced TA accumulation is mostly due to impaired hydrolytic activity. In addition, they provide evidence that 12-HSO₄-JA and TA-Glc partly derive from TA generated through the deconjugation pathway uncovered in this work.

JA-Ile Turnover Is Tightly Controlled by Compensating Oxidative and Hydrolytic Catabolic Pathways—The observation that JA-Ile levels are only moderately or not altered by mutations in amidohydrolase genes (Fig. 6A), is in contrast to the hyperaccumulation of its two oxidized derivatives (Fig. 6, C and E) and may be indicative of enhanced hormone turnover in these lines. To examine this possibility, we monitored by RT-qPCR the wound-induced expression of genes encoding known JA-Ile-metabolizing enzymes, either from the *CYP94* family or the respective non-mutated amidohydrolase gene. Fig. 8A shows that in either *ill6* allele, *IAR3* transcript levels significantly exceeded those in WT at 1 h post-wounding. In contrast, *ILL6* expression was only marginally affected by *IAR3* deficiency (Fig. 8B). In addition, *CYP94B3* transcripts, encoding the primary enzyme for oxidative JA-Ile inactivation (20–22) were found hyperaccumulated in both *ill6* alleles, but not in *iar3* alleles (Fig. 8D). *CYP94B1*, that also catalyzes JA-Ile hydroxylation *in vitro*,⁴ showed more variable transcript levels between mutants (Fig. 8C). *CYP94C1* catalyzes the second JA-Ile oxidation step (20), and was hyperinduced in all four alleles (Fig. 8E), consistent with a pronounced 12COOH-JA-Ile overaccumulation in these mutants (Fig. 6E). This expression survey points to the existence of compensation mechanisms (mainly when *ILL6* is impaired) where the reduced JA-Ile-cleaving activity results in a stronger or earlier up-regulation of the other genes encoding JA-Ile-consuming enzymes to prevent an excessive accumulation of the hormone. Conversely, the weaker reciprocal compensation in *iar3-5* correlated with higher impacts of *IAR3* deficiency on JA-Ile levels (Fig. 6A). We finally checked if *cyp94* mutants exhibited a similar compensation by the amidohydrolase pathway. The expression patterns of *IAR3* and *ILL6* in *cyp94b3* and *cyp94b3c1* were similar to WT (data not shown), in good agreement with the highly persistent JA-Ile accumulation that was described previously in these lines (20, 22).

DISCUSSION

Plant hormone inactivation and turnover generally proceeds through two major pathways. The first route leads to sugar or amino acid conjugates and has been mostly studied for auxin (42), but was also reported for other hormones. The second pathway operates through oxidations typically catalyzed by CYP enzymes belonging to distinct subfamilies (23). Amide conjugates are synthesized by the so-called GH3 family and in the case of auxin their formation is believed to ensure removal or storage of excessive free active hormone (43). This conjugation

⁴ E. Widemann and F. Pinot, unpublished data.

Downloaded from <http://www.jbc.org/> at Universite Louis Pasteur on March 17, 2014

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberonic Acid Formation

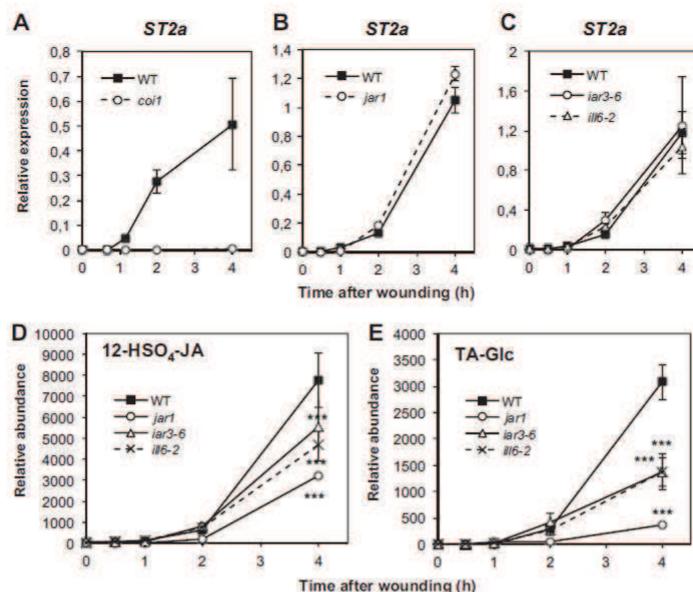


FIGURE 7. Analysis of tuberonic acid metabolism pathways in *jar1*, *coi1*, and amidohydrolase mutants upon wounding. Leaves were harvested at increasing times after wounding and submitted to RNA extraction. Expression of *ST2a* was examined by real-time PCR in *coi1* (A), *jar1* (B), and *iar3-6* and *ill6-2* (C) mutants relative to WT and represented as $\Delta\Delta C_t$ values. Two reference genes were used for normalization. The TA derivatives 12-HSO₄-JA (D) and tuberonic acid glucoside (TA-Glc, E) levels were determined in WT, *jar1*, *iar3-6*, and *ill6-2* plants. Triplicate determinations \pm S.E. are shown for all analyses. Asterisks indicate significant differences between mutant and WT at *p* < 0.001 (two-way ANOVA).

tion is reversible as several members of the ILR1-like family of amidohydrolases release free auxin from such compounds (36).

The case of jasmonate is a remarkable exception to this scheme as conjugation of JA to Ile by JAR1 (GH3.11) is the critical hormone activation step. We and others have characterized recently a CYP94-based JA-Ile catabolic pathway that generates hydroxylated and carboxylated JA-Ile derivatives and contributes largely to the rapid hormone clearance after leaf wounding (20–22). Unconjugated jasmonates also occur as oxidized derivatives, namely tuberonic acid (2, 13, 14, 41). Despite its abundance in several plant species, the question of the mode of TA formation has remained unsolved, as no enzyme for direct hydroxylation of JA could be characterized. We have provided in this work biochemical and genetic evidence that JA-Ile catabolism and TA formation are linked through the action of two amidohydrolases. Although the family of ILR1-like (ILL) amidohydrolases was discovered in the context of auxin metabolism (42, 44), a closer examination revealed that *IAR3*, *ILL5*, and *ILL6* genes are strongly co-regulated with the JA metabolic and signaling pathway. Consistently, we demonstrated their rapid and COI1-dependent up-regulation upon wounding, with kinetics similar to the oxidative branch of JA-Ile catabolism represented by the *CYP94B3* and *CYP94C1* genes (20). *ILL1*, despite a lower expression level, also displays COI1-dependent wound induction, and must be analyzed in the context of jasmonate metabolism. Based on their transcriptional behavior and abundant expression, *IAR3* and *ILL6* were the prime candidates for a role in jasmonate metabolism,

whereas *ILL5* is a non-coding sequence, and *ILL1*, *ILL2*, and *ILL3* transcripts do not correlate with jasmonate conjugate abundance. Similarly to the recently described related JIH enzyme in *N. attenuata* (40), recombinant IAR3 and ILL6 hydrolyzed almost equally JA-Ile and IAA-Ala, and IAR3 was also found to act on the oxidized derivative 12OH-JA-Ile. IAR3 was previously shown to cleave abscisic acid amino acid conjugates *in vitro* (45) and appears to be a versatile enzyme, but actual catalysis may be determined *in vivo* by substrate abundance. *In vitro* activity of recombinant ILL6 was much lower than IAR3 on either JA-Ile or IAA-Ala and no activity could be detected on 12OH-JA-Ile under our assay conditions. Previous attempts to produce active AtILL6 (36) or the *Brassica* homolog BrILL6 (25) in bacteria have failed, one possible reason being the presence of potential transmembrane domain(s). These limitations leave open the possibility that the *in vitro* enzymatic data presented here have under evaluated the catalytic capacities of AtILL6.

Genetic analysis has provided novel insights into the impact of IAR3 and ILL6 in metabolism of jasmonate conjugates in *Arabidopsis*. Although JA-Ile appeared as the best *in vitro* substrate tested, IAR3 or ILL6 deficiency had little apparent impact on the accumulation of the hormone, in contrast to JIH-silenced *N. attenuata* plants (40). This observation points to JA-Ile as a central component in the JA pathway, not only by its hormonal activity, but also as a metabolic hub with links to other conjugated and non-conjugated jasmonates. We established that the increased JA-Ile accumulation expected from

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberonic Acid Formation

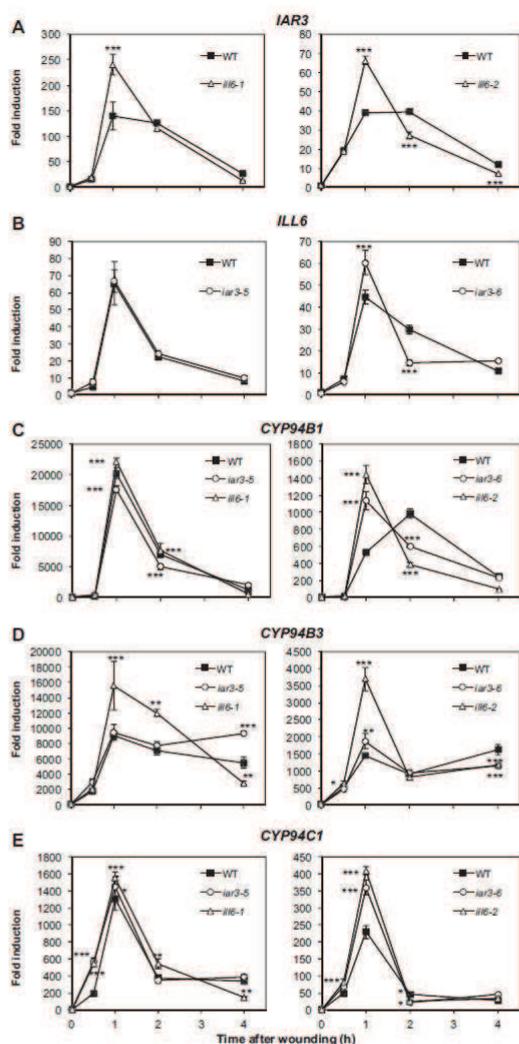


FIGURE 8. Impact of amidohydrolase mutations on expression of genes encoding JA-Ile metabolizing enzymes. Total RNA was extracted from wounded plants analyzed kinetically for jasmonate content in Fig. 6 and reverse-transcribed. Gene expression time courses were established for the following genes by real-time PCR: *A*, *IAR3*; *B*, *ILL6*; *C*, *CYP94B1*; *D*, *CYP94B3*; and *E*, *CYP94C1*. Expression is represented as fold-induction relative to level at time 0 in WT plants, which was set to 1 for each gene. Differences between the left and right panel fold-inductions are due to differences in basal expression levels between independent batches of plants. Two reference genes were used for normalization. Triplicate determinations \pm S.E. are shown. Asterisks indicate significant differences between mutant and WT at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) (two-way ANOVA).

reduced amidohydrolase activity is likely counterbalanced by a stronger induction of other genes encoding JA-Ile-consuming enzymes, such as *IAR3* and *CYP94B3* and *CYP94C1* transcripts in *ill6* alleles. In contrast, in the *iar3-5* allele, such a transcrip-

tional compensation was not evidenced, and accordingly, this line accumulated more JA-Ile than WT. Conversely, it is worth noting that the higher and persistent JA-Ile hyperaccumulation in *cyp94b3* and *cyp94b3c1* mutants blocked in oxidative JA-Ile catabolism (20) was not associated with hyperinduction of amidohydrolase genes. When manipulating *Arabidopsis* plants genetically to increase or stabilize JA-Ile levels, selective compensation can occur by enhanced stimulation of other enzymes catabolizing JA-Ile. This flexible response illustrates the metabolic plasticity of the JA pathway to maintain proper regulation of active hormone levels. JA-Ile dynamics are under high flux through both oxidation and cleavage pathways that prevent excessively high levels to build up. Consequently, if metabolic control of JA signaling is determined solely by JA-Ile levels, one may anticipate little impact of amidohydrolase deficiency on physiological JA responses. Also, the exact extent of functional redundancy between *IAR3* and *ILL6*, as well as the role of *ILL1*, needs to be investigated by combining mutations.

A close examination of metabolic profiles in different JA pathway mutants led us to the first description of a metabolic route leading to the abundant jasmonate TA. Several lines of genetic evidence indicate that TA accumulation is achieved by a route that is dependent on JA conjugation, oxidation, and cleavage. First, the *jar1* mutation lowers by more than half the TA content compared with WT. The remaining TA accumulating in *jar1* may arise through a *JAR1*-independent route, for example, by cleaving other oxidized JA-amino acid conjugates generated by distinct GH3 enzymes, but such conjugate pools seem quantitatively minor in wounded *Arabidopsis* leaves (46) to account for the significant levels of TA in *jar1*. Alternatively, the *jar1*-independent TA pool may reflect the existence of a direct JA-hydroxylation route by still unknown hydroxylase(s). Under our conditions, none of the 6 recombinant *Arabidopsis* CYP94 proteins showed JA-hydroxylase activity.⁴ Second, mutants in *cyp94* genes that govern JA-Ile oxidation displayed reduced TA levels despite of abundant JA supply similarly to *jar1*, questioning the importance of direct hydroxylation for TA formation. The higher abundance of TA in *cyp94b3c1* than in *cyp94c1* is well correlated with more 12OH-JA-Ile being available in the double mutant because of impaired 12COOH-JA-Ile formation (Fig. 2). Third, depleting either *IAR3* or *ILL6* amidohydrolase resulted in hyperaccumulation of 12OH-JA-Ile with a concomitant reduction in TA levels (Fig. 6), pointing to a direct substrate-product link between these two JAs. The analysis of two known TA modification routes confirmed that TA itself is a metabolic intermediate. Abundance of both 12-HSO₄-JA and TA-Glc was correlated with TA levels in the different genetic backgrounds. This characteristic makes them direct TA derivatives and extends the number of JAs whose formation requires a conjugation-oxidation-deconjugation cascade.

The impact of amidohydrolase inactivation was much stronger on the two oxidized conjugates than on JA-Ile. As discussed above, an excess of uncleaved JA-Ile or 12OH-JA-Ile can alternatively be cleared by enhanced CYP94-mediated oxidation that shifts the pool of jasmonates toward more oxidized conjugates. The fate of the long-lived 12COOH-JA-Ile is the less well known. We have described its first chemical synthesis that

- tion, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* **111**, 1021–1058
3. Erb, M., Meldau, S., and Howe, G. A. (2012) Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci.* **17**, 250–259
 4. Koo, A. J., and Howe, G. A. (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**, 1571–1580
 5. Verhage, A., Vlaardingbroek, I., Raaymakers, C., Van Dam, N. M., Dicke, M., Van Wees, S. C., and Pieterse, C. M. (2011) Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Front. Plant Sci.* **2**, 47
 6. Mithöfer, A., and Boland, W. (2012) Plant defense against herbivores. Chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**, 431–450
 7. Wu, J., and Baldwin, I. T. (2010) New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 1–24
 8. Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E. E., and Wolfender, J. L. (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J. Biol. Chem.* **283**, 16400–16407
 9. Glauser, G., and Wolfender, J. L. (2013) A non-targeted approach for extended liquid chromatography-mass spectrometry profiling of free and esterified jasmonates after wounding. *Methods Mol. Biol.* **1011**, 123–134
 10. Chung, H. S., Koo, A. J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. D., and Howe, G. A. (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* **146**, 952–964
 11. Koo, A. J., and Howe, G. A. (2012) Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine. *Front. Plant Sci.* **3**, 19
 12. Yoshihara, T., Omer, E.-L. A., Koshino, H., Sakamura, S., Kikuta, Y., and Koda, Y. (1989) Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2835–2837
 13. Gidda, S. K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., and Varin, L. (2003) Biochemical and molecular characterization of a hydroxy-jasmonate sulfoxyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**, 17895–17900
 14. Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., and Wasternack, C. (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* **177**, 114–127
 15. Nakamura, Y., Mithöfer, A., Kombrink, E., Boland, W., Hamamoto, S., Uozumi, N., Tohma, K., and Ueda, M. (2011) 12-Hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiol.* **155**, 1226–1236
 16. Staswick, P. E., and 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
 17. Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., and Suza, W. (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**, 616–627
 18. Fonseca, S., Chico, J. M., and Solano, R. (2009) The jasmonate pathway. The ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 539–547
 19. Katsir, L., Chung, H. S., Koo, A. J., and Howe, G. A. (2008) Jasmonate signaling. A conserved mechanism of hormone sensing. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 428–435
 20. Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., Werck-Reichhart, D., and Pinot, F. (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
 21. Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., Matsui, H., Nabeta, K., and 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
 22. Koo, A. J., Cooke, J. F., and 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
 23. Mizutani, M., and Ohta, D. (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 291–315
 24. Piotrowska, A., and Bajguz, A. (2011) Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**, 2097–2112
 25. Schuller, A., and Ludwig-Müller, J. (2006) A family of auxin conjugate hydrolases from *Brassica rapa*. Characterization and expression during clubroot disease. *New Phytol* **171**, 145–157
 26. Campanella, J. J., Smith, S. M., Leib, D., Wexler, S., and Ludwig-Müller, J. (2008) The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their expression during the interaction with two symbionts. *J. Plant Growth Regul.* **27**, 26–38
 27. Rampey, R. A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G., and Bartel, B. (2004) A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiol.* **135**, 978–988
 28. Davies, R. T., Goetz, D. H., Lasswell, J., Anderson, M. N., and Bartel, B. (1999) IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 365–376
 29. Titarenko, E., Rojo, E., León, J., and Sánchez-Serrano, J. I. (1997) Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**, 817–826
 30. Berr, A., McCallum, E. J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T., and Shen, W. H. (2010) *Arabidopsis* histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol.* **154**, 1403–1414
 31. Birkenbihl, R. P., Diezel, C., and Somssich, I. E. (2012) *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol.* **159**, 266–285
 32. Kramell, T., Schmidt, J., Schneider, G., Sembdner, G., and Schreiber, K. (1988) Synthesis of *n*-(jasmonoyl)amino acid conjugates. *Tetrahedron* **44**, 5791–5807
 33. Matsuura, H., Ohmori, F., Kobayashi, M., Sakurai, A., and Yoshihara, T. (2000) Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonoids in potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2380–2387
 34. Ogawa, N., and Kobayashi, Y. (2012) Synthesis of the amino acid conjugates of *epi*-jasmonic acid. *Amino Acids* **42**, 1955–1966
 35. Nicolau, K. C., Estrada, A. A., Zak, M., Lee, S. H., and Safina, B. S. (2005) A mild and selective method for the hydrolysis of esters with trimethyltin hydroxide. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 1378–1382
 36. LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuura, S. P., and Bartel, B. (2002) Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 20446–20452
 37. VanDoorn, A., Bonaventure, G., Schmidt, D. D., and Baldwin, I. T. (2011) Regulation of jasmonate metabolism and activation of systemic signaling in *Solanum nigrum*. COI1 and IAR4 play overlapping yet distinct roles. *New Phytol.* **190**, 640–652
 38. Campanella, J. J., Larko, D., and Smalley, J. (2003) A molecular phylogenetic analysis of the ILR1-like family of IAA amidohydrolase genes. *Comp. Funct. Genomics* **4**, 584–600
 39. Toufighi, K., Brady, S. M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N. J. (2005) The Botany Array Resource. e-Northern, expression angling, and promoter analyses. *Plant J.* **43**, 153–163
 40. Woldemariam, M. G., Onkokesung, N., Baldwin, I. T., and Galis, I. (2012) Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *Plant J.* **72**, 758–767
 41. Seto, Y., Hamada, S., Matsuura, H., Matsushige, M., Satou, C., Takahashi, K., Masuta, C., Ito, H., Matsui, H., and Nabeta, K. (2009) Purification and cDNA cloning of a wound inducible glucosyltransferase active toward 12-hydroxy jasmonic acid. *Phytochemistry* **70**, 370–379
 42. Ludwig-Müller, J. (2011) Auxin conjugates. Their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* **62**, 1757–1773
 43. Staswick, P. (2009) Plant hormone conjugation. A signal decision. *Plant Signal. Behav.* **4**, 757–759
 44. Bartel, B., and Fink, G. R. (1995) ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* **268**, 1745–1748

Downloaded from <http://www.jbc.org/> at Université Louis Pasteur on March 17, 2014

Jasmonate Conjugate Cleavage and Tuberonic Acid Formation

45. Todoroki, Y., Narita, K., Muramatsu, T., Shimomura, H., Ohnishi, T., Mizutani, M., Ueno, K., and Hirai, N. (2011) Synthesis and biological activity of amino acid conjugates of abscisic acid. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 1743–1750
46. Koo, A. J., Gao, X., Jones, A. D., and Howe, G. A. (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J.* **59**, 974–986
47. Bhosale, R., Jewell, J. B., Hollunder, J., Koo, A. J., Vuylsteke, M., Michael, T., Hilson, P., Goossens, A., Howe, G. A., Browse, J., and Maere, S. (2013) Predicting gene function from uncontrolled expression variation among individual wild-type *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*. doi:10.1105/tpc.113.112268

RESULTATS partie 2 :
Catabolisme de JA-Ile et homéostasie
de jasmonates dans deux autres
modèles biologiques de
signalisation JA

5 IMPACT DU METABOLISME OXYDATIF DE JA- ILE PAR CYP94B3 ET CYP94C1 SUR LES REPOSSES AU PATHOGENE NECROTROPHE *BOTRYTIS CINEREA*

5.1 Introduction

Les pathogènes biotrophes ont besoin de maintenir les cellules de plante vivantes pour proliférer, alors que les pathogènes nécrotrophes doivent tuer les cellules de plante pour rendre les substances nutritives accessibles et pouvoir croître et accomplir leur cycle de vie. Les pathogènes nécrotrophes, incluant *Botrytis cinerea* (responsable de la pourriture grise) et *Alternaria brassicola*, sont la plus grande classe de pathogènes fongiques et sont responsables de pertes de récoltes importantes (Łażniewska et al., 2010). L'étude des réponses de défense des plantes contre ces pathogènes a donc un intérêt économique.

Généralement, alors que les réponses de défense contre les pathogènes biotrophes sont contrôlées par SA (Vlot et al., 2009), les réponses de défense contre les pathogènes nécrotrophes sont induites par les voies de signalisation JA et éthylène (Farmer et al., 2003).

Nous avons vu que les CYP94s sont impliqués dans l'élimination de JA-Ile dans les feuilles blessées. Ces enzymes ont un rôle potentiel dans le contrôle des niveaux d'hormone dans les feuilles infectées par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. Dans ce cas, la perte de ces P450s devrait permettre d'obtenir des niveaux d'hormone plus élevés dans les feuilles infectées, qui pourraient conduire à des réponses de défense plus intenses et à une augmentation de la résistance chez les plantes *cyp94s*.

Nous avons utilisé les outils métaboliques et génétiques développés précédemment pour étudier le métabolisme oxydatif de JA-Ile par les CYP94s et son impact sur les réponses de défenses antimicrobiennes.

5.2 Résultats

5.2.1 Recherche de 12COOH-JA-Ile au cours de l'infection foliaire d'*Arabidopsis thaliana* par *Botrytis cinerea*

Le métabolisme oxydatif catalysé par les CYP94s diminue les niveaux de l'hormone JA-Ile dans les feuilles blessées (Heitz et al., 2012). Nous avons émis l'hypothèse qu'un métabolisme similaire existerait également lors de l'infection fongique par *Botrytis cinerea*. Pour déterminer si l'hormone peut être oxydée dans ce contexte, nous avons inoculé des spores de *Botrytis cinerea* à des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage cultivées en terre, puis extrait les métabolites et recherché les dérivés oxydés de JA-Ile par UPLC-MS/MS.

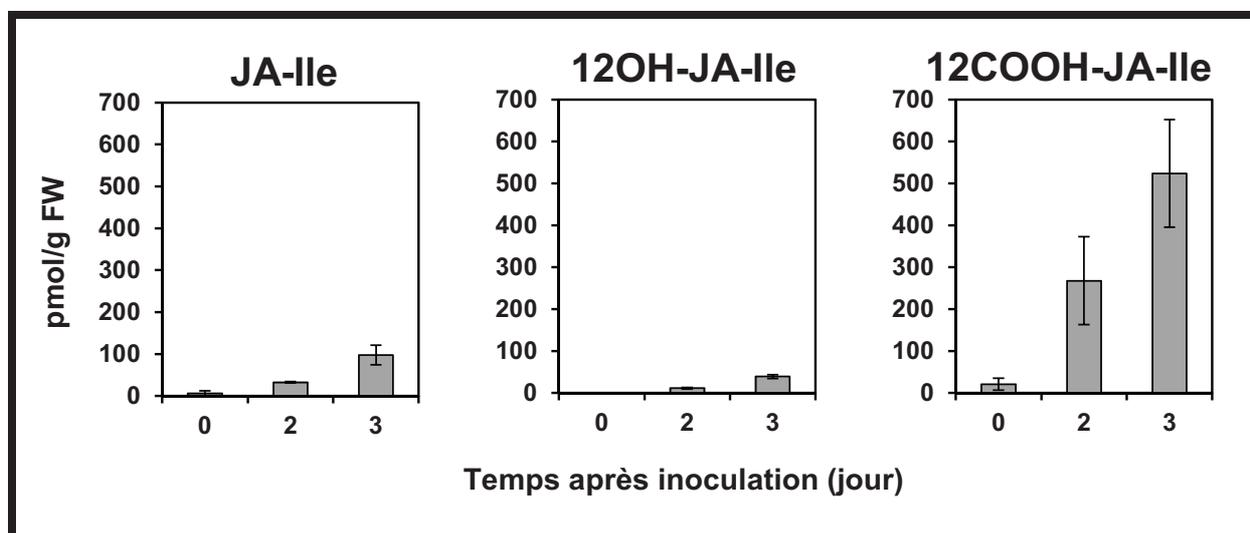


Figure 5-1 : Niveaux de JA-Ile, 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage (Col0) au cours de l'infection par *Botrytis cinerea*. Les niveaux de JA-Ile, 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile ont été déterminés par UPLC-MS/MS, dans les échantillons de feuilles non inoculées ou infectées (2 ou 3 jours après inoculation).

Comme le montre la figure 5-1, les niveaux de JA-Ile et de 12OH-JA-Ile augmentent au cours de l'infection pour atteindre 97 et 39 pmol/g de poids frais respectivement 3 jours après inoculation. Ces mesures quantifiées confirment l'accumulation de ces composés au cours de l'infection par *Botrytis cinerea*. Le 12COOH-JA-Ile est également accumulé dans les feuilles infectées, avec un niveau de 524 pmol/g de poids frais 3 jours après infection, soit 5 fois plus que celui de JA-Ile. Comme nous l'avions supposé, les composés 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile sont donc accumulés lors de l'infection, ce qui confirme que le métabolisme oxydatif de JA-Ile existe dans ce contexte biologique.

5.2.2 Expression des *CYP94s* au cours de l'infection foliaire par *Botrytis cinerea*

Nous avons détecté une accumulation croissante des formes hydroxylées et carboxylées de JA-Ile au cours de l'infection. Pour déterminer si des membres de la famille des *CYP94s* pourraient être impliqués dans leur production, nous avons examiné l'expression des 6 membres de la famille *CYP94* au cours de l'infection par RT-qPCR.

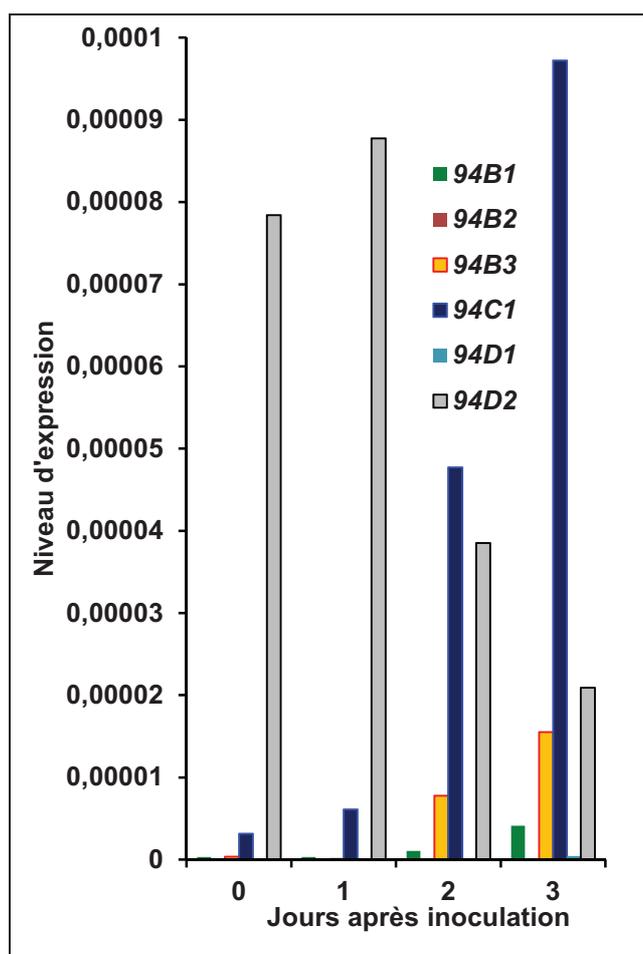


Figure 5-2 : Expression des 6 gènes *CYP94s* au cours d'une infection foliaire par *Botrytis cinerea* chez des plantes de type sauvage. Le niveau d'expression de chaque gène est indiqué, dans les feuilles saines (jour 0) et dans les feuilles inoculées (après 1, 2 ou 3 jours suivant l'inoculation).

Les niveaux d'expression des 6 gènes au cours du temps après inoculation sont représentés dans la figure 5-2 et exprimés en expression corrigée par celle de deux gènes de référence. Les profils transcriptionnels des 6 gènes *CYP94s* sont différents. L'expression de *CYP94D2* est la plus forte dans les feuilles non-inoculées. Cependant, l'expression de ce gène diminue au cours de l'infection, ce qui suggère que ce P450 ne participe pas à la production des formes oxydées de JA-Ile. L'expression de *CYP94B2* est indétectable dans les feuilles

saines et dans les feuilles infectées. Celle de *CYP94D1* est indétectable dans les feuilles non-inoculées et très faible 3 jours après inoculation. L'expression de *CYP94B1*, *CYP94B3* et *CYP94C1* augmente au cours de l'infection, celles de *CYP94B3* et *CYP94C1* étant les plus fortes. Ces données transcriptionnelles indiquent qu'il est possible que les enzymes CYP94B3 et CYP94C1 catalysent la production des formes oxydées de JA-Ile qui s'accumulent au cours de l'infection.

5.2.3 Niveaux de jasmonates des plantes mutantes ayant des expressions de *CYP94B3* et *CYP94C1* modifiées

Pour déterminer le rôle potentiel de CYP94B3 et CYP94C1 dans le métabolisme de JA-Ile dans les feuilles infectées, l'analyse des jasmonates des feuilles infectées des mutants *cyp94b3*, *cyp94c1*, *cyp94b3c1* et de plantes sur-exprimant *CYP94C1* a été effectuée.

Les niveaux de JA-Ile et de ses formes oxydées ainsi que de JA et de 12OH-JA ont été déterminés chez les plantes de type sauvage (Col0) et les mutants (figure 5-3). Chez *cyp94c1* et *cyp94b3c1*, les niveaux de 12OH-JA-Ile sont proches de ceux des plantes de type sauvage (hormis pour *cyp94c1* 3 jours après inoculation) tandis que les quantités de 12COOH-JA-Ile sont fortement réduites. Ces résultats indiquent que CYP94C1 joue un rôle majeur dans l'accumulation de 12COOH-JA-Ile lors de l'infection. Chez OEC1, les quantités de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile sont beaucoup plus élevées par rapport à Col0, tandis que les niveaux de JA-Ile sont légèrement affaiblis. Ces résultats montrent que la surexpression de CYP94C1 a essentiellement un effet sur les niveaux des formes oxydées de JA-Ile. Les modifications des niveaux de JA et de 12OH-JA chez les mutants sont semblables à celles des niveaux de JA-Ile. Les quantités de JA-Ile sont au moins deux fois plus élevées chez les plantes *cyp94b3*, *cyp94c1* et *cyp94b3c1*, indiquant que les enzymes CYP94B3 et CYP94C1 jouent un rôle important dans la gestion des niveaux d'hormone.

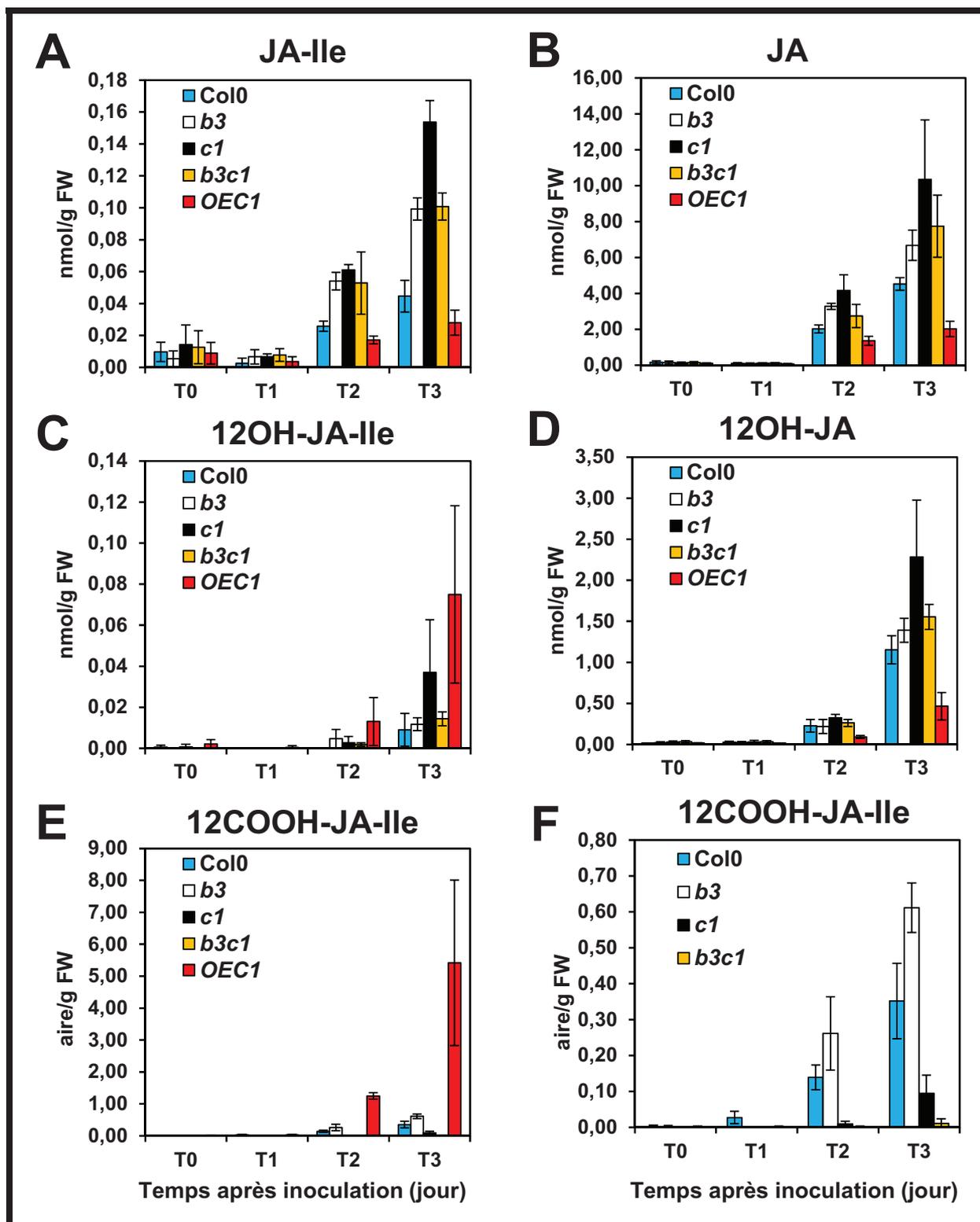


Figure 5-3 : Niveaux de jasmonates chez des mutants d'expression de *CYP94B3* et *CYP94C1*. Les dosages de JA-Ile (A), JA (b), 12OH-JA-Ile (C), 12OH-JA (D) et 12COOH-JA-Ile (E) ont été effectués par analyse UPLC-MS/MS. Pour des raisons de lisibilité, les quantités relatives de 12COOH-JA-Ile sont montrées pour tous les mutants dans l'histogramme de gauche (E) alors que celui de droite ne présente pas les niveaux du mutant sur-exprimant *CYP94C1* (F).

5.2.4 Résistance des plantes mutantes ayant des expressions de *CYP94B3* et *CYP94C1* modifiées

CYP94B3 et *CYP94C1* assurent la gestion catabolique des niveaux de JA-Ile après blessure et nous avons observé que l'expression de leurs gènes est induite par l'infection. Nous avons observé que les plantes mutantes *cyp94s* accumulent des niveaux plus élevés d'hormone. Un gain de résistance pourrait donc être obtenu. Pour déterminer si *CYP94B3* et *CYP94C1* ont un impact sur la résistance des plantes, nous avons observé les feuilles nécrosées de plantes mutantes (figure 5-4) et avons mesuré la taille des lésions trois jours après inoculation (figure 5-5). Contrairement à ce qui était attendu, la taille des lésions mesurées chez les mutants est similaire à celle des plantes de type sauvage. Le test statistique indique également que les plantes sur-exprimant *CYP94C1* ont des nécroses significativement plus grandes que celles des plantes de type sauvage. Un niveau seuil de JA-Ile assez élevé pourrait donc être requis pour promouvoir les défenses.

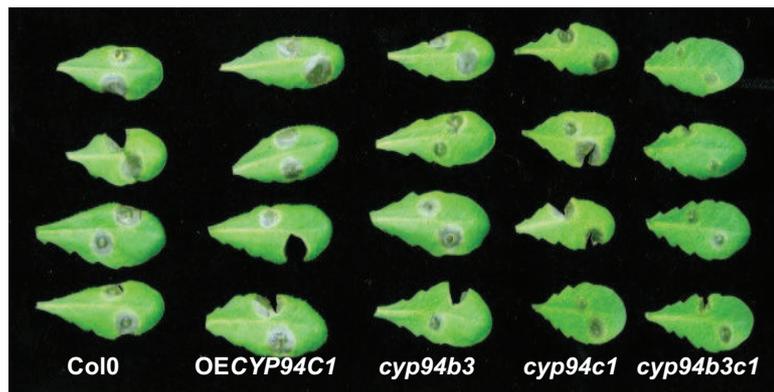


Figure 5-4 : Photographies de lésions obtenues 3 jours après inoculation de spores de *Botrytis cinerea* sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage ou mutantes pour l'expression de deux *CYP94s*. Quatre feuilles représentatives sont présentées verticalement par génotype. Les génotypes de plante étudiés sont : plantes de type sauvage (Col0), sur-exprimant *CYP94C1*, *cyp94b3*, *cyp94c1* et le double mutant *cyp94b3c1*.

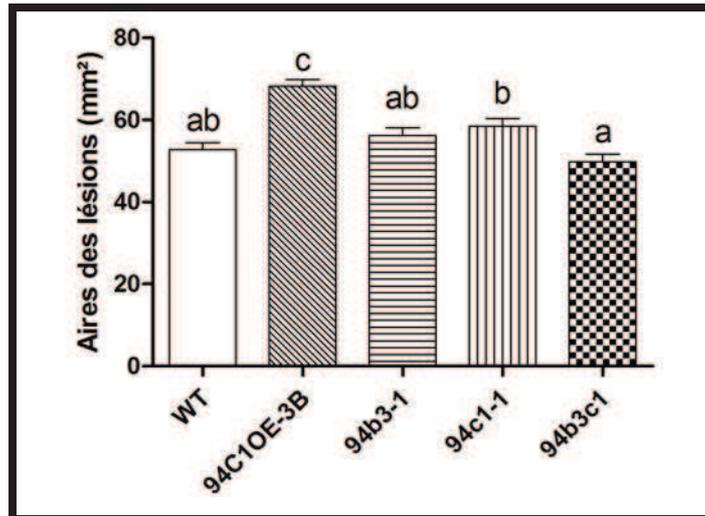


Figure 5-5 : Taille des lésions observées 3 jours après inoculation de spores de *Botrytis cinerea* sur des feuilles d'Arabidopsis de type sauvage ou mutantes pour l'expression de *CYP94s*. Les mutants inoculés sont *cyp94b3* (94b3-1), *cyp94c1* (94c1-1), *cyp94b3c1* (94b3c1) et OEC1 (94C1OE-3B). Le test statistique à comparaison multiple Kruskal-Dunn ($P < 0.05$) a été effectué par Yann Aubert. Les histogrammes marqués de lettres différentes indiquent une différence significative.

Pour estimer la biomasse fongique, la quantité relative d'ADN de *Botrytis cinerea* a été mesurée par qPCR dans les échantillons de feuilles infectées (figure 5-6).

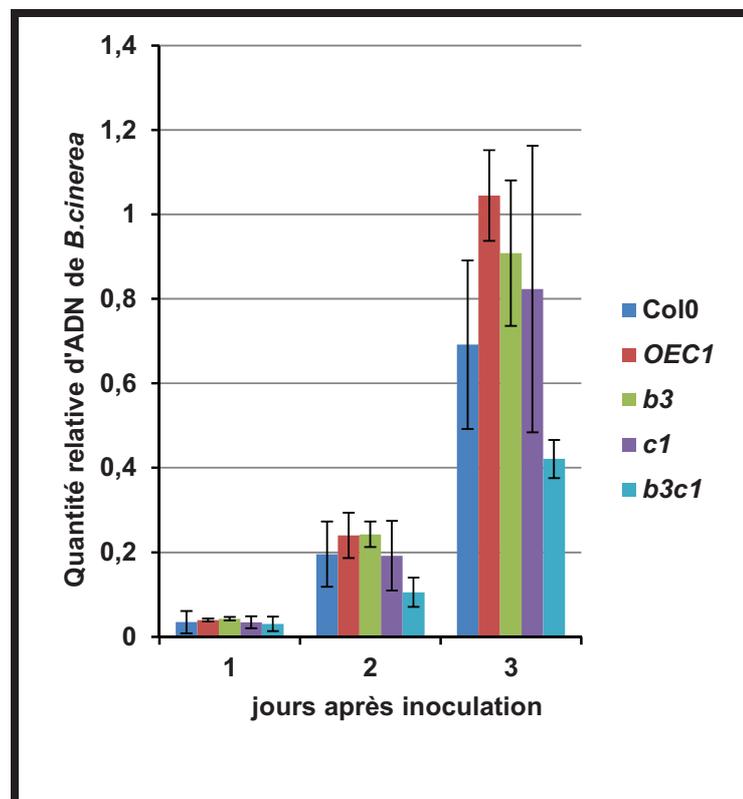


Figure 5-6 : Quantité relative d'ADN de *Botrytis cinerea* au cours de l'infection chez les plantes de type sauvage (Col0), mutantes *cyp94b3*, *cyp94c1*, *cyp94b3c1* ou sur-exprimant *CYP94C1* (OEC1). Quantification relative d'ADN de *Botrytis cinerea* (gène CutinaseA) par rapport à la quantité d'ADN de plante (gène Actine2) par qPCR. Le niveau maximum observé chez OEC1 est fixé à 1.

Le champignon se développant au cours de l'infection, il est logique de voir des quantités relatives d'ADN fongique croissantes au cours du temps après inoculation. Conformément aux tailles de lésion supérieures mesurées chez OEC1 3 jours après inoculation, la quantité relative de champignon est également plus élevée par rapport au sauvage. Il apparaît donc que les plantes sur-exprimant *CYP94C1* ont une résistance affaiblie. Les quantités relatives de champignon mesurées chez les mutants simples sont similaires à celles de Col0 sauvage. Au contraire, celles du double mutant sont plus faibles à T3, suggérant que malgré des tailles de lésions similaires au contrôle, la prolifération de *Botrytis cinerea* pourrait être amoindrie en l'absence simultanée de *CYP94B3* et *CYP94C1*.

Contrairement à ce que nous attendions, un fort gain de résistance chez les plantes KO n'a pas pu être observé. Ces résultats montrent qu'une élévation du niveau de JA-Ile n'entraîne pas nécessairement un fort gain de résistance. En revanche, un fort phénotype de résistance affaiblie a été observé chez les plantes sur-exprimant *CYP94C1*.

5.2.5 Expression des *CYP94s* chez les mutants inoculés

Le profil de jasmonates est profondément modifié chez les mutants KO et OEC1, avec un impact significatif de *CYP94B3* et *CYP94C1* sur le degré d'oxydation des composés. Pour déterminer si l'expression d'autres *CYP94s* pourrait être affectée chez ces mutants, nous avons examiné l'expression de chaque *CYP94* dans les différents génotypes. Dans tous les génotypes, l'expression de *CYP94D2* n'est pas modifiée (figure 5-7) et l'expression de *CYP94B2* est indétectable. L'expression des autres gènes est au contraire affectée (figure 5-7). Chez OEC1, l'expression de *CYP94B1* est diminuée, alors qu'elle est augmentée chez le double mutant. Ce résultat est cohérent avec le fait que *CYP94B1* fait partie des nombreux gènes régulés par la voie JA, et ses transcrits sont corrélés avec les niveaux de JA-Ile. Chez les mutants simples et le double *cyp94b3c1*, l'expression de *CYP94D1* est augmentée. De manière étonnante, l'expression de *CYP94B3* est plus forte chez le KO et chez le sur-expresseur de *CYP94C1*. L'ensemble de ces résultats indique que modifier l'expression d'un ou de plusieurs *CYP94s* peut avoir des conséquences sur l'expression d'autres *CYP94s*. De manière plus générale, la manipulation de l'expression des *CYP94s* pourrait impacter l'expression de nombreux gènes.

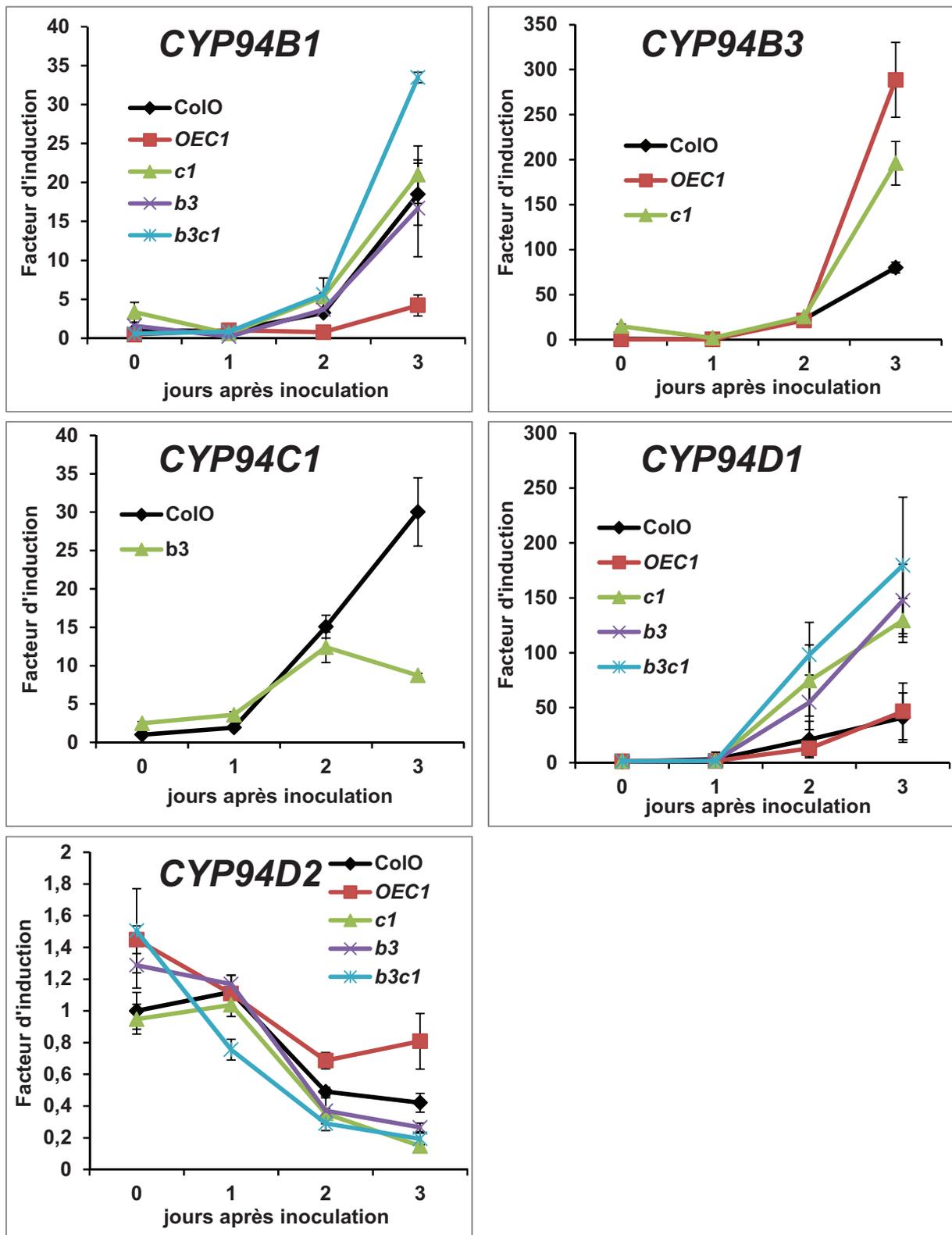


Figure 5-7 : Expression des gènes *CYP94B1*, *CYP94B3*, *CYP94C1*, *CYP94D1*, *CYP94D2* dans les feuilles des différents génotypes mutants en réponse à l'infection par *Botrytis cinerea*. Les génotypes mutants inoculés sont : *cyp94c1* (*c1*), *cyp94b3* (*b3*), *cyp94b3c1* (*b3c1*), sur-expresser de *CYP94C1* (*OEC1*). L'expression de chaque gène est rapportée à son expression dans les feuilles de plantes de type sauvage (*ColO*) non inoculées (jour 0) qui a été fixée à 1.

5.2.6 Etude des réponses transcriptionnelles de gènes de défense ou de signalisation chez les plantes mutantes infectées

5.2.6.1 Expression de gènes de défense

Les mutants *cyp94b3*, *cyp94c1* et le double mutant *cyp94b3c1* présentent des niveaux de JA-Ile plus élevés mais qui ne sont pas associés systématiquement à un gain de résistance. Comme illustré précédemment, la mutation de *CYP94s* peut avoir un effet sur l'expression de gènes. Pour essayer de comprendre pourquoi ces mutants ne sont pas plus résistants que les plantes sauvages et pourquoi le mutant OEC1 voit sa résistance affaiblie, nous avons examiné l'expression de gènes de défense induits par *Botrytis cinerea*.

L'induction de l'expression des gènes de défense marqueurs des voies JA et éthylène *PDF1.2* et *PR4* est présentée dans la figure 5-8. Les expressions de ces gènes sont très fortement induites chez les plantes de type sauvage. Le facteur d'induction de *PDF1.2* est particulièrement élevé, du fait d'un niveau très faible avant inoculation. Cette amplitude est modérément augmentée chez les mutants KO. L'absence de gain de résistance pourrait donc s'expliquer par des réponses de défense similaires à celles des contrôles. Au contraire, chez OEC1, l'expression de *PR4* est fortement réduite et celle de *PDF1.2* quasiment abolie. Ces réponses de défense altérées sont cohérentes avec la perte de résistance de ce mutant.

L'expression de *PR1* est induite par la voie SA, qui promeut essentiellement des réponses de défense efficaces contre les pathogènes biotrophes. Les voies JA et SA induisent des spectres de défense spécifiques et s'inhibent mutuellement (Gimenez-Ibanez et Solano, 2013). Nous avons voulu savoir si une dérégulation du catabolisme de JA-Ile impacte la voie SA. L'expression du gène marqueur de la voie SA *PR1* est 6 fois plus induite chez OEC1 par rapport aux plantes de type sauvage (figure 5-8). Chez OEC1, la légère diminution de JA-Ile pourrait lever partiellement l'inhibition que cette hormone exerce sur la voie SA, ce qui permettrait d'augmenter les niveaux de SA et finalement d'induire davantage la transcription de *PR1*. Il se peut également que l'excès de 12COOH-JA-Ile chez OEC1 puisse avoir un effet inhibiteur sur la signalisation JA, ce qui permettrait également de lever la répression sur la voie SA. La perte de résistance d'OEC1 pourrait donc s'expliquer également par l'induction de réponses inadaptées au pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea*.

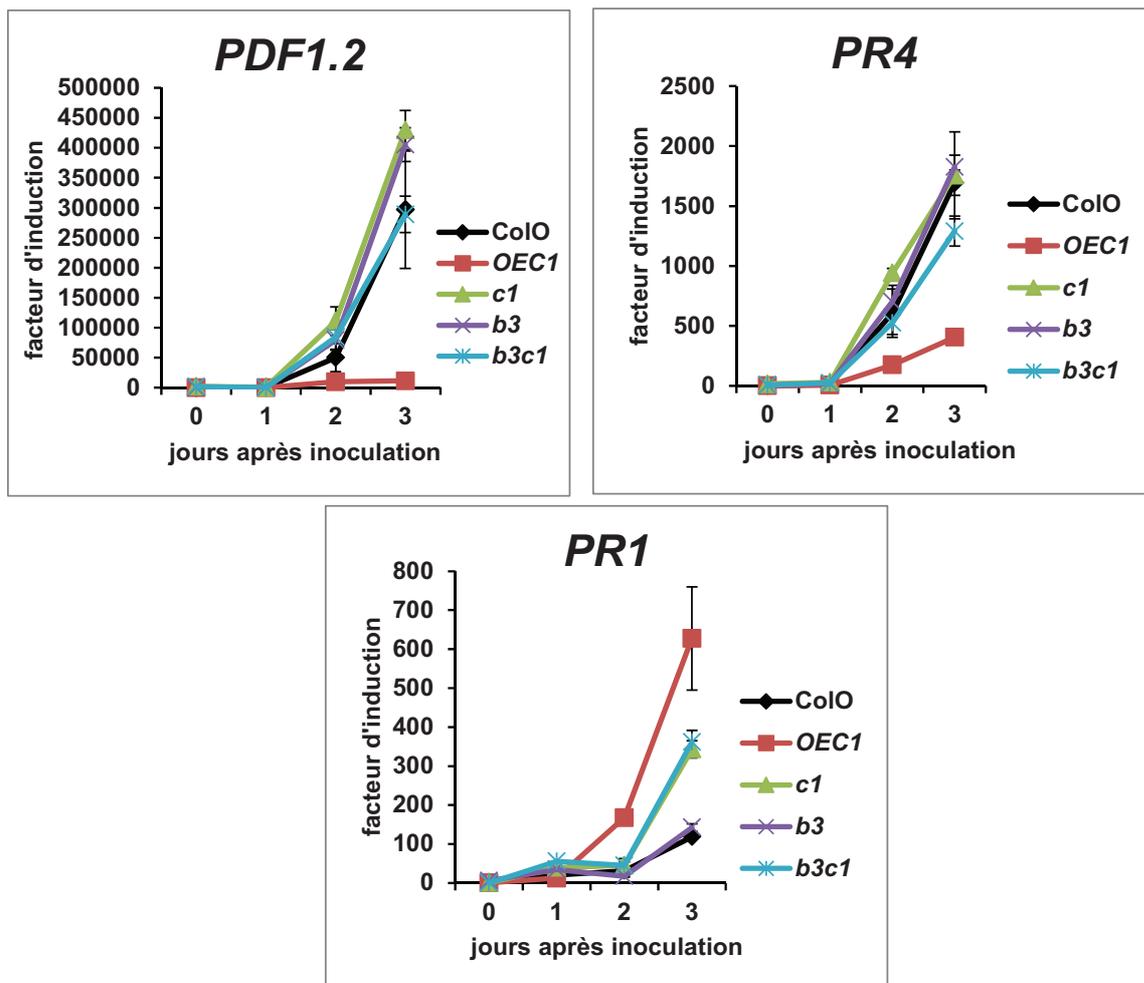


Figure 5-8 : Expression des gènes marqueurs des voies JA et éthylène *PDF1.2* et *PR4* ainsi que du gène *PR1*, marqueur de la voie SA, chez les mutants *CYP94s*. L'expression des gènes a été mesurée au cours de l'infection par *Botrytis cinerea* chez les plantes de type sauvage (Col0) et les mutants *cyp94c1* (*c1*), *cyp94b3* (*b3*), *cyp94b3c1* (*b3c1*) et le sur-expresser de *CYP94C1* (*OEC1*). L'expression de chaque gène est rapportée à son expression dans les feuilles sauvages Col0 non inoculées, qui a été fixée à 1.

5.2.6.2 Expression des facteurs de transcription *MYC2* et *ERF1*

L'expression de gènes de défense est contrôlée par des facteurs de transcription. La voie JA induit l'expression de gènes de défense principalement par 2 branches, contrôlées par des facteurs de transcription différents : les gènes de réponse à la blessure et aux insectes herbivores sont transcrits notamment par *MYC2*, tandis que l'expression des gènes de défense contre les pathogènes nécrotrophes (cf. *PDF1.2*) est induite par les facteurs de transcription *ERF1* et *ORA59* (voir introduction, figure 1-16). Il existe un antagonisme entre ces 2 voies (Wasternack et Hause, 2013).

Afin de déterminer si les modifications de l'expression des gènes de défense *PDF1.2* et *PR4* (figure 5-8) pourraient provenir de perturbations au niveau de ces facteurs de transcription, nous avons mesuré l'expression de *MYC2* et *ERF1*. La figure 5-9 indique que comme attendu, l'expression de *MYC2* est peu induite en réponse à un champignon nécrotrophe, et est inchangée dans son ordre de grandeur chez les différents mutants. De manière cohérente, les transcrits des gènes inductibles par la blessure, *JR1* et *JR2* (Leon et al., 1998), sont également stables chez le sauvage, et peu affectés chez les mutants. Ces données montrent que la branche *MYC2*-dépendante de la voie jasmonate n'est pas perturbée massivement par le déséquilibre de l'oxydation de JA-Ile. Les modifications d'expression de *PDF1.2* et de *PR4*, particulièrement leur forte chute chez *OEC1*, ne semblent donc pas provenir d'un excès de signalisation de *MYC2*.

Au contraire de *MYC2*, *ERF1* est induit fortement (800 x) à T3 chez les plantes sauvages, et cette induction est amoindrie chez *OEC1*. Inversement, *ERF1* est sur-induit de façon spectaculaire à T2 chez les 3 lignées KO. Ces résultats indiquent une dé-régulation forte de ce facteur de transcription qui pourrait être une conséquence des niveaux modifiés de JA-Ile chez les mutants KO. Il est surprenant qu'un tel excès de *ERF1* ne s'accompagne pas d'une sur-expression proportionnée des gènes cibles, représentés par les marqueurs de défense *PDF1.2* et *PR4*.

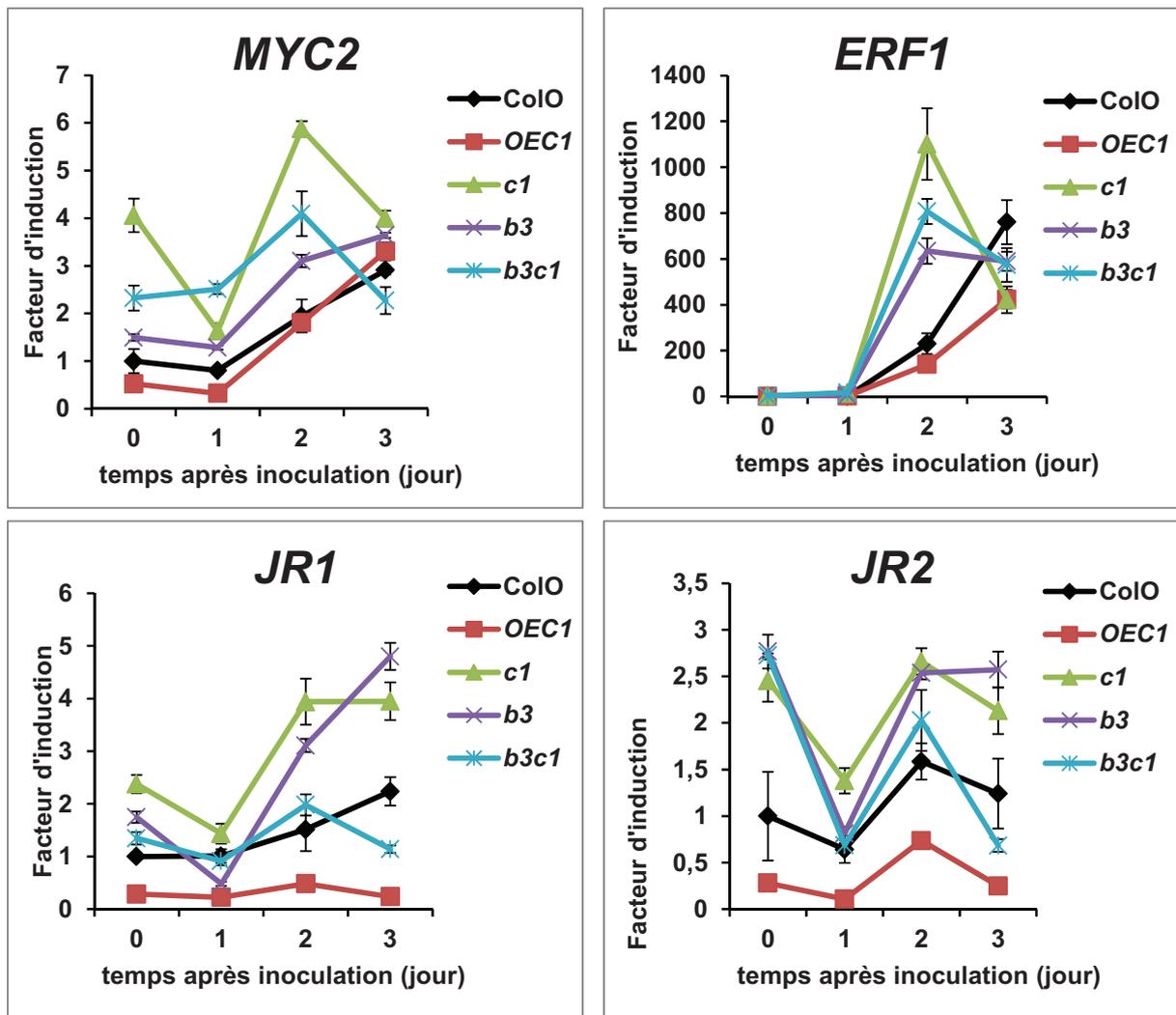


Figure 5-9 : Expression des gènes des facteurs de transcription *MYC2* et *ERF1* ainsi que des gènes de réponse à la blessure *JR1* et *JR2* dans les feuilles inoculées des différents génotypes mutants. Les génotypes mutants inoculés sont : *cyp94c1* (*c1*), *cyp94b3* (*b3*), *cyp94b3c1* (*b3c1*), surexpressueur de *CYP94C1* (*OEC1*). L'expression du gène est rapportée à son expression dans les feuilles de plantes de type sauvage (*Col0*) non inoculées (jour 0).

5.2.6.3 Expression des répresseurs JAZs

Les plantes KO pour *CYP94B3* ou/et *CYP94C1* ont des niveaux de JA-Ile augmentés par rapport au sauvage, pourtant nous n'avons pas observé de fort gain de résistance antifongique. *PDF1.2* et *PR4* ne sont pas induits davantage, malgré l'expression exagérée d'*ERF1* qui agit en amont dans la signalisation. Il semble donc que l'excès de JA-Ile ait un impact positif sur l'élément de signalisation *ERF1* mais que d'autres facteurs contrent cette signalisation et empêchent un gain de défense. Il se pourrait donc que des rétro-contrôles négatifs se mettent en place pour limiter l'amplitude des défenses induites chez ces mutants. Les protéines JAZs sont des répresseurs majeurs des réponses aux jasmonates. Afin de

déterminer si la perte de CYP94s peut avoir un effet sur les répresseurs, nous avons analysé l'expression des 12 gènes *JAZs* chez les mutants, parallèlement aux plantes de type sauvage.

La figure 5-10 montre que l'expression des 12 *JAZs* est régulée différemment en réponse à l'infection par *Botrytis cinerea* chez les plantes sauvages. Plusieurs groupes de gènes peuvent être distingués en fonction de leur réponse au champignon et de l'impact des mutations. Un premier groupe formé de *JAZ3*, *4*, *10*, *11* et *12* a une expression quasi-constante, et insensible aux mutations *cyp94*. Les gènes du groupe II, formé de *JAZ1*, *2* et *5* sont stimulés à divers degrés chez les plantes sauvages, essentiellement inchangés chez OEC1, mais sont considérablement sur-stimulés chez les mutants déficients en *CYP94*. Inversement, les gènes du groupe III, composé de *JAZ 6*, *8* et *9* voient leur expression réduite chez OEC1, alors qu'elle reste comparable au sauvage chez les mutants. Enfin, *JAZ7* se distingue des autres *JAZ* car son expression est dérégulée chez tous les mutants.

Ces résultats montrent de façon intéressante que l'impact de la perturbation du catabolisme oxydatif de l'hormone JA-Ile est très contrasté entre les différents groupes de gènes *JAZs*. Les promoteurs des différents groupes de gènes *JAZs* réagissent distinctement au défaut ou à l'excès d'oxydation de JA-Ile. Les fonctions individuelles de chaque répresseur *JAZ* ne sont pas encore élucidées, mais on peut prédire que leur dérégulation pourrait contribuer aux phénotypes de défense et de résistance observés. L'augmentation de l'induction transcriptionnelle de *JAZ1*, *JAZ2* et surtout *JAZ5* chez les KO pourrait être un mécanisme de rétrocontrôle négatif sur les réponses terminales de la voie JA, notamment sur l'expression des gènes de défense. Ainsi, chez ces mutants accumulant un excès de JA-Ile et de transcrits d'*ERF1*, une stimulation massive des défenses serait empêchée par une réponse accrue de certains gènes *JAZs*. La synthèse abondante de ces protéines *JAZs* surpasserait les capacités de protéolyse promue par l'excès de JA-Ile. Les gènes *JAZs* du groupe III voient leur expression moins induite chez OEC1, à l'instar des gènes de défense. La moindre induction de ces gènes, (et éventuellement une moindre répression) ne suffit pas pour assurer une expression robuste de *PDF1.2* et de *PR4*. Les plantes OEC1 sont également caractérisées par des niveaux de 12COOH-JA-Ile très élevées, et l'impact éventuel de ce métabolite sur la signalisation reste à découvrir. Ces résultats indiquent que la modification de l'expression des *CYP94s* impacte l'expression de l'ensemble des *JAZs* induites par *Botrytis cinerea*. Les voies métaboliques définies par *CYP94B3* et *CYP94C1* jouent donc un rôle clé dans la régulation transcriptionnelle des répresseurs *JAZs* et des gènes cibles qu'ils contrôlent.

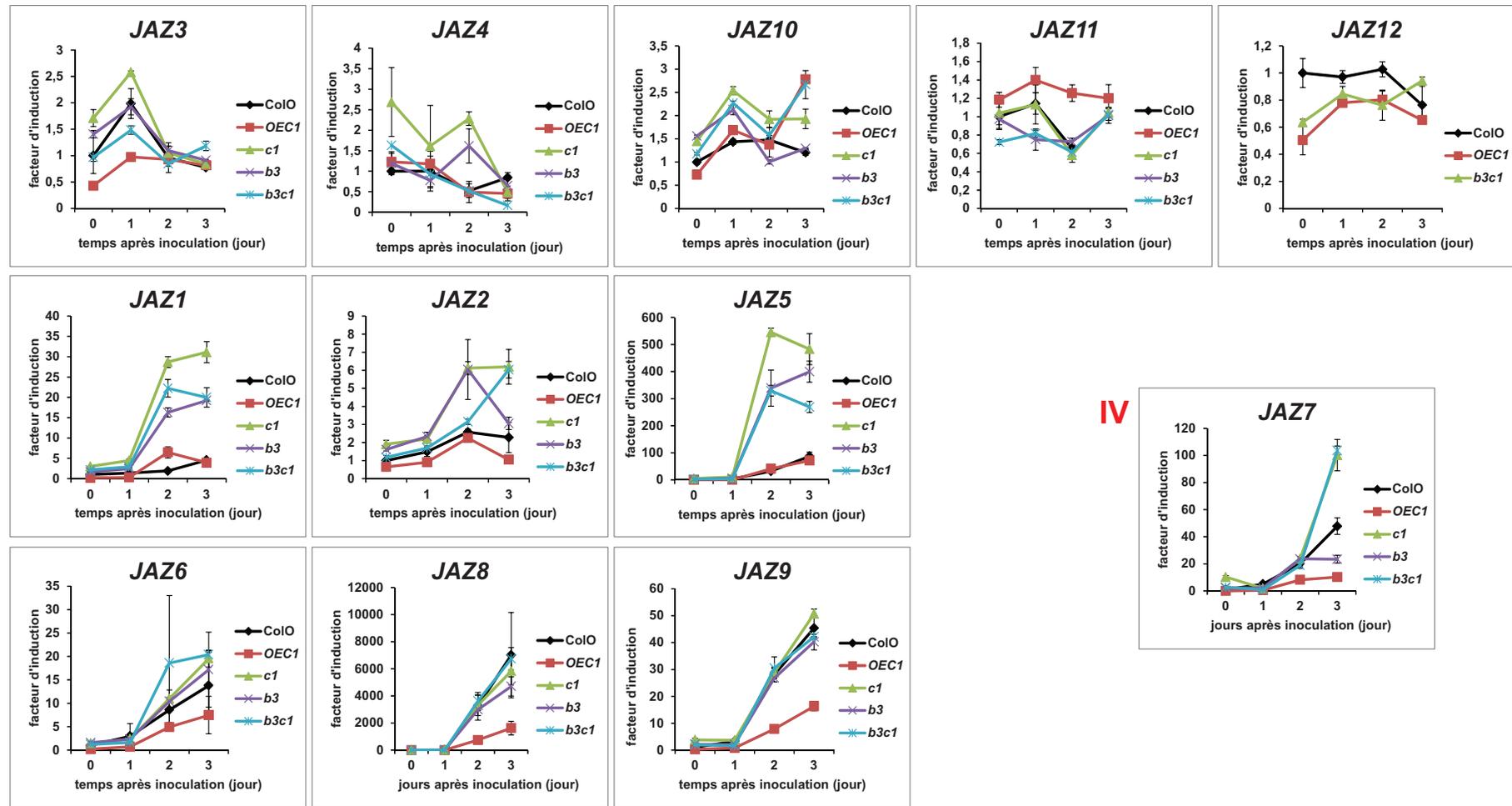


Figure 5-10 : Expression des 12 gènes JAZs au cours de l'infection foliaire par *Botrytis cinerea* chez les plantes de type sauvage (Col0) ou chez les mutants *cyp94b3*, *cyp94c1*, *cyp94b3c1*, ou OEC1. L'expression du gène est rapportée à celle mesurée dans les feuilles non-inoculées de Col0 (temps 0). **I** : JAZs dont l'expression n'est pas induite par l'infection ; **II** : JAZs dont l'expression est augmentée chez les mutants KO ; **III** : JAZs dont l'expression est réduite chez OEC1 ; **IV** : JAZ dont l'expression est diminuée chez OEC1 et augmentée chez *cyp94c1* et *cyp94b3c1*.

5.2.7 La carboxylation, une inactivation totale de JA-Ile ?

Comme nous venons de le voir, la perturbation du métabolisme oxydatif de JA-Ile a des impacts sur la transcription de gènes de signalisation et de défense. Les CYP94s contrôlent les niveaux de l'hormone JA-Ile, en produisant les composés 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile dont les propriétés biologiques pourraient contribuer aux modifications transcriptionnelles observées. Il a été décrit que 12OH-JA-Ile est moins efficace que JA-Ile pour promouvoir l'assemblage du complexe COI1-JAZ3.1 ou COI1-JAZ10 dans des tests d'interaction de pull-down *in vitro* (T. Heitz données non publiées et Koo et al. (2011)). Cependant, une interaction COI1/12OH-JA-Ile/JAZ est encore détectable. Il est donc possible qu'*in vivo*, 12OH-JA-Ile permette encore l'induction de certaines réponses. Une oxydation supplémentaire de l'hormone conduisant au 12COOH-JA-Ile pourrait permettre d'inactiver totalement l'hormone. Afin de comparer les capacités individuelles de JA-Ile, de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile à promouvoir l'expression de ces gènes dépendant de la voie JA, nous avons effectué des traitements de plantes avec chaque composé puis extrait les ARNs et examiné l'expression de ces gènes par RT-qPCR.

5.2.7.1 Effet d'un traitement JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile sur des feuilles de plantes âgées de 7 semaines

Dans un premier temps, nous avons effectué les traitements sur des feuilles adultes prélevées sur des plantes âgées de 7 semaines. Les feuilles excisées au niveau du pétiole ont été mises en survie en plongeant le pétiole dans une solution contenant le composé d'intérêt. Les feuilles ont été congelées après 3 h, 8 h ou 24 h de traitement, puis les ARNs ont été extraits et l'expression des gènes analysée par RT-qPCR. La figure 5-11 présente l'expression de *JAZ5* et de *PDF1.2* après différentes durées de traitement. L'expression (relative à des feuilles non traitées) des deux gènes est fortement induite au bout de 3 heures dans les contrôles. Cela suggère que le simple fait de couper les feuilles induit déjà fortement la voie JA et la production de JA-Ile de manière endogène. Par conséquent, il est difficile de reconnaître l'effet de traitements exogènes avec JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile. Attribuer des propriétés biologiques à ces molécules n'est donc pas possible avec ce mode opératoire.

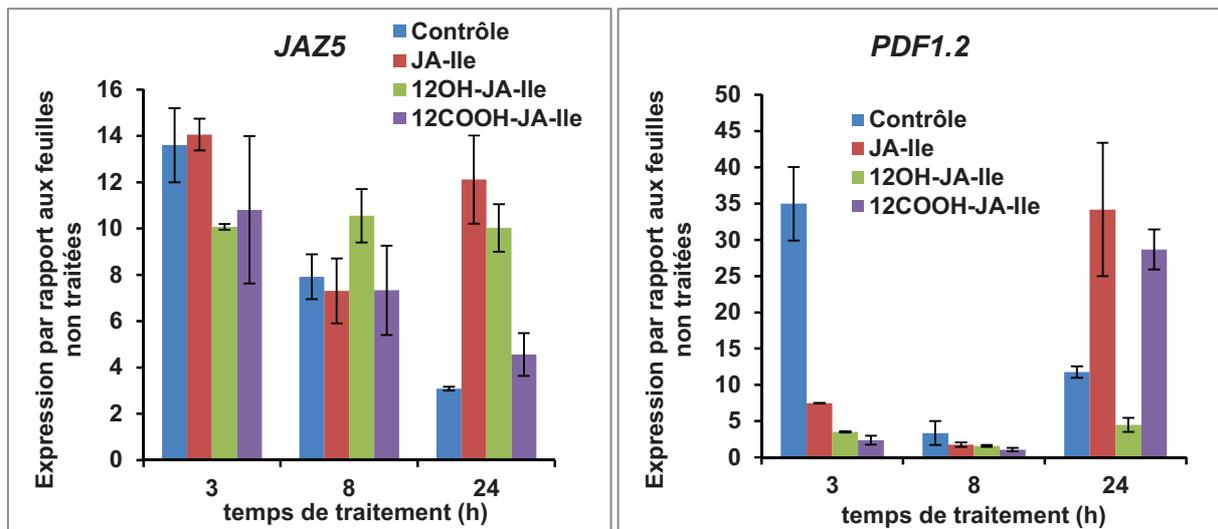


Figure 5-11 : Expression des gènes *JAZ5* et *PDF1.2* dans des feuilles traitées avec JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile. Les solutions de jasmonates sont à une concentration de 10 μ M. Les feuilles coupées de plantes âgées de 7 semaines sont disposées verticalement dans des fioles contenant l'un des jasmonates. Les feuilles sont récoltées et congelées avec de l'azote liquide après 3 h, 8 h ou 24 h de traitement. Le traitement contrôle correspond à de l'eau contenant 1 % de méthanol. L'expression est rapportée à celle mesurée dans des échantillons de feuilles non-traitées (congelées immédiatement après récolte). Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SD de 3 réplicats techniques.

5.2.7.2 Effet d'un traitement JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile sur des plantules d'une semaine cultivées en milieu liquide

Pour éviter le problème d'induction de la voie JA par la coupure des feuilles et pouvoir étudier l'effet de traitements exogènes avec les jasmonates JA-Ile, 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile sur la transcription de gènes de la voie JA, nous avons, dans un deuxième temps, effectué les traitements sur des plantules d'une semaine cultivées *in vitro* en milieu liquide. Ce modèle biologique est fréquemment utilisé pour étudier les réponses à des traitements hormonaux, notamment dans les expériences répertoriées dans les serveurs de microarrays (Toufighi et al., 2005). Il permet un contact continu de la plante avec le composé à tester, sans stress. Les facteurs d'induction obtenus sont en général plus importants qu'avec des plantes adultes. Les plantules ont été traitées avec JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile et ont été récoltées après différentes durées de traitement. Les ARNs ont été extraits puis analysés par RT-pPCR. Les expressions du gène de métabolisme *CYP94C1*, du gène de défense *PDF1.2*, du facteur de transcription *ERF1* et du répresseur *JAZ5* sont présentées dans la figure 5-12.

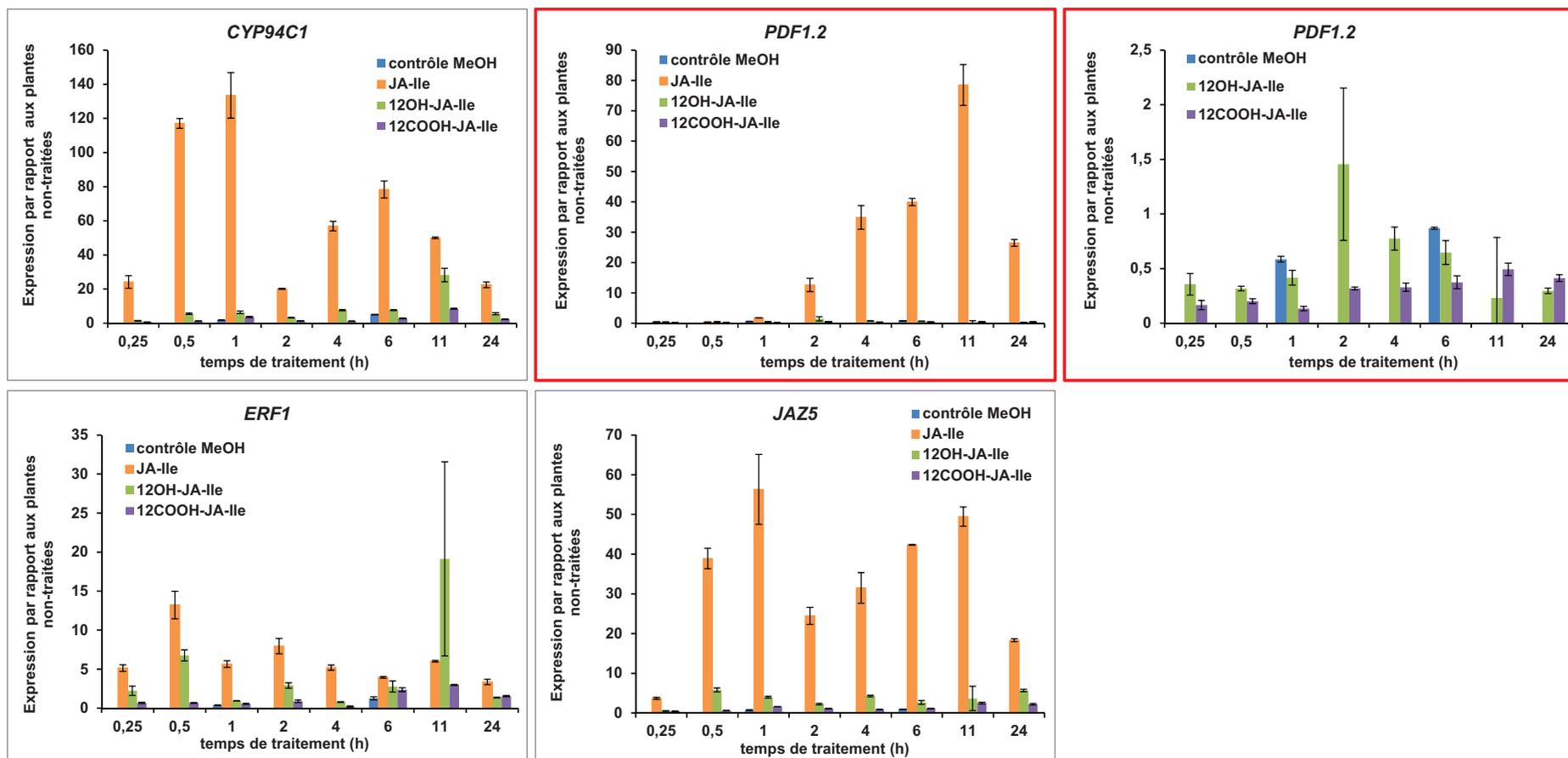


Figure 5-12 : Expression des gènes *CYP94C1*, *PDF1.2*, *ERF1* et *JAZ5* dans des plantules traitées avec JA-Ile, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile. Les traitements avec les jasmonates ont été effectués à une concentration finale de 30 μ M. Les plantules âgées d'une semaine cultivées en milieu liquide *in vitro* ont été récoltées et congelées avec de l'azote liquide après 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 11 h ou 24 h de traitement. Le traitement contrôle correspond à de l'eau contenant 3 % de méthanol et concerne les temps 1 h et 6 h. L'expression est rapportée à celle mesurée dans des échantillons de feuilles non-traitées (congelées immédiatement après récolte). Une représentation de *PDF1.2* sans les valeurs correspondant au traitement JA-Ile permet de visualiser les valeurs des autres traitements (graphique de droite). Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SD de 3 réplicats techniques.

Comme attendu, l'expression des 4 gènes dépendant de la voie JA est fortement induite par le traitement JA-Ile (figure 5-12). Il est intéressant de noter que les expressions de *CYP94C1*, *ERF1* et *JAZ5* sont induits dès 15 min et que leur expression maximale est atteinte entre 30 min et 1 h de traitement. L'expression de *PDF1.2* est induite plus tardivement et son induction maximale n'est observable qu'au bout de 11 h de traitement. L'induction précoce de *CYP94C1*, d'*ERF1* et de *JAZ5* ainsi que l'induction tardive de *PDF1.2* sont similaires aux cinétiques d'expression de ces gènes en réponse à la blessure dans des feuilles adultes. Ainsi, ce mode opératoire est validé. Contrairement au traitement JA-Ile, les traitements avec les formes oxydées, 12OH-JA-Ile ou 12COOH-JA-Ile, induisent beaucoup moins l'expression de ces gènes. Ces résultats indiquent que les formes oxydées ont peu d'effet sur l'expression de ces gènes de métabolisme, de signalisation et de défense. Les groupements hydroxyle et carboxyle semblent donc réduire les capacités de JA-Ile à induire l'expression de ces gènes. Il est cependant notable que le traitement 12OH-JA-Ile promeut encore légèrement l'expression des gènes analysés, alors que le traitement 12COOH-JA-Ile ne permet généralement plus d'induction. Dans le cas de *PDF1.2*, l'expression dans les plantules traitées avec du 12COOH-JA-Ile est encore plus faible que dans les plantules contrôles, suggérant que 12COOH-JA-Ile pourrait éventuellement avoir un effet inhibiteur sur la transcription de ce gène. Cependant, ces résultats demandent à être consolidés par d'autres expériences incluant des contrôles pour chaque durée de traitement.

Ces expériences de traitement exogène sur des plantules *in vitro* ont permis d'examiner l'effet des composés 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile en comparaison à l'hormone non oxydée JA-Ile sur la transcription de gènes connus pour être induits par la voie JA. Les formes oxydées de JA-Ile sont largement moins efficaces que JA-Ile pour promouvoir l'expression de gènes représentatifs du métabolisme de l'hormone (*CYP94C1*), de signalisation de la voie JA (*JAZ5*, *ERF1*) et de réponse de défense (*PDF1.2*), ce qui supporte l'idée que les oxydations de JA-Ile par les CYP94s sont un mécanisme d'inactivation hormonale.

5.3 Conclusion

Nos études métaboliques ont montré que l'infection foliaire par le pathogène *Botrytis cinerea* induit l'accumulation des formes oxydées de JA-Ile. Plus particulièrement, nos mesures quantitatives indiquent que la forme 12COOH-JA-Ile est la plus abondante. Parmi les 6 CYP94s d'*Arabidopsis thaliana*, seuls CYP94B1, CYP94B3 et CYP94C1 ont une expression induite par ce stress biotique, le niveau d'expression de CYP94C1 étant le plus élevé. Par des approches génétiques et métabolomiques, nous avons déterminé le rôle majeur de l'enzyme CYP94C1 dans la formation du dérivé 12COOH-JA-Ile au cours de l'infection. De manière surprenante, l'excès de JA-Ile mesuré chez *cyp94b3*, *cyp94c1* et *cyp94b3c1* n'est pas corrélé à un gain de résistance. Nous avons recherché des explications moléculaires à ce phénotype en étudiant les profils transcriptionnels de gènes de défense et de signalisation dans la voie JA. Ces résultats ont mis en évidence une expression plus intense de certains répresseurs comme *JAZ5*, suggérant qu'un rétrocontrôle négatif plus soutenu de la voie de signalisation JA se met en place chez ces mutants. Ce mécanisme pourrait limiter l'amplitude des réponses de défense, coûteuses en énergie pour la plante. Par ailleurs, la surexpression de CYP94C1 associée à un excès d'oxydation de JA-Ile provoque une perte de résistance des plantes à *Botrytis cinerea*, corrélée à une réduction drastique de l'expression de la défensine *PDF1.2*. Ensemble, ces résultats indiquent que l'oxydation de JA-Ile par les CYP94s chez les plantes de type sauvage est un mécanisme atténuant les niveaux et l'action de cette hormone lors de ce stress foliaire biotique, comme nous l'avons observé en réponse à la blessure foliaire mécanique (Heitz et al., 2012). Ces enzymes sont donc des régulateurs clés des réponses transcriptionnelles des gènes de défense et de signalisation impliqués dans la résistance à ce pathogène nécrotrophe.

5.4 Discussion

Le niveau de JA-Ile est déterminant pour la signalisation et la défense. La perte ou le gain d'expression de *CYP94s* ont un impact sur l'expression de gènes de signalisation de la voie JA et de défense. Les plantes sur-exprimant *CYP94C1* présentent des niveaux de JA-Ile proches de ceux des plantes de type sauvage, seulement légèrement diminués. Cependant, la résistance est nettement affectée chez ce mutant. Il semble donc que le niveau de JA-Ile ne soit pas le seul facteur déterminant le niveau de défense. La différence métabolique majeure que nous avons observée entre OEC1 et les plantes sauvages correspond au large excès de 12COOH-JA-Ile. Ce conjugué oxydé pourrait donc avoir un impact négatif sur les réponses de défense. Les réponses aux jasmonates incluent l'induction de l'expression de gènes, mais également la répression de l'expression d'autres gènes. Le 12COOH-JA-Ile pourrait être un jasmonate ayant un rôle à jouer dans la répression de l'expression de certains gènes, comme cela semble être le cas pour *PDF1.2*. Des mécanismes moléculaires et cellulaires gouvernant des réponses contrôlées par 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile pourraient être étudiés.

Le facteur de transcription EIN3 de la voie éthylène induit l'expression d'*ERF1* et de *PDF1.2*. Il a été montré que la protéine répresseur JAZ1 interagit avec EIN3, ce qui inhibe EIN3 en absence de JA (Zhu et al., 2011). La dégradation des JAZs correspond à la dé-répression d'EIN3 et mène à une augmentation de la résistance contre *Botrytis cinerea* (Zhu et al., 2011). Nous avons observé que les expressions de *JAZ1*, d'*ERF1* et de *PDF1.2* sont modifiées chez les mutants d'expression des *CYP94s*. L'oxydation de JA-Ile semble donc avoir un impact sur l'expression de ces gènes et il serait intéressant d'étudier le comportement d'EIN3, qui est un acteur intermédiaire entre le répresseur JAZ1 et le facteur de transcription ERF1.

Les mêmes acteurs de catabolisme sont donc à l'œuvre en réponse à deux stress foliaires, la blessure et l'infection fongique. Cependant, la dynamique métabolique est sensiblement différente, comme l'est l'impact sur les réponses de défenses respectives. Les interactions particulières avec d'autres voies hormonales affectent probablement la régulation fine de la voie JA.

6 OXYDATION DE JASMONATES PAR LES CYP94s AU COURS DU DEVELOPPEMENT FLORAL

6.1 Introduction

Les phénotypes caractéristiques des mutants de biosynthèse ou de signalisation des jasmonates sont une sensibilité plus forte aux pathogènes nécrotrophes ainsi qu'une inhibition de la croissance racinaire réduite, mais également une stérilité mâle chez *Arabidopsis thaliana* ou femelle chez la tomate (*Solanum lycopersicon*) (Wasternack et al., 2013), démontrant l'importance des jasmonates pour la fertilité. On peut donc prévoir que le métabolisme des JAs est actif dans les fleurs et que différentes formes peuvent être détectées et quantifiées.

6.1.1 Dosages de jasmonates dans les fleurs

La première quantification d'OPDA, de JA, de JA-Ile et de l'ester méthylique de JA-Ile dans les fleurs a été réalisée chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Hause et al., 2000). La quantification de jasmonates dans les bourgeons floraux et les fleurs a mis en évidence des niveaux de JA-Ile et d'OPDA plus élevés dans les fleurs matures que dans les bourgeons, avec des concentrations maximales dans les pistils, en cohérence avec la nécessité des jasmonates pour la fertilité femelle (Hause et al., 2000). Chez la tomate, la synthèse de JA a lieu dans les ovules, notamment grâce à la présence de protéines de biosynthèse AOC dans ces structures reproductrices (Hause et al., 2000; Stenzel et al., 2008).

Dans le pollen de *Pinus mugo*, JA, OPDA, 12OH-JA et 11-OH-JA ont été détectés (Miersch et al., 2008).

Chez *Nicotiana attenuata*, il a été rapporté que la concentration de JA est d'environ 2000 ng/g (= 9,5 nmol/g) de masse fraîche dans les bourgeons puis diminue au cours du développement floral, alors que les niveaux de JA-Ile sont d'environ 700 ng/g (= 3,3 nmol/g) de masse fraîche dans les bourgeons puis atteignent 1250 ng/g (= 5,9 nmol/g) de masse

fraîche dans les fleurs commençant à s'allonger, puis diminuent jusqu'à ouverture complète de la fleur (Oh et al., 2013). JA et JA-Ile s'accumulent donc selon un pattern spécifique durant le développement floral chez *N. attenuata*.

Chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant *opr3*, affecté dans la réduction de l'OPDA conduisant à la synthèse de JA, a permis de déterminer que ce n'est pas l'OPDA mais le JA qui est nécessaire pour la fertilité mâle (Stintzi et Browse, 2000). La fertilité des mutants de biosynthèse de jasmonates peut être restaurée par application exogène de JA sur les bourgeons floraux à un stade de développement précis (stade 12). Cette complémentation chimique a permis d'identifier les enzymes impliquées dans la biosynthèse de JA requis pour le développement tardif de l'étamine. JA-Ile a été rapporté dans les fleurs, avec un niveau de 8 pmol/g de poids frais (Staswick, 2009b). Les quantités de JA ont été mesurées dans des fleurs entières à différents stades floraux par Nagpal et al. (2005) : environ 30 pmol/g dans des bourgeons floraux de stades 1 à 10, 200 pmol/g pour les bourgeons de stades 11 à 12, et 52 pmol/g pour les fleurs de stades 13 et 14. Ainsi la concentration en JA est la plus forte juste avant ouverture de la fleur. Le gène de la phospholipase *DADI* est exprimé dans le filet des étamines, ce qui suggère que la synthèse de JA pourrait être initiée dans cette structure (Ishiguro et al., 2001). Cependant, les gènes *AOC1* et *AOC4* sont également exprimés dans les anthères, les pétales, les sépales et le pistil, indiquant que la formation d'OPDA précurseur du JA a probablement lieu dans toute la fleur (Stenzel et al., 2012).

6.1.2 Hypothèse de travail

Alors que de nombreuses études génétiques ont mis en évidence l'importance de la biosynthèse et de la signalisation des jasmonates dans le développement floral d'*Arabidopsis thaliana* (Wasternack et Hause, 2013), des études métaboliques concernant le turnover des jasmonates dans les fleurs demandent à être effectuées. Bien que JA-Ile soit considérée comme la forme bioactive des jasmonates, les profils d'accumulation de ce composé et de ses dérivés oxydés n'a pas encore été rapporté au cours du développement floral (bourgeons floraux en comparaison aux fleurs ouvertes) de cette plante modèle. La voie JA jouant un rôle primordial dans le développement floral, l'étude de la régulation des niveaux de la forme hormonale bioactive JA-Ile est donc intéressante également dans ce contexte développemental. Le niveau de JA dépend de sa biosynthèse qui est contrôlée en amont par les signalisations auxine et GA (Nagpal et al., 2005; Cheng et al., 2009; Tabata et al., 2010;

Reeves et al., 2012). Nous avons supposé que les niveaux d'hormone JA-Ile pourraient également être contrôlés par un mécanisme catabolique.

Nous avons vu que CYP94B3 et CYP94C1 sont fortement exprimés dans les feuilles après blessure et leurs oxydations jouent un rôle majeur dans le contrôle des niveaux de JA-Ile lors de cette situation de stress (Heitz et al., 2012). Nous avons formulé l'hypothèse que les enzymes CYP94B3, CYP94C1 ou d'autres membres de la famille CYP94 pourraient également métaboliser l'hormone dans les fleurs et intervenir dans la régulation des niveaux de JA-Ile au cours du développement de la fleur.

Pour établir les profils en jasmonates dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*, plus particulièrement ceux de JA-Ile et ses formes oxydées dans les fleurs, puis pour étudier l'implication éventuelle de CYP94s dans le métabolisme oxydatif de JA-Ile, nous avons utilisé des approches métaboliques, génétiques et transcriptionnelles.

6.2 Résultats

6.2.1 Recherche de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile dans les fleurs de Col0

Pour déterminer si l'hormone JA-Ile peut être oxydée lors du développement de la fleur, nous avons recherché par UPLC-MS/MS les profils de JA-Ile, de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile dans les bourgeons verts de fleurs fermées (récolte groupée des stades 1 à 12 de la figure 1-17 de l'introduction générale) ou dans des fleurs ouvertes (récolte groupée des stades 13 et 14 de la figure 1-17 de l'introduction générale) de plantes sauvages.

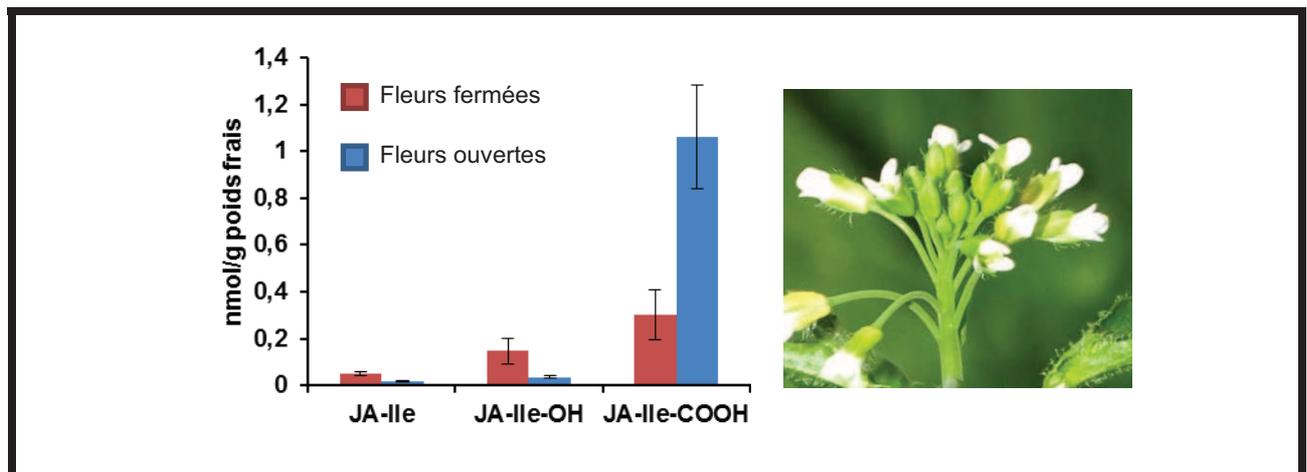


Figure 6-1 : Niveaux de JA-Ile, 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile dans des fleurs fermées ou ouvertes de Col0.

Comme l'indique la figure 6-1, nous avons détecté l'accumulation de JA-Ile, 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile dans les fleurs. Les niveaux de JA-Ile dans les fleurs fermées sont plus élevés que dans les fleurs ouvertes, indiquant que l'hormone est davantage métabolisée après ouverture de la fleur. Au contraire, le 12COOH-JA-Ile est accumulé plus fortement dans les fleurs ouvertes, ce qui suggère que la diminution des niveaux de JA-Ile dans les fleurs ouvertes pourrait être due à son oxydation en 12COOH-JA-Ile.

6.2.2 Etude de l'expression des 6 gènes *CYP94s* dans les fleurs

Afin de déterminer quels *CYP94s* pourraient potentiellement catalyser l'oxydation de JA-Ile lors du développement floral, des études transcriptionnelles visant à mettre en évidence le pattern d'expression de chaque gène *CYP94* dans les organes floraux ont été entreprises.

6.2.2.1 Expression des *CYP94s* à différents stades floraux (RT-qPCR)

Pour examiner l'expression des *CYP94s* au cours du développement floral, des fleurs entières, fermées ou ouvertes, ont été récoltées. Pour des raisons de commodité, nous avons regroupé certains stades de développement en catégories (figure 6-2).



Figure 6-2 : Photographies de fleurs d'*Arabidopsis* (Col0) représentatives des 5 catégories de fleurs récoltées. Des photographies de bourgeons et fleurs représentatifs de chaque catégorie sont présentées. La catégorie A comprend les stades 1 à 10 de la nomenclature du développement floral de la figure 1-17 de l'introduction générale (Smyth et al., 1990), la catégorie B regroupe les stades 11 et 12, la catégorie C correspond au stade 13, les catégories D et E sont respectivement les stades 14 et 16.

Après récolte, les ARNs ont été extraits puis soumis à une transcription inverse avant d'effectuer les PCR quantitatives pour mesurer l'expression des 6 gènes de la famille *CYP94*. Les résultats de RT-qPCR effectués sur les fleurs des différentes catégories récoltées sont présentés en figure 6-3. L'expression de *CYP94B2* est très faible et celle de *CYP94D1* est indétectable. *CYP94B1*, *CYP94B3*, *CYP94C1* et *CYP94D2* sont les gènes *CYP94s* les plus exprimés. L'expression des gènes *CYP94B1*, *CYP94B3* et *CYP94C1* est la plus forte au stade 14 (catégorie D), lors de l'ouverture complète de la fleur. Cette expression est cohérente avec un rôle éventuel de ces enzymes dans l'oxydation de JA-Ile, qui est plus intense à l'ouverture de la fleur (cf Figure 6-1). Ces gènes sont ceux impliqués dans le turnover hormonal dans les feuilles blessées et sont donc également de bons candidats pour catalyser l'oxydation de JA-Ile dans les fleurs.

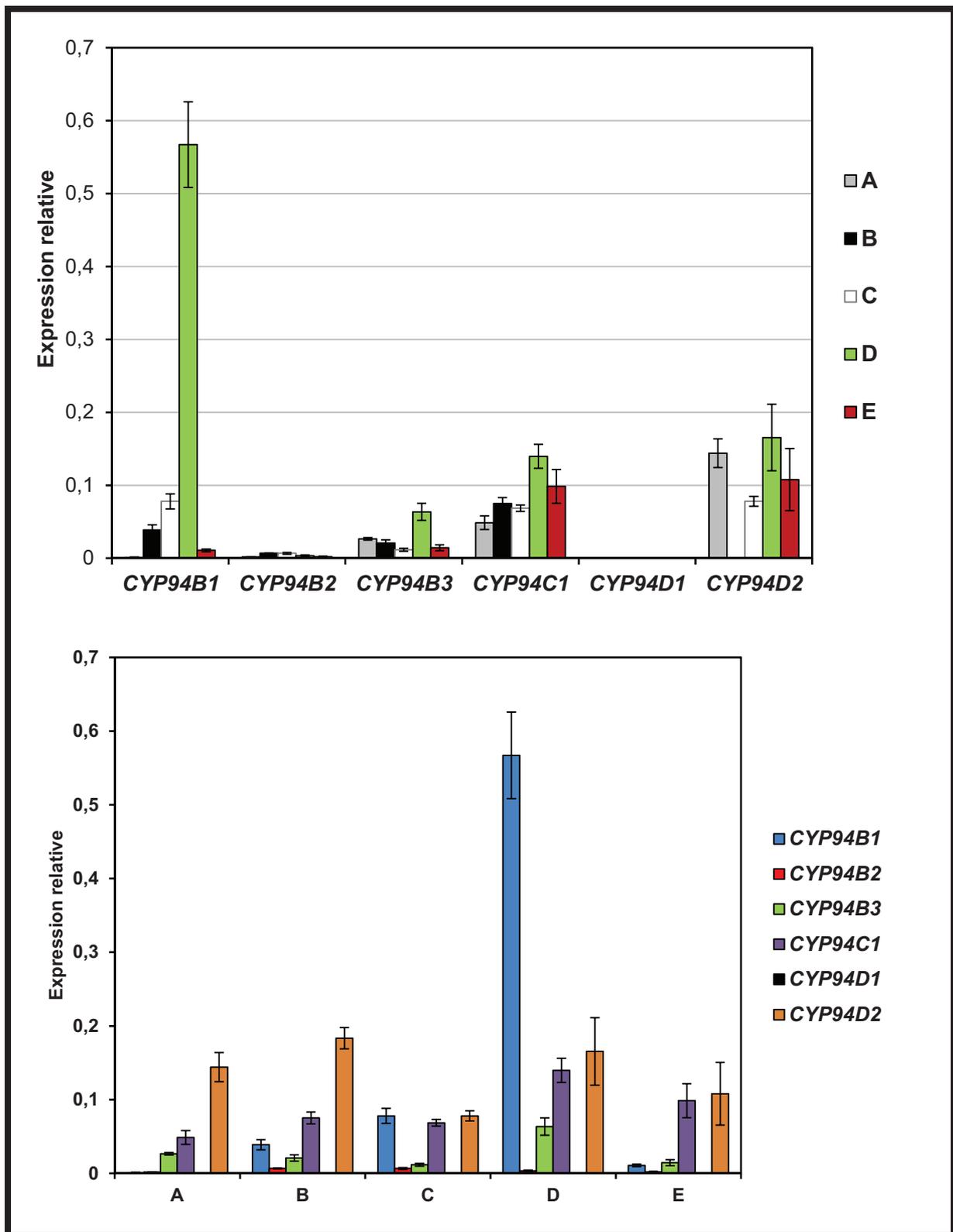


Figure 6-3 : Mesure de l'expression des *CYP94s* par RT-qPCR aux différents stades floraux récoltés (catégories A à E). Les expressions sont représentées en $\Delta\Delta Ct$, uniquement corrigés par les deux gènes de référence.

6.2.2.2 Expression des *CYP94s* dans les différents organes de fleurs ouvertes

Pour déterminer précisément dans quels organes de la fleur ouverte les *CYP94s* sont exprimés, des fleurs ont été disséquées afin de récolter séparément sépales, pétales, étamines et pistil (Figure 6-4). Du pollen mature a également été récolté. Les ARNs ont été extraits et analysés par RT-qPCR.

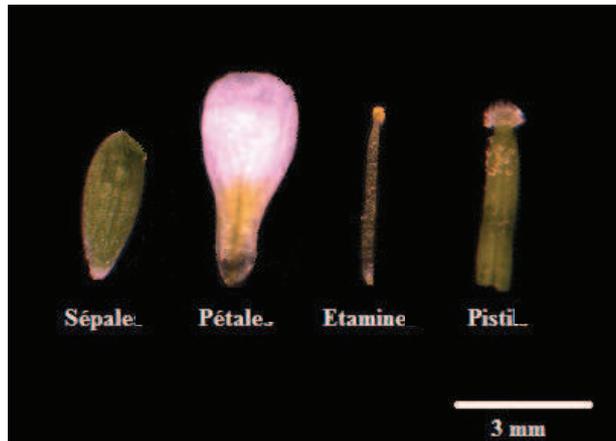


Figure 6-4 : Organes disséqués d'une fleur ouverte de Col0 stade 14.

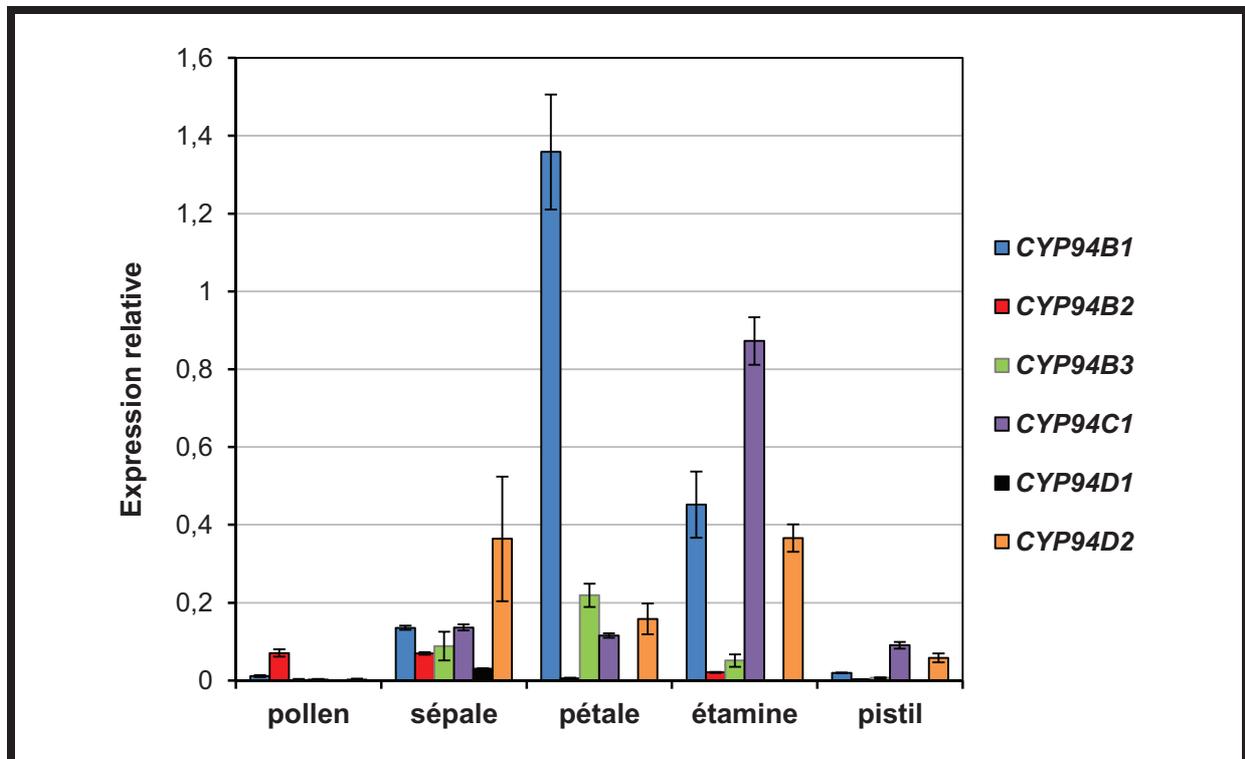


Figure 6-5 : Mesure de l'expression des *CYP94s* par RT-qPCR dans les organes de fleurs ouvertes stade 14 (Col0). Les expressions sont représentées en $\Delta\Delta Ct$, uniquement corrigés par les deux gènes de référence.

Les résultats obtenus (Figure 6-5) montrent que les 6 *CYP94s* sont exprimés dans la fleur, mais avec une spécificité en terme d'intensité et de localisation. Aucun des gènes *CYP94s* n'est exprimé fortement dans le pistil. *CYP94B2* est faiblement exprimé dans les grains de pollen. L'expression de *CYP94D1* est détectable uniquement et faiblement dans les sépales. *CYP94C1* est majoritairement exprimé dans les étamines. *CYP94B1* est fortement exprimé dans les pétales et modérément dans les étamines. *CYP94D2* est plus exprimé que les autres *CYP94s* dans les sépales et est également exprimé dans les étamines. L'étamine se distingue donc en exprimant fortement 3 gènes *CYP94s* : *CYP94C1*, *CYP94B1* et *CYP94D2*.

Ces données indiquent que chaque gène *CYP94* présente un pattern d'expression particulier dans les pièces florales de la fleur ouverte, ce qui suggère une spécificité de fonction pour chaque enzyme dans certaines parties de la fleur.

6.2.2.3 Expression de *CYP94C1* chez des lignées rapportrices GUS

Les données de RT-qPCR ont permis de déterminer les niveaux d'expression dans les fleurs entières ou dans les principaux organes de fleurs disséquées. Le système rapporteur de GUS permet une localisation encore plus fine de l'expression du gène. Nous avons pu utiliser des lignées *pCYP94B3::GUS* et *pCYP94C1::GUS* qui avaient été obtenues par le Dr Yves Millet (laboratoire de Frederick Ausubel, Boston, USA).

Deux lignées *pCYP94C1::GUS* (1212 et 2229) présentent une coloration bleue uniquement dans les fleurs ouvertes à partir du début du stade 13, les bourgeons au centre du bouquet floral ne sont pas colorés (figure 6-6A et D). Plus précisément, la coloration bleue est exclusivement localisée dans les anthères, les filets des étamines n'étant pas marqués (Figure 6-6B et E). Des coupes longitudinales et transversales de ces fleurs ont été réalisées (Figure 6-6C et F) et montrent l'expression de *CYP94C1* dans les anthères déhiscentes, libérant les grains de pollen. Les lignées GUS sous contrôle du promoteur *CYP94C1* permettent donc de confirmer les données de RT-qPCR indiquant l'expression de *CYP94C1* dans les étamines des fleurs ouvertes. Certains grains de pollen sont colorés en bleu, mais selon les données de RT-qPCR, *CYP94C1* n'est pas exprimé dans ces structures. La coloration partielle des grains de pollen est donc probablement un artéfact.

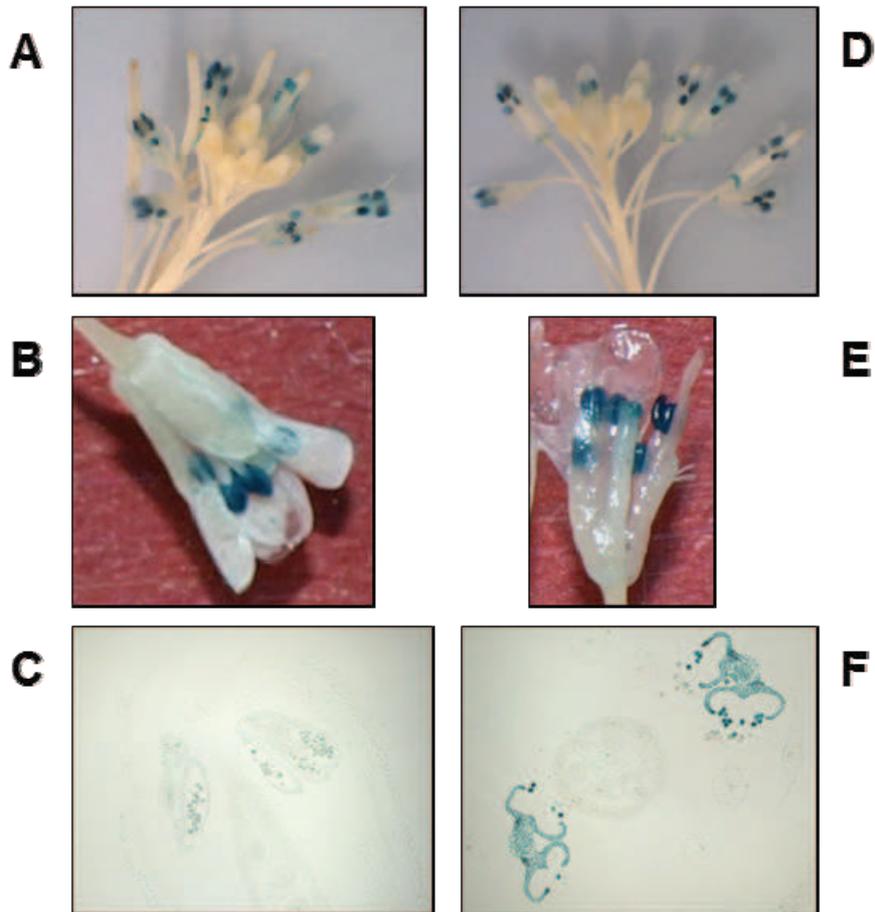


Figure 6-6 : Photographies des lignées *pCYP94C1::GUS*. Des bouquets floraux (A et D), des fleurs ouvertes (B et E) et des coupes d'anthere (C et F) des lignées *pCYP94C1::GUS* 1212 (A, B, C) et *pCYP94C1::GUS* 2229 (D, E, F) sont présentés. Les photos A, B, D et E ont été prises après coloration directe des fleurs fraîches et les photos C et F sont issues de coupes de fleurs colorées puis incluses dans du paraplaste (C, coupe longitudinale ; F, coupe transversale).

Des lignées rapportrices GUS de l'activité du promoteur de *CYP94B3* n'ont pas montré de coloration au niveau des fleurs (Figure 6-7B et C). Comme en témoignent les données de RT-qPCR, le niveau d'expression de *CYP94B3* est faible dans les fleurs. La coloration GUS étant une méthode moins sensible que la RT-qPCR, l'absence de coloration GUS pourrait s'expliquer par une activité très faible du promoteur de *CYP94B3* dans les fleurs.



Figure 6-7 : Photographies de bouquet floral de Col0 et de lignées *pCYP94B3::GUS*. Col0 (A), lignée *pCYP94B3::GUS* 141 (B), lignée *pCYP94B3::GUS* 352 (C).

Pour compléter l'étude de la localisation de l'expression des CYP94s exprimés fortement dans les fleurs, le Dr Yann Aubert (postdoctorant de notre laboratoire) a généré des lignées rapportrices GUS *pCYP94B1::GUS* et *pCYP94D2::GUS* pour visualiser l'expression des gènes *CYP94B1* et *CYP94D2* (figures 6-8 et 6-9). Pour rappel, *CYP94B1* est co-régulé avec *CYP94B3* et *CYP94C1* dans les réponses aux stress foliaires. *CYP94D2* est phylogénétiquement distinct et ne fonctionne pas comme une JA-Ile oxydase.

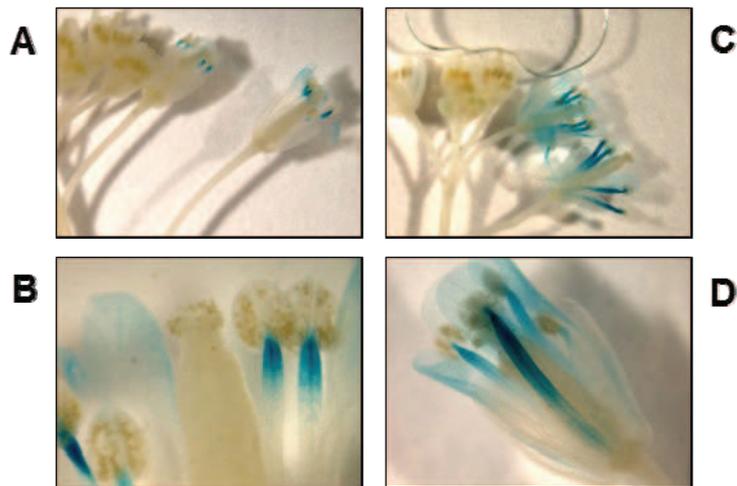


Figure 6-8 : Photographies de fleurs de lignées *pCYP94B1::GUS*. Les lignées, les colorations et les photographies ont été réalisées par Yann Aubert (*pCYP94B1::GUS* lignée 14 (A et B), *pCYP94B1::GUS* lignée 6 (C et D)).

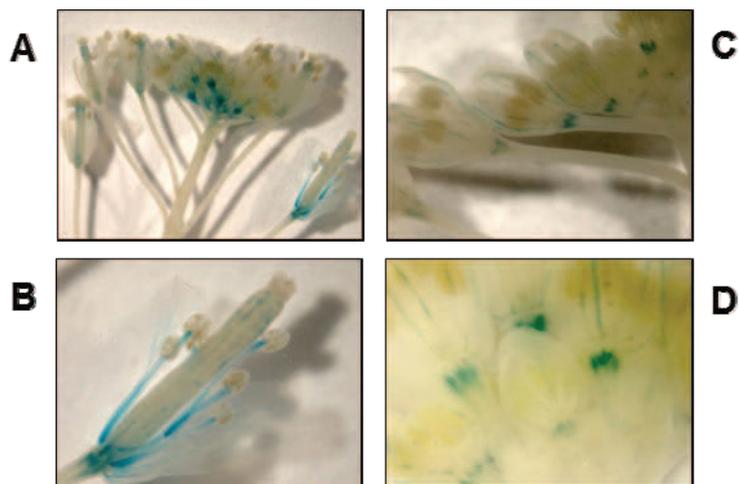


Figure 6-9 : Photographies de fleurs de lignées *pCYP94D2::GUS*. Les lignées, les colorations et les photographies ont été réalisées par Yann Aubert (*pCYP94D2::GUS* lignée 14 (A et B), *pCYP94D2::GUS* lignée 10 (C et D)).

Comme le montre la figure 6-8, *CYP94B1* est exprimé dans les pétales et dans les étamines des fleurs ouvertes. Plus précisément, la coloration est la plus forte au niveau du filet, avec un gradient atteignant un maximum d'intensité à l'extrémité reliant l'anthère, alors que l'anthère elle-même n'est pas colorée. *CYP94D2* est exprimé dans les étamines (figure 6-9), plus précisément dans les régions conductrices du filet, tandis que les anthères ne sont pas colorées. Ce gène apparaît également exprimé à la base du réceptacle floral et dans les vaisseaux du pistil. Contrairement aux lignées *pCYP94B1::GUS* et *pCYP94C1::GUS*, une coloration est également observable dans les bourgeons des lignées *pCYP94D2::GUS*.

L'ensemble des données provenant de RT-qPCR et des lignées rapportrices GUS sont cohérentes et montrent une expression de *CYP94B1*, *CYP94C1* et *CYP94D2* dans les étamines. Les lignées GUS ont mis en évidence le patron d'expression spécifique de chacun de ces gènes au niveau de l'étamine : *CYP94C1* est exprimé uniquement au niveau de l'anthère tandis que *CYP94B1* et *CYP94D2* sont exprimés dans le filament des anthères, l'expression de *CYP94D2* étant restreinte aux régions internes du filament.

La maturation du pollen dans les anthères des étamines et la déhiscence des anthères sont des processus dépendants de COI1 via le co-récepteur COI1-JAZ et de la signalisation des jasmonates (Wasternack et al., 2013). Contrairement à *CYP94B1* et *CYP94C1* qui oxydent JA-Ile, *CYP94D2* ne métabolise pas de jasmonates *in vitro* dans nos conditions d'incubations et son activité enzymatique est inconnue actuellement. *CYP94B1* et *CYP94C1* sont fortement exprimés dans les étamines et la forte expression de ces gènes dans les étamines de fleur ouverte suggère que les enzymes *CYP94B1* ou *CYP94C1* pourraient participer à l'oxydation de l'hormone JA-Ile dans les étamines des fleurs.

6.2.3 Niveaux de jasmonates dans les fleurs des mutants *cyp94s*

Pour étudier l'implication éventuelle de *CYP94s* dans le métabolisme des jasmonates au sein des fleurs, les jasmonates de fleurs de lignées mutantes affectées dans l'expression de *CYP94s* ont été extraits puis analysés par UPLC-MS/MS.

Les niveaux de JA-Ile, 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile détectés dans les fleurs fermées (catégories A et B récoltées) ou ouvertes (catégories C et D récoltées) de mutants *cyp94s* sont présentés dans la figure 6-10, en comparaison de ceux de plantes de type sauvage (Col0).

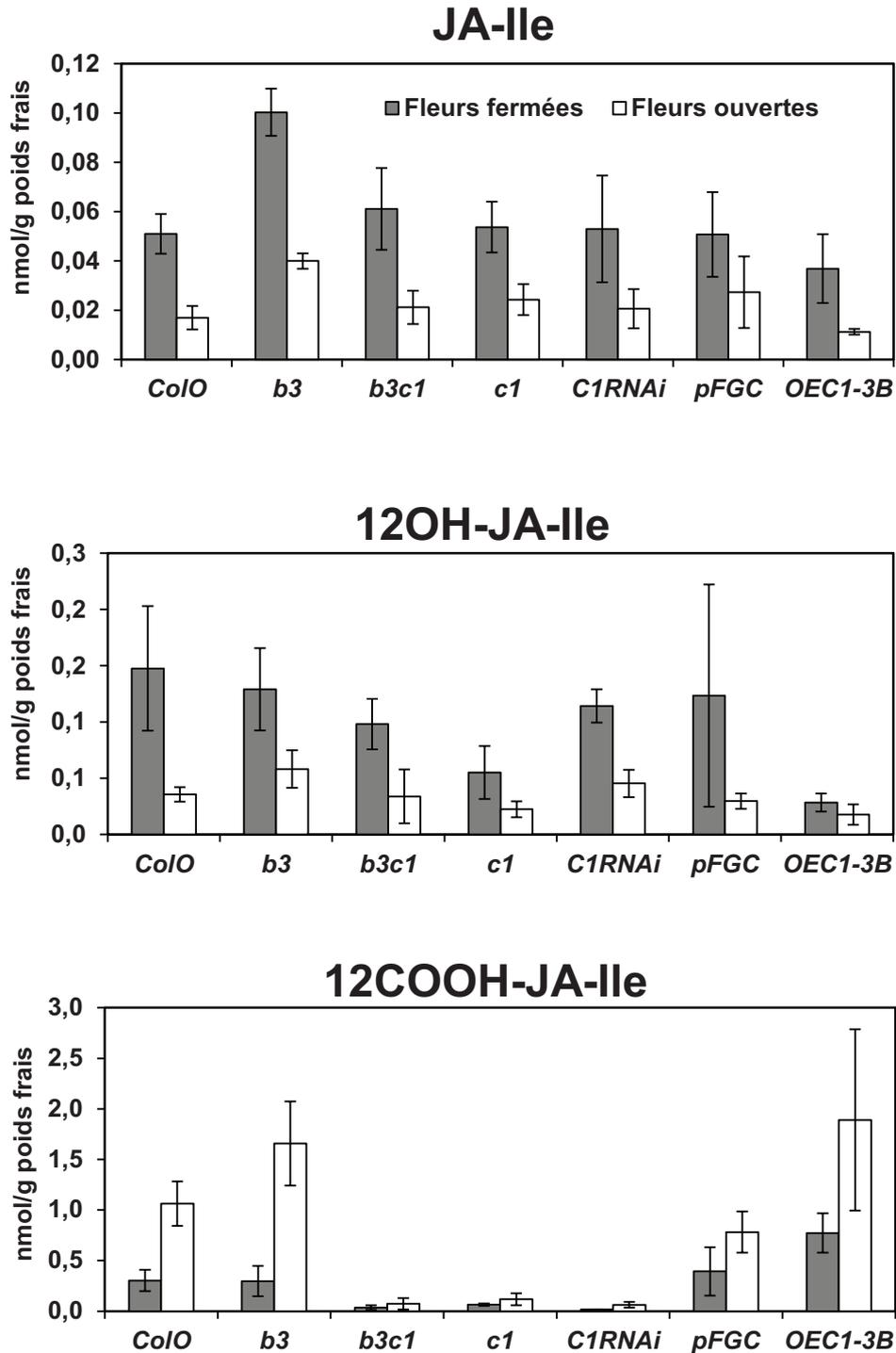


Figure 6-10 : Niveaux de JA-Ile, de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile dans les fleurs fermées ou ouvertes de plantes mutantes pour l'expression des gènes *CYP94B3* et *CYP94C1*. Les fleurs fermées correspondent aux catégories A et B récoltées, et les fleurs ouvertes correspondent aux catégories C et D récoltées. pFGC est une lignée contrôle des plantes C1RNAi dont l'expression de *CYP94C1* est fortement réduite. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SD de 3 réplicats biologiques indépendants.

Les fleurs de *cyp94b3* présentent des niveaux de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile proches de ceux de Col0, suggérant que CYP94B3 ne joue pas de rôle majeur dans l'accumulation des formes oxydées de JA-Ile dans la fleur. Le niveau de JA-Ile est plus élevé chez *cyp94b3* dans ce lot de plantes, mais comme le montre la figure 6-11 suivante, ceci n'est pas reproductible car dans un autre lot de plantes les quantités de JA-Ile sont similaires à celles des plantes Col0.

Les fleurs de *cyp94c1* ainsi que *C1RNAi* comportent des niveaux de 12COOH-JA-Ile très réduits, indiquant que CYP94C1 est responsable de l'accumulation de 12COOH-JA-Ile dans les fleurs sauvages (figure 6-10). De manière cohérente, les fleurs du double mutant *cyp94b3c1* ont également des niveaux de 12COOH-JA-Ile très affectés. De plus, les quantités de 12OH-JA-Ile sont réduites de moitié dans les fleurs fermées du mutant *cyp94c1*, indiquant que CYP94C1 participe également à l'accumulation de 12OH-JA-Ile dans les fleurs. Chez le mutant sur-exprimant *CYP94C1*, les niveaux de 12OH-JA-Ile sont également plus faibles que chez Col0. Mais dans ce cas, le 12OH-JA-Ile est probablement moins accumulé car il est converti en davantage de 12COOH-JA-Ile par l'excès d'enzyme CYP94C1.

Cette analyse a été répétée dans une expérience indépendante avec un nombre de génotypes plus important, incluant cette fois le mutant *cyp94b1*, les doubles mutants *cyp94b1c1*, *cyp94b1b3* et le triple mutant *cyp94b1b3c1*. Les résultats sont présentés dans la figure 6-11. Dans cette expérience également, le 12COOH-JA-Ile est de loin le conjugué le plus abondant, particulièrement dans les fleurs ouvertes. A nouveau, le mutant *cyp94c1* présente des niveaux très faibles de COOH-JA-Ile alors que les plantes sur-exprimant *CYP94C1* présentent un excès de ce composé. Ceci confirme le rôle de CYP94C1 dans la carboxylation de JA-Ile dans les fleurs. Dans cette expérience, tous les génotypes ont des niveaux de JA-Ile proches de ceux des plantes de type sauvage dans les fleurs fermées, hormis OEC1.

Bien que le gène *CYP94B1* soit fortement exprimé dans les pétales de fleurs sauvages, le mutant *cyp94b1* ne présente pas des niveaux plus faibles de 12OH-JA-Ile ni de 12COOH-JA-Ile. De plus, les niveaux de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile ne sont pas plus réduits chez les doubles mutants *cyp94b1c1* et *cyp94b1b3* par rapport aux simples mutants *cyp94b3* et *cyp94c1*, ni chez le triple mutant *cyp94b1b3c1* par rapport au double mutant *cyp94b3c1*. Ceci indique que l'enzyme CYP94B1 ne catalyse pas l'oxydation de JA-Ile dans les fleurs et suggère que CYP94B1 joue un autre rôle dans les fleurs.

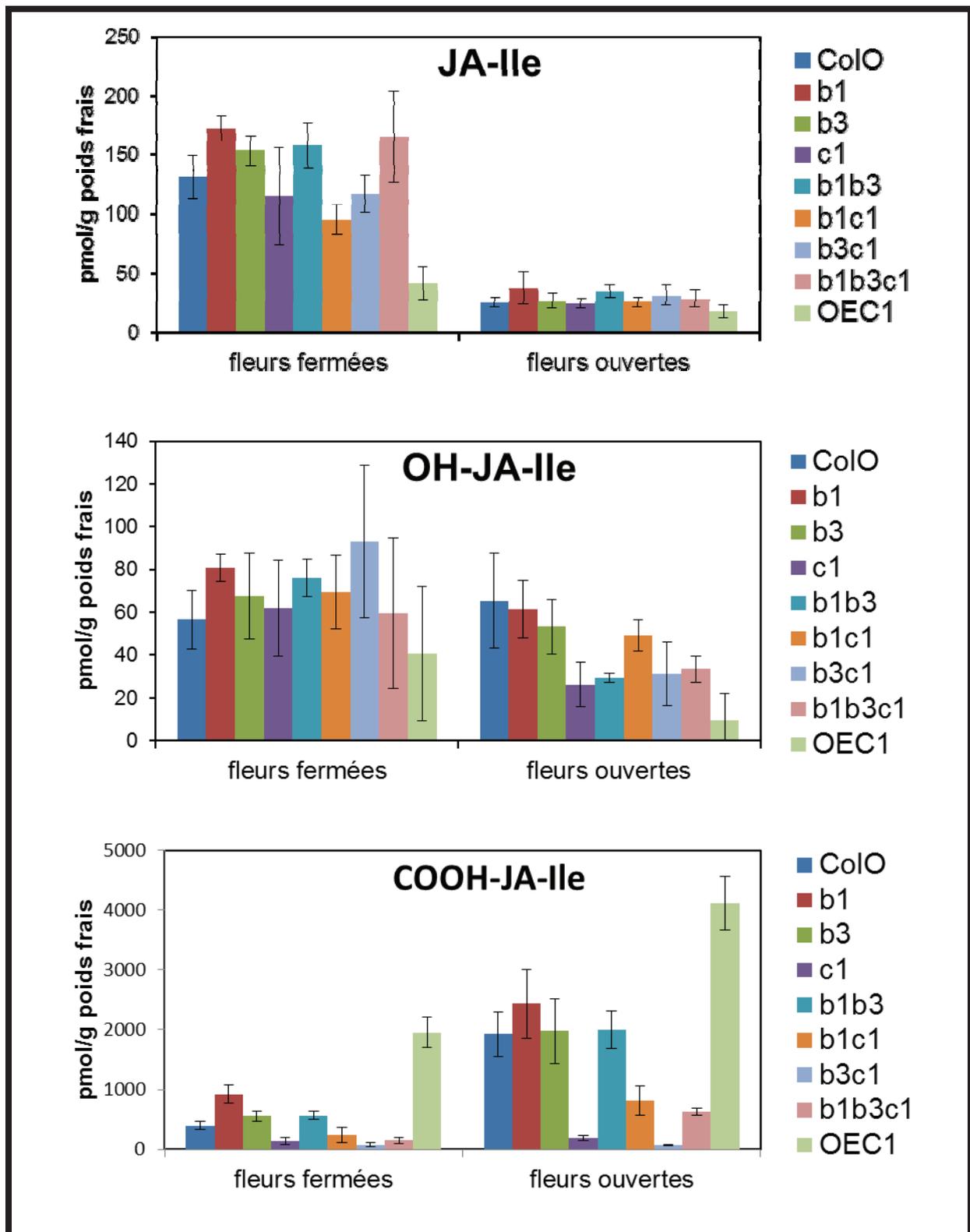


Figure 6-11 : Niveaux de JA-Ile, de 12OH-JA-Ile et de 12COOH-JA-Ile dans les fleurs fermées ou ouvertes de plantes simple, double ou triple mutantes pour l'expression des gènes *CYP94B1*, *CYP94B3* et *CYP94C1*. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SD de 3 réplicats biologiques indépendants.

Nous avons également recherché d'autres jasmonates dans les fleurs : JA, 12OH-JA, JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et OPDA (figure 6-12). Cependant, les dérivés 12OH-JA-Phe et 12CO-JA-Phe n'ont pas pu être détectés.

Alors que les niveaux de JA, de 12OH-JA et de JA-Phe sont similaires dans les fleurs sauvages fermées et ouvertes, ceux de 12COOH-JA-Phe et d'OPDA sont plus élevés dans les fleurs ouvertes.

De façon inattendue, les quantités de 12OH-JA sont particulièrement réduites chez les plantes sur-exprimant *CYP94C1*, indiquant que *CYP94C1* a un impact négatif sur la formation de ce composé. On pourrait imaginer que 12OH-JA est normalement formé par hydrolyse de 12OH-JA-Ile (Widemann et al., 2013), mais que l'excès d'enzyme *CYP94C1* utilise l'essentiel de la quantité de 12OH-JA-Ile pour l'oxyder en 12COOH-JA-Ile.

Les niveaux plus élevés de 12COOH-JA-Phe chez *OE1*, comparés à ceux des plantes contrôles (Col0), indiquent que *CYP94C1* est capable de produire ce composé dans les tissus floraux. Les niveaux de 12COOH-JA-Phe sont réduits chez *cyp94c1*, ce qui semble indiquer que cette enzyme est normalement partiellement responsable de la formation de 12COOH-JA-Phe dans les fleurs ouvertes.

Les quantités de JA sont plus élevées que celles de JA-Ile dans les bourgeons et fleurs (figures 6-11 et 6-12).

L'ensemble de ces analyses montre que l'oxydation de JA-Ile est active lors de la maturation de la fleur. L'accumulation des dérivés oxydés dépend principalement de *CYP94C1*, dont le gène est exprimé dans l'anthere. Les contributions plus subtiles d'autres *CYP94s* sont possibles et devront être étudiées par des analyses plus fines.

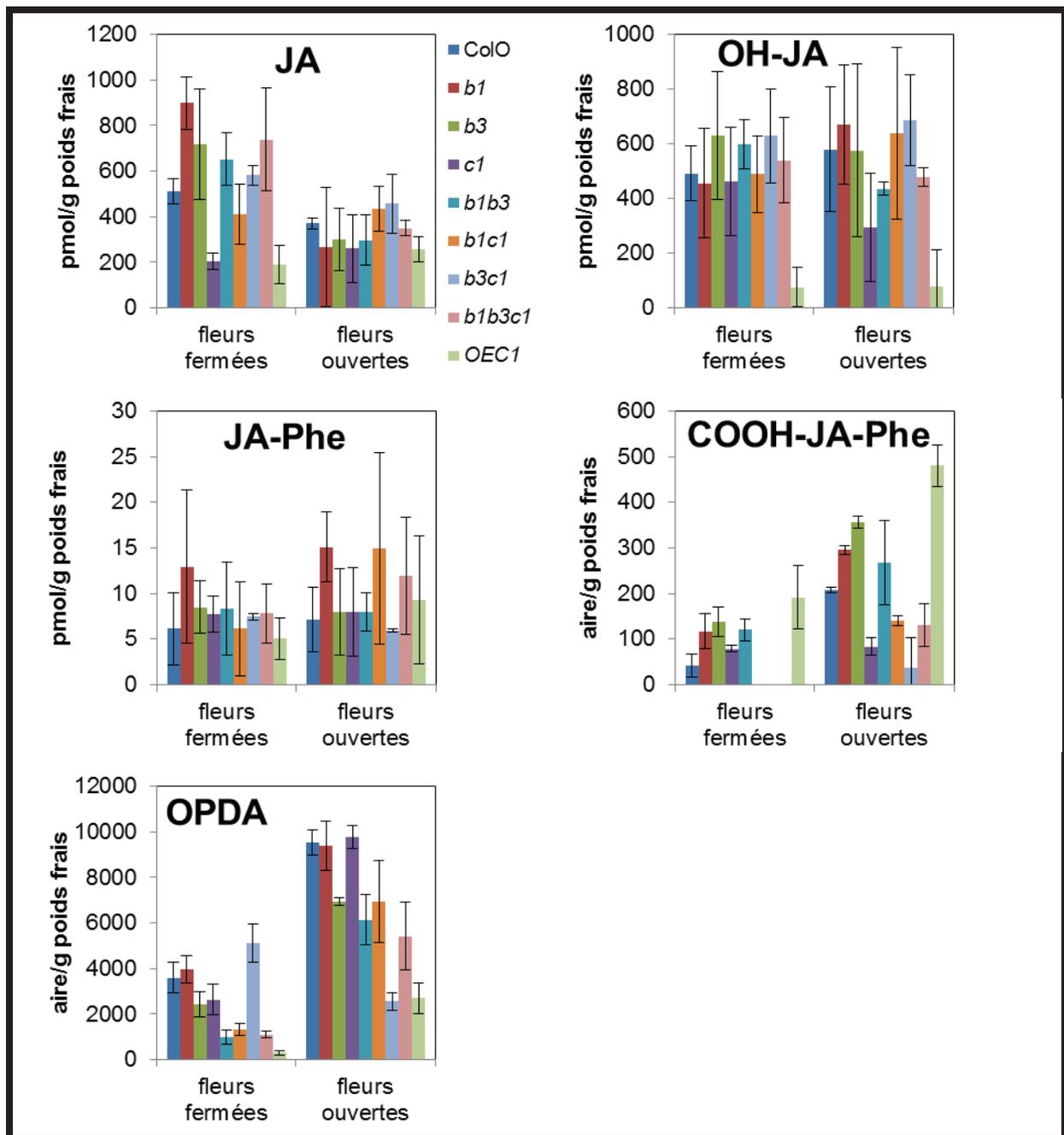


Figure 6-12 : Niveaux de JA, 12OH-JA, JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et OPDA dans les fleurs fermées ou ouvertes de plante de type sauvage (Col0) ou mutantes pour l'expression de *CYP94s*.

6.2.4 Expression de gènes de métabolisme et de signalisation de la voie des jasmonates ou impliqués dans le développement floral

Nous avons vu précédemment que JA-Ile s'accumule dans les fleurs et que son oxydation s'intensifie au cours du développement tardif. Les plantes mutantes ayant une expression de *CYP94C1* modifiée présentent un métabolisme oxydatif de JA-Ile altéré. La modification du turnover de JA-Ile pourrait changer l'expression de certains gènes cibles impliqués dans la gestion des niveaux d'hormone ou contrôlant le développement floral. Pour étudier l'impact de l'oxydation de l'hormone JA-Ile sur les réponses transcriptionnelles de gènes impliqués dans la voie des jasmonates dans les fleurs, nous avons mesuré l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'hormone et dans sa signalisation au cours du développement floral.

Les analyses transcriptionnelles ont été effectuées sur le premier lot de plantes incluant uniquement les génotypes Col0 et des mutants d'expression pour *CYP94B3* et *CYP94C1* (*CYP94B1* ne semblant pas jouer de rôle dans l'oxydation de JA-Ile au niveau des fleurs).

6.2.4.1 Expression des amido-hydrolases *IAR3* et *ILL6* dans les fleurs des mutants d'expression de *CYP94s*.

Les amido-hydrolases *IAR3* et *ILL6* participent au turnover de JA-Ile lors de la blessure de manière concomitante aux *CYP94s* (Widemann et al., 2013). Les gènes des amido-hydrolases de conjugués d'auxine *ILR1*, *ILL1*, *ILL2*, *ILL3* et *IAR3* sont exprimés dans les fleurs, plus particulièrement dans les anthères (Rampey et al., 2004). Il a été décrit que l'hydrolyse de conjugués d'auxine permet de libérer l'hormone d'auxine bioactive à partir de formes de stockage (Rampey et al., 2004). Le rôle clé de la synthèse d'auxine pour le développement floral a été démontrée (Cheng et al., 2006). Il est probable que les amido-hydrolases participent à l'accumulation d'auxine libre mais également à l'hydrolyse du conjugué JA-Ile dans les fleurs. L'expression d'*ILL6* n'ayant pas encore été rapportée dans les fleurs, nous avons mesuré l'expression de ce gène dans les fleurs (figure 6-13). *ILL6* est exprimé dans les bourgeons et dans les fleurs ouvertes, plus fortement qu'*ILL2* mais moins qu'*IAR3*.

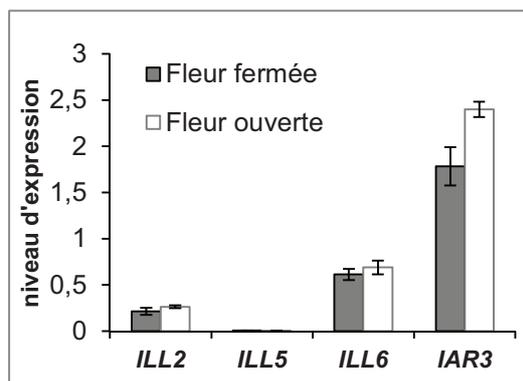


Figure 6-13 : Niveau d'expression des amido-hydrolases *ILL2*, *ILL5*, *ILL6* et *IAR3* dans les fleurs de plante de type sauvage Col0. Les barres grises correspondent aux fleurs fermées et les blanches aux fleurs ouvertes. Les expressions sont représentées en $\Delta\Delta Ct$, uniquement corrigés par les deux gènes de référence.

Nous avons supposé qu'*IAR3* ou *ILL6* pourrait participer au métabolisme des jasmonates dans les fleurs et éventuellement compenser les modifications de niveau de jasmonates certains chez les mutants d'expression des *CYP94s*. Pour tester cette hypothèse, nous avons examiné l'expression d'*IAR3* et *ILL6* chez ces mutants (Figure 6-14).

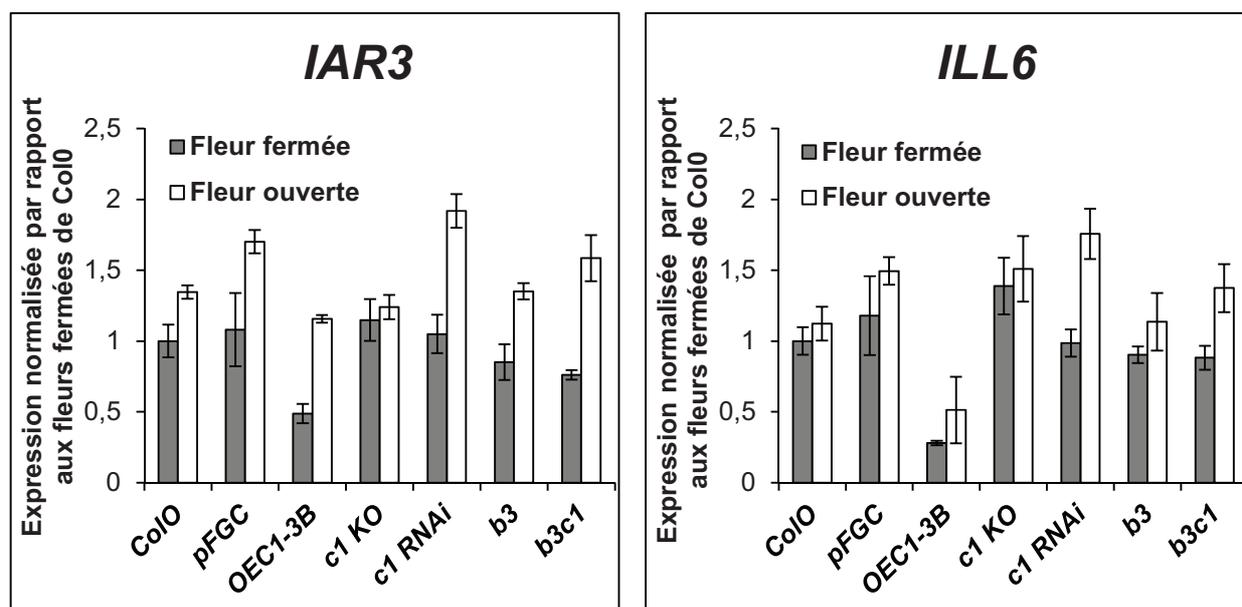


Figure 6-14 : Expression des amido-hydrolases *IAR3* et *ILL6* (RT-qPCR) dans les fleurs fermées (barres grises) ou ouvertes (barres blanches) chez les lignées mutées pour l'expression de *CYP94s*. L'expression présentée est la moyenne \pm SD de 3 déterminations rapportées aux fleurs fermées de Col0.

Les amido-hydrolases *IAR3* et surtout *ILL6* présentent une expression réduite chez les fleurs sur-exprimant *CYP94C1*. Ceci suggère que l'augmentation du turnover de JA-Ile par la voie oxydative pourrait être compensée partiellement par une réduction du turnover par la

voie hydrolytique qui est aussi sous le contrôle de JA-Ile et réduite chez OEC1. Un mécanisme de compensation entre les voies oxydatives et d'hydrolyse avait été également observé dans les feuilles lors de la blessure chez les mutants *iar3* et *ill6* (Widemann et al., 2013).

6.2.4.2 Expression des allènes oxyde cyclases *AOC1* et *AOC4* dans les fleurs des mutants *cyp94s*

Les allènes oxyde cyclases (AOCs) sont des enzymes de biosynthèse des jasmonates qui catalysent la formation d'OPDA (Hause et al., 2000). Parmi les quatre gènes *AOCs* existants chez *Arabidopsis thaliana*, *AOC1* et *AOC4* sont les plus exprimées dans les fleurs (Stenzel et al., 2012). Plus précisément, *AOC1* et *AOC4* sont exprimés fortement dans les pétales et les étamines. La figure 6-15 montre l'expression de ces gènes de biosynthèse de jasmonates dans les fleurs des lignées affectées dans l'expression de *CYP94s*.

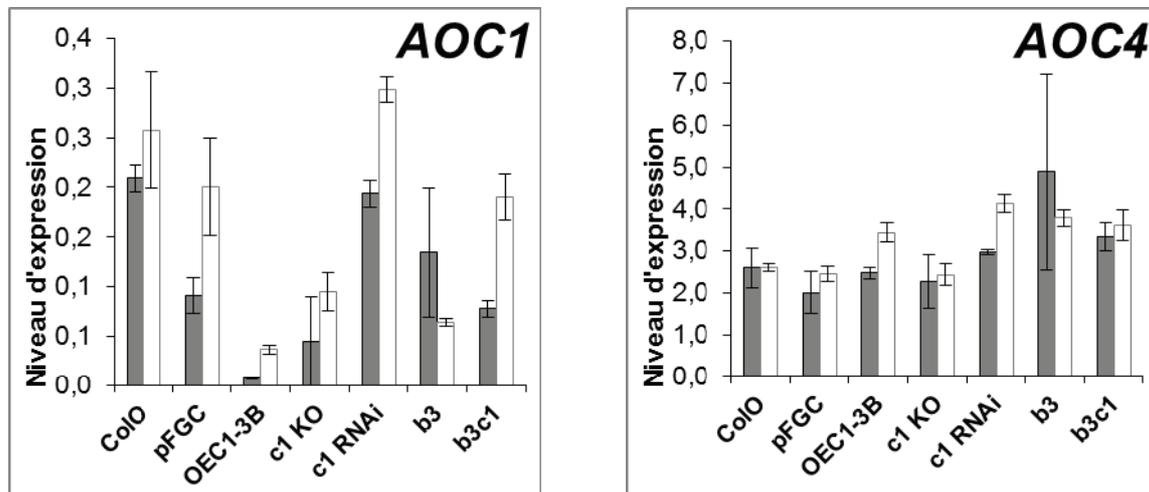


Figure 6-15 : Expression (RT-qPCR) des gènes de biosynthèse de jasmonates *AOC1* et *AOC4* dans les fleurs fermées (barres grises) ou ouvertes (barres blanches) chez les lignées mutées pour l'expression de *CYP94s*. Les expressions sont représentées en $\Delta\Delta C_t$, uniquement corrigés par les deux gènes de référence.

L'expression d'*AOC4* n'est pas affectée chez les mutants KO. En revanche, celle d'*AOC1* est fortement réduite dans les fleurs fermées et ouvertes du sur-expresser de *CYP94C1*. Ceci suggère qu'une oxydation plus intense de JA-Ile pourrait diminuer la

biosynthèse des jasmonates générée par *AOC1*. Un peu moins de JA-Ile pourrait diminuer l'expression d'*AOC1*.

Le double mutant *aoc1aoc4* n'est pas mâle stérile et il y a une forte redondance des quatre AOCs. Contrairement à *AOC1*, *AOC4* n'est pas fortement exprimée dans la partie apicale de l'anthere. Le 12COOH-JA-Ile pourrait donc avoir un impact sur l'expression de gène de biosynthèse d'OPDA spécifiquement dans la partie apicale de l'anthere. Plus la quantité d'hormone carboxylée est forte, plus la synthèse de jasmonates serait inhibée, ce qui permettrait la diminution de la quantité de JA-Ile après déhiscence chez Col0.

L'expression d'*AOC1* est affectée mais pas celle d'*AOC4*, suggérant que l'expression de ces 2 gènes est régulée différemment. Il a été décrit que le promoteur d'*AOC1* comporte un élément canonique de réponse à l'auxine (TGTCTC) pour les ARFs (O'Connor et al., 2005; Stenzel et al., 2012). J'ai recherché ce motif dans la séquence du promoteur d'*AOC4* à l'aide de la base de données ATHENA (O'Connor et al., 2005) (<http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/home.pl>). La base de données, qui montre ce motif de liaison aux ARFs dans la séquence d'*AOC1*, n'indique cependant pas la présence de ce motif dans la séquence promotrice d'*AOC4*. Les différences spécifiques d'expression d'*AOC1* observées chez les mutants *CYP94C1* pourraient donc provenir d'une modification de l'induction de l'expression d'*AOC1* contrôlée par cette région promotrice. Ainsi la modification de l'expression de *CYP94C1* pourrait avoir un impact négatif sur les ARFs qui se fixent au promoteur d'*AOC1* et permettent sa transcription. Il pourrait s'agir des ARF6 et ARF8 qui sont décrites pour promouvoir la synthèse de JA. Cela suggère que l'oxydation des jasmonates pourrait également avoir un effet sur des éléments de signalisation de l'auxine.

6.2.4.3 Expression des facteurs de transcription *MYB21* et *MYB24* dans les fleurs des mutants d'expression de *CYP94s*.

MYB21 et *MYB24* sont impliqués dans la fertilité mâle, plus particulièrement dans l'élongation du filet des étamines et la déhiscence des anthères au stade 12 (Mandaokar et al., 2006). Leur régulation par la molécule JA-Ile n'a pas été rapportée. Pour déterminer si la perte ou l'excès d'oxydation de JA-Ile pourraient avoir un impact sur des éléments de la

signalisation JA dans les fleurs, nous avons examiné l'expression de ces facteurs de transcription.

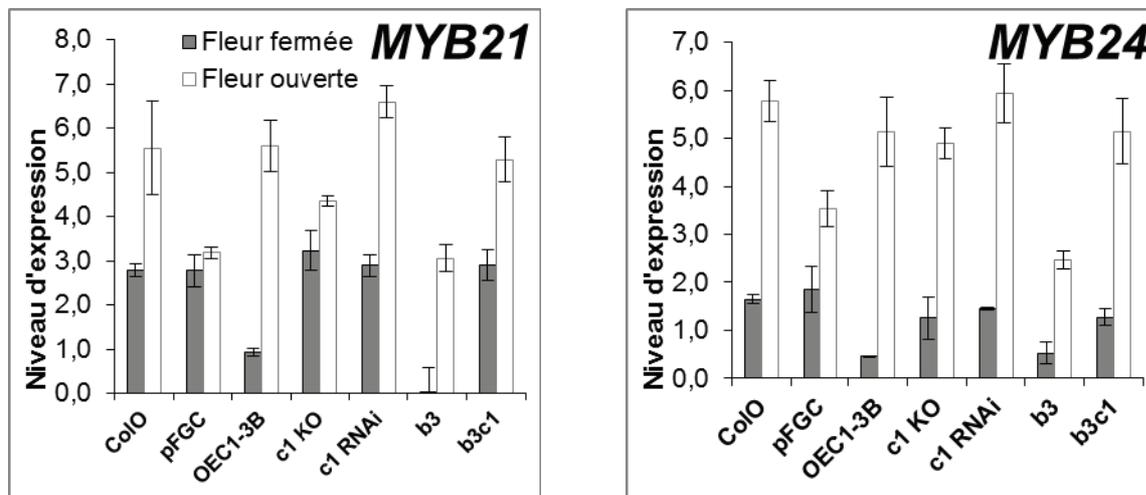


Figure 6-16 : Expression (RT-qPCR) de gènes de signalisation (facteurs de transcription *MYB21* et *MYB24*) dans les fleurs fermées (barres grises) ou ouvertes (barres blanches) chez les mutants *cyp94s*.

Les résultats présentés dans la figure 6-16 montrent que *MYB21* et *MYB24* ont une expression réduite dans les fleurs fermées du mutant sur-exprimant *CYP94C1*, indiquant que des éléments de signalisation de la voie hormonale jasmonate sont affectés. Des tests d'interaction avec le système de levure double hybride ont mis en évidence les interactions protéiques des facteurs de transcription *MYB21* et *MYB24* avec les répresseurs *JAZ1*, *JAZ8*, *JAZ10* et *JAZ11* (Song et al., 2011). La diminution de l'expression des gènes *MYB21* et *MYB24* eux-mêmes dans les fleurs fermées sur-exprimant *CYP94C1* pourrait être la conséquence d'une inhibition plus forte par les répresseurs *JAZs*. Pour étudier cette hypothèse, nous avons examiné l'expression des gènes *JAZs* dans les fleurs.

6.2.4.4 Expression des gènes *JAZs*

6.2.4.4.1 Expression des 12 gènes *JAZs* dans des fleurs de *Col0*

Pour déterminer quels répresseurs de transcription *JAZs* pourraient intervenir dans la signalisation des jasmonates au cours du développement floral, l'expression des 12 gènes *JAZs* a été examinée par RT-qPCR chez *Col0* dans des fleurs fermées ou ouvertes (Figure 6-17).

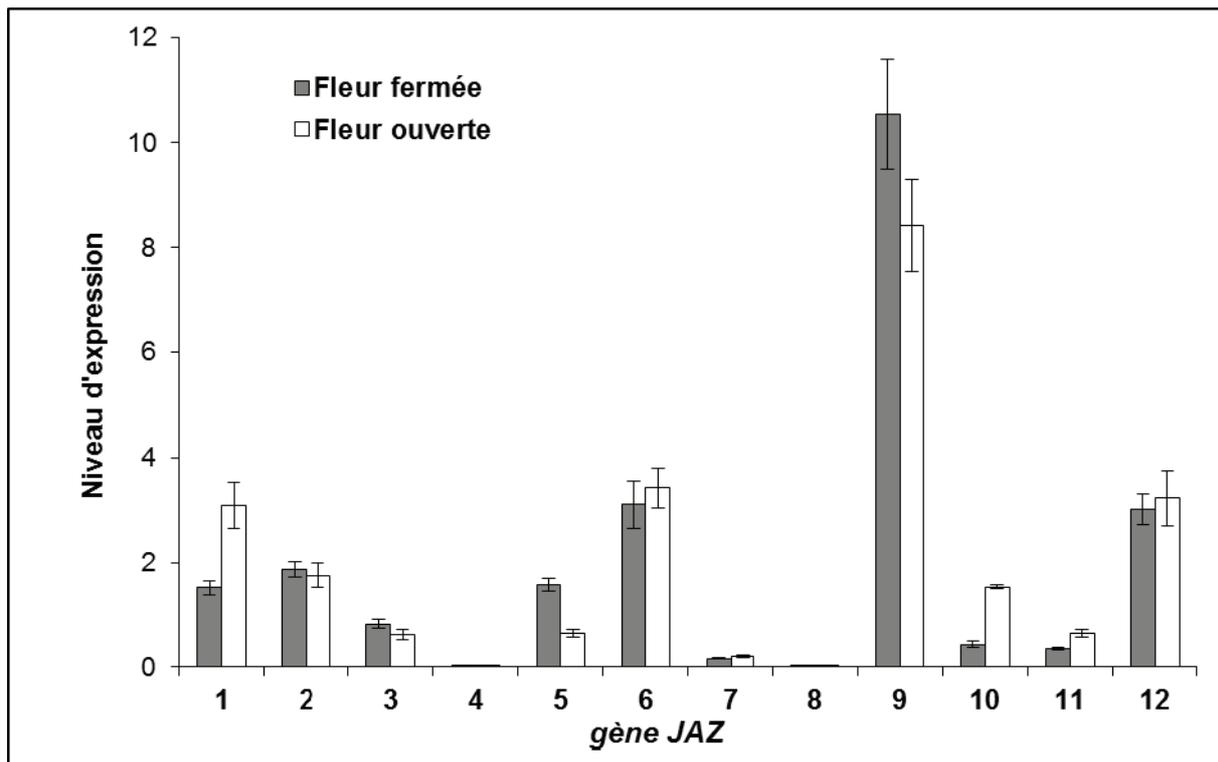


Figure 6-17 : Expression des 12 gènes *JAZs* (RT-qPCR) dans des fleurs de Col0 fermées (barres grises) ou ouvertes (barres blanches).

Dans les fleurs, le niveau d'expression de ces gènes répresseurs de la voie JA est très différent selon les *JAZs*. D'une part, certaines *JAZs* sont fortement exprimées, d'autres beaucoup moins. D'autre part, seuls certains gènes (*JAZ1*, *JAZ3*, *JAZ5*, *JAZ9*, *JAZ10* et *JAZ11*) ont une expression légèrement différente selon l'état de développement de la fleur (fermée ou ouverte). Il est donc possible que ces gènes soient préférentiellement impliqués dans la régulation des réponses jasmonates dans le cadre du développement floral.

6.2.4.4.2 Expression de *JAZ1*, *JAZ3*, *JAZ5*, *JAZ9*, *JAZ10*, *JAZ11* dans les fleurs de mutants d'expression de *CYP94s*.

L'expression des *JAZs* potentiellement impliquées dans le développement floral pouvant éventuellement être influencée par les niveaux de JA-Ile ou ses formes oxydées, nous avons mesuré l'expression de ces gènes chez les mutants de la voie oxydative de JA-Ile.

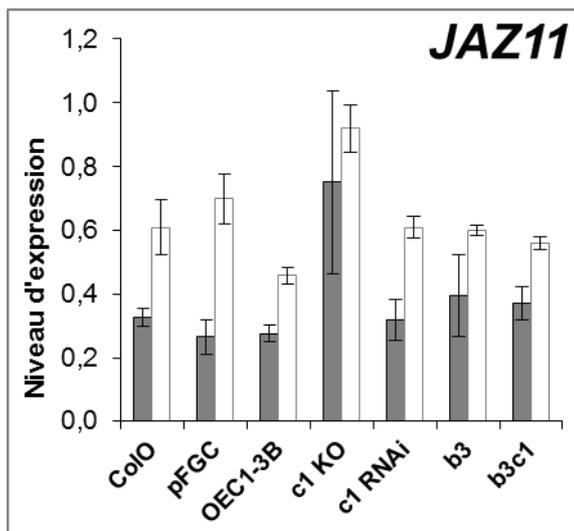
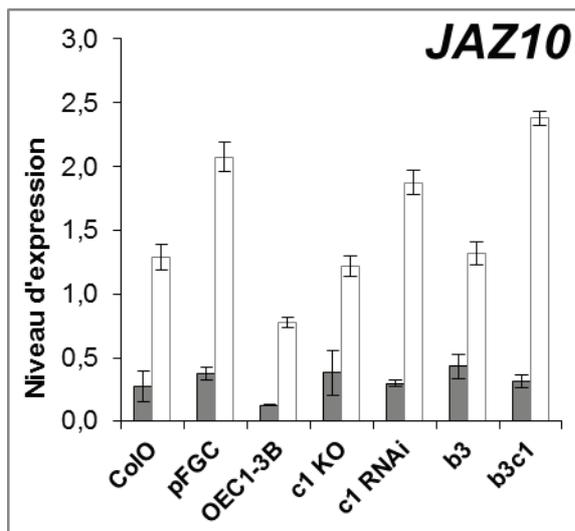
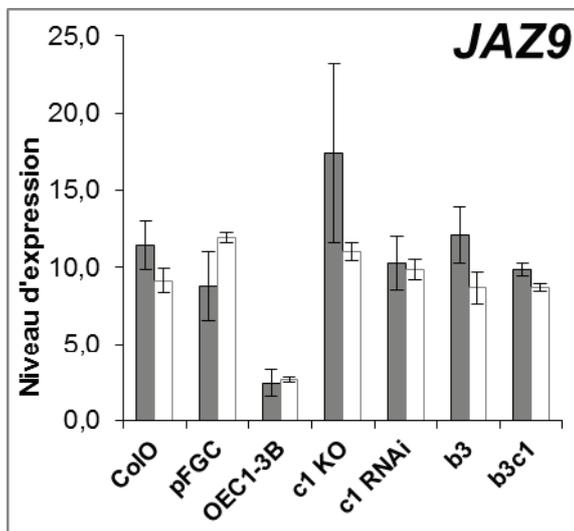
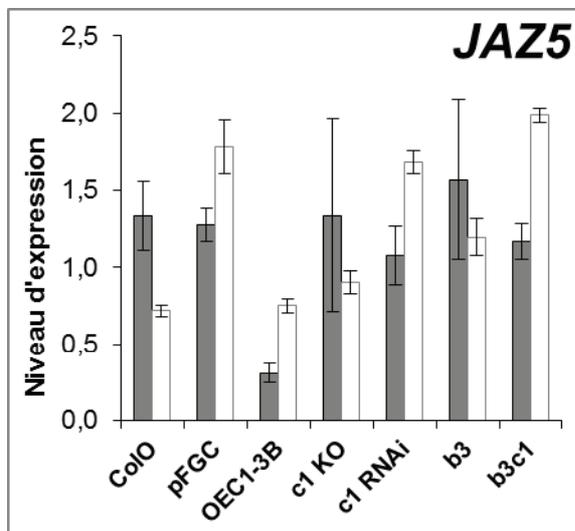
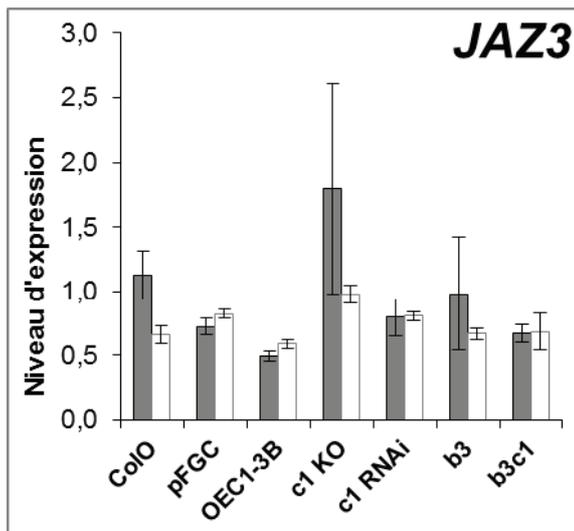
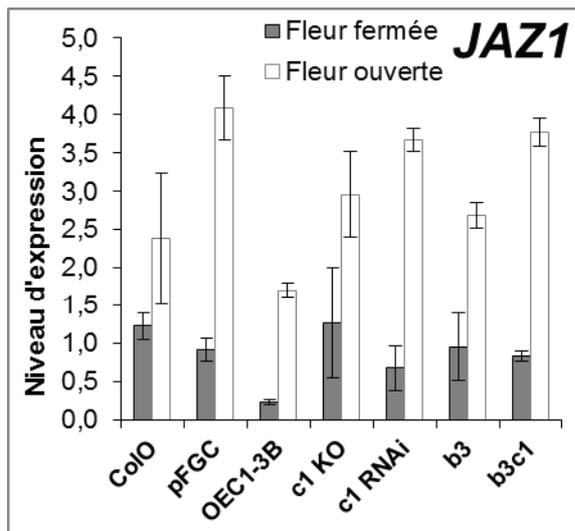


Figure 6-18 : Expression des gènes *JAZ1*, *JAZ3*, *JAZ5*, *JAZ9*, *JAZ10* et *JAZ11* (RT-qPCR) dans les fleurs fermées (barres grises) ou ouvertes (barres blanches) de mutants *cyp94s*.

La figure 6-18 montre que les *JAZ3*, *JAZ10* et *JAZ11* ne présentent pas de forte différence d'expression entre les plantes mutantes et Col0. En revanche, *JAZ1*, *JAZ5* et *JAZ9* sont moins exprimées dans les fleurs fermées des plantes sur-exprimant *CYP94C1*. Chez le mutant sur-exprimant *CYP94C1*, JA-Ile est moins abondant (seulement légèrement pour le premier lot de plantes sur lequel ces analyses transcriptionnelles ont été effectuées, alors que JA-Ile est trois fois moins abondant chez *OEC1* dans le second lot de plantes). Cela pourrait signifier qu'un niveau élevé de JA-Ile est requis pour induire l'expression de ces *JAZs*. Une autre possibilité est que le 12COOH-JA-Ile produit par *CYP94C1* et surabondant chez le mutant *OEC1* pourrait avoir une activité inhibitrice sur l'expression de ces *JAZs* dans les fleurs fermées.

La réduction de l'expression de certains répresseurs *JAZs* indique que la surexpression de *CYP94C1* a également un effet inhibiteur sur les rétrocontrôles négatifs de la voie des jasmonates. La diminution de l'expression de *MYB21* et *MYB24* ne semble donc pas due, comme nous l'avions suggéré, à une plus forte répression des *JAZs*. Au contraire, la diminution de l'expression des *JAZs* correspond probablement à une répression moins forte des gènes de réponse au JA et pourrait éventuellement contrebalancer en partie la diminution de l'expression des facteurs de transcription *MYB21* et *MYB24* pour assurer finalement la fertilité. Les facteurs de transcription *MYB21* et *MYB24* interagissent avec les répresseurs *JAZ1*, *JAZ10* et *JAZ11* (Song et al., 2011), on peut supposer que la plante adapte les quantités de facteurs de transcription et de répresseurs des facteurs de transcription pour maintenir les processus développementaux.

En résumé, ces études transcriptionnelles n'ont pas montré de changements chez les mutants KO, mais ont mis en évidence que chez le mutant *OEC1* qui oxyde davantage JA-Ile que Col0, l'expression de certains gènes des voies de biosynthèse et de catabolisme hydrolytique de JA-Ile est affaiblie et l'expression de gènes de signalisation jasmonates est également affectée. *CYP94C1* a donc un effet général d'atténuation de la signalisation JA-Ile dans les fleurs.

6.2.4.5 Expression des myrosinases TGG1 et TGG2 dans les fleurs des mutants d'expression de *CYP94s*.

TGG1 et TGG2 sont des myrosinases, des enzymes catalysant la libération de composés de défense volatils par hydrolyse de glucosinolates. Il a été décrit que la quantité de protéines TGG1 et TGG2 présente dans les fleurs est COI1-dépendante (Capella et al., 2001; Chua et al., 2010), donc probablement partiellement dépendante de la perception de JA-Ile.

Afin de déterminer si la dérégulation du métabolisme oxydatif de JA-Ile peut impacter l'expression de gènes de défense COI1-dépendante, nous avons mesuré l'expression des gènes *TGG1* et *TGG2* dans les fleurs des mutants d'expression *CYP94s* (Figure 6-19). Chez la lignée sur-exprimant *CYP94C1*, l'expression des myrosinases *TGG1* et *TGG2* est fortement réduite. Une oxydation plus élevée de JA-Ile semble donc avoir un impact négatif sur l'expression de gènes de défense COI1-dépendante dans la fleur.

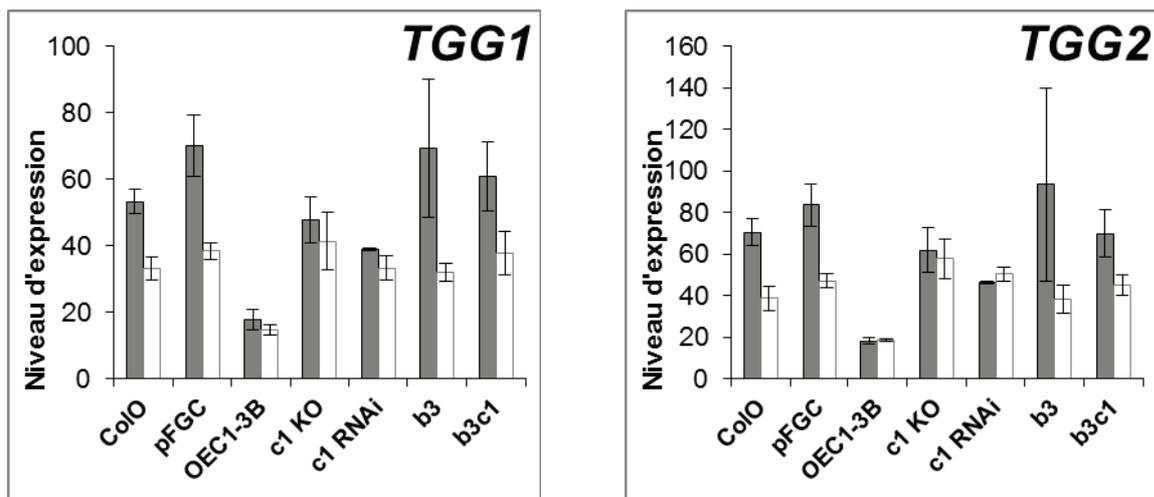


Figure 6-19 : Expression (RT-qPCR) des myrosinases *TGG1* et *TGG2* dans les fleurs fermées (barres grises) ou ouvertes (barres blanches) chez les lignées mutées pour l'expression de *CYP94s*.

En résumé, un métabolisme oxydatif plus intense de JA-Ile semble donc impacter l'expression d'autres enzymes impliquées dans le turnover de JA-Ile, ainsi que l'expression d'éléments de signalisation de la voie des jasmonates (facteurs de transcription, répresseurs JAZ) et finalement de gènes de défense sous contrôle de COI1. Les oxydations *CYP94s*-dépendantes atténuent donc la signalisation JA-Ile dans modèle développemental.

Ces résultats demandent à être confirmés sur un autre lot de plante.

6.2.5 Phénotype des mutants de gènes *CYP94s*

La signalisation des jasmonates COI1-dépendante est nécessaire pour la maturation du pollen et la déhiscence des anthères. Les *CYP94s* jouant un rôle dans le métabolisme des jasmonates au niveau de la fleur, des phénotypes particuliers des étamines ou des grains de pollen pourraient éventuellement apparaître chez les plantes ayant une expression modifiée des gènes *CYP94s*. Pour examiner la déhiscence des anthères et la structure (forme et réticulation) des grains de pollen des mutants, des observations ont été réalisées à l'aide d'un mini-microscope électronique à balayage (miniMEB), puis la viabilité des grains de pollen a été déterminée par la coloration d'Alexander et leur capacité à germer a été visualisée par coloration des tubes polliniques au bleu d'aniline.

6.2.5.1 Aspect des étamines, pistil, pollen (miniMEB)

Les observations d'anthère déhiscente, de papilles stigmatiques et de grains de pollen de plantes ayant des expressions modifiées de *CYP94s*, obtenues par microscopie électronique à balayage (miniMEB), sont présentées dans les annexes 1, 2 et 3. Aucun phénotype particulier au niveau de ces structures n'a été noté chez les fleurs des plantes mutantes.

Un phénotype particulier a pu être observé pour certaines fleurs du mutant sur-exprimant *CYP94C1* (annexe 4), juste avant ouverture complète de la fleur, alors que les pétales commencent à être visibles (stade 13). Chez Col0, les anthères des étamines n'étaient pas visibles à l'extérieur de la fleur (annexe 4 A à J) tandis que certaines fleurs du mutant OEC1 (lignée OE-3B) avaient des anthères bien visibles et positionnées plus haut que le pistil, en raison d'un allongement exagéré du filet des étamines (annexe 4 K à R). Ce phénotype a pu être observé dans 3 lots de plantes indépendants, mais n'était pas visible sur toutes les plantes. Les voies hormonales de l'auxine et GA participant également à l'allongement de l'anthère (Song et al., 2013), il est possible que la sur-expression de *CYP94C1* impacte les balances JA/auxine/GA. Une nouvelle balance hormonale pourrait parfois se mettre en place chez ce mutant et induire ou lever une inhibition de l'expression de gènes impliqués dans l'allongement du filet de l'anthère.

6.2.5.2 Test de viabilité du pollen chez les mutants

Les *CYP94B1*, *CYP94B3* et *CYP94C1* sont exprimés dans les étamines. Les jasmonates sont nécessaires pour la maturation du pollen chez *Arabidopsis*, bien que leur lieu

de synthèse exact ne soit pas connu. La maturation du pollen a lieu dans les anthères, mais il est concevable que le catabolisme de l'hormone puisse également se produire dans les filaments et avoir un impact sur le développement des grains de pollen. CYP94B1 pourrait éventuellement métaboliser un autre jasmonate ayant un impact sur le développement du pollen. Afin d'examiner la viabilité des grains de pollen des mutants *cyp94s* et du sur-exprimant *CYP94C1*, ceux-ci ont été observés après avoir été colorés avec la solution d'Alexander. Comme le montrent les annexes 5 et 6, les grains de pollen de tous les mutants sont roses, couleur attestant leur viabilité.

6.2.5.3 Germination des grains de pollen

Par ailleurs, un impact éventuel des mutations sur la capacité de germination « *in vivo* », sur des pistils, a été examiné.

La germination des grains de pollen mutants sur les pistils mutants a été examinée par coloration des tubes polliniques au bleu d'aniline. Des tubes polliniques d'apparence normale ont pu être observés chez tous les mutants (Annexes 7 et 8). Une production de graines similaire à celle des plantes sauvages n'est donc pas étonnante.

L'ensemble des observations indique que les fonctions assurant la fertilité mâle, incluant la déhiscence des anthères, la libération de pollen mature ayant la capacité de germer, sont donc conservées chez les lignées ayant une expression modifiée des *CYP94s*.

6.3 Conclusion

Nous avons abordé de nouveaux aspects du métabolisme des JAs dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*. Ces travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois les niveaux relatifs de JA-Ile et de ses formes oxydées dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*. Les données de RT-qPCR et les lignées GUS montrent que les 6 *CYP94s* sont exprimés selon un pattern spécifique dans les fleurs, suggérant des fonctions particulières pour chaque P450. *CYP94C1* est exprimé dans les anthères des étamines et plus fortement après ouverture de la fleur. Les analyses métaboliques de jasmonates ont mis en évidence que les mutants ayant une expression réduite de *CYP94C1* (mutants knock-out et RNAi) ont des niveaux de 12COOH-JA-Ile extrêmement faibles, démontrant le rôle majeur de *CYP94C1* dans la carboxylation de l'hormone JA-Ile au sein de la fleur. Puisque *CYP94C1* est exprimé dans les anthères et produit la majorité des quantités détectables de 12COOH-JA-Ile, il est fort probable que la synthèse de 12COOH-JA-Ile ait lieu essentiellement dans ces pièces florales. La fleur étant un organe très complexe, une organisation spatiale très fine de la voie métabolique est en place.

La perte d'expression de *CYP94C1* ou sa surexpression n'affectent que peu les niveaux de l'hormone JA-Ile. Comme déjà observé dans les feuilles stressées du mutant sur-exprimant *CYP94C1*, la signalisation JA-Ile est affaiblie dans les fleurs, malgré des niveaux de JA-Ile peu affectés. Chez le mutant *OE1*, en dépit d'une carboxylation excessive de l'hormone et d'une diminution de l'expression de gènes de biosynthèse (*AOC1*) et de signalisation des jasmonates (facteurs de transcription *MYB21* et *MYB24*), les niveaux de l'hormone JA-Ile sont maintenus à une quantité proche de celle des plantes de type sauvage dans le premier lot de plantes analysé et le mutant est fertile. Des mécanismes compensatoires au niveau métabolique pour contrôler le turnover de JA-Ile (catabolisme par *IAR3* et *ILL6*), mais également au niveau transcriptionnel de la signalisation (répresseurs JAZs) pourraient contribuer à assurer la fertilité du mutant sur-exprimant *CYP94C1*.

6.4 Discussion

Chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons observé des niveaux de JA plus élevés que ceux de JA-Ile dans les fleurs ouvertes, contrairement aux fleurs matures de tomate où les quantités de JA-Ile sont plus élevées que celles de JA (Hause et al., 2000). Les profils de jasmonates semblent donc espèce-spécifiques.

Nous avons observé que CYP94C1 joue un rôle prépondérant pour l'oxydation de JA-Ile dans les fleurs. *CYP94C1* est exprimé majoritairement dans l'anthère des étamines et *CYP94B1* dans le filet des étamines et dans les pétales. Il y a donc une spécificité dans le pattern d'expression des *CYP94s* dans les fleurs. Une spécificité d'expression de gènes d'une même famille dans la fleur d'*Arabidopsis thaliana* a également été observée pour les gènes *AOCs* de biosynthèse de JA et pour les gènes *GA3ox* de biosynthèse de GA (Hu et al., 2008; Stenzel et al., 2012).

Le rôle de CYP94B3 dans la fleur reste à découvrir. L'analyse de son profil transcriptionnel par RT-qPCR dans des fleurs disséquées a montré que ce gène est exprimé au maximum dans les pétales des fleurs totalement ouvertes. La localisation et les quantités de JA-Ile dans chaque pièce florale demandent à être élucidées pour mieux comprendre le rôle de l'hormone. D'après les résultats concernant CYP94C1, la carboxylation de JA-Ile a très probablement lieu dans les anthères ce qui suggère que JA-Ile est accumulé dans cette structure. L'étamine est une pièce florale complexe, au sein de laquelle des gènes de biosynthèse, de signalisation et d'inactivation de JA-Ile sont exprimés. Certains gènes de biosynthèse ont des patterns d'expression restreints au sein de l'étamine, par exemple *DAD1* est exprimé dans le filet, *AOS* est exprimé dans les faisceaux vasculaires de l'anthère et *AOC4* dans la partie basale de l'anthère (Ishiguro et al., 2001; Park et al., 2002; Stenzel et al., 2012). L'activité tissulaire spécifique de ces gènes de biosynthèse suggère qu'il pourrait y avoir un transport des précurseurs successifs des jasmonates dans le sporophyte mâle, du filet vers l'anthère, et que le contrôle des niveaux de JA-Ile pourrait être assuré en aval par CYP94C1, qui est exprimé dans toute l'anthère.

Les mutants que nous avons étudiés sont fertiles. La fonction de l'oxydation de JA-Ile après ouverture de la fleur dans les anthères déhiscentes reste à définir. L'oxydation de JA-Ile pourrait être nécessaire pour qu'une signalisation mène au dessèchement des étamines une fois le pollen mature libéré. Chez les mutants KO, le blocage de la voie oxydative n'élève pas

significativement les niveaux de JA-Ile, montrant que d'autres mécanismes de gestion hormonale existent ou se mettent en place chez ces lignées.

CYP94B1 catalyse probablement l'oxydation d'un autre métabolite que JA-Ile et JA-Phe dans les fleurs, peut-être l'oxydation d'un autre conjugué JA-acide aminé. Chez *Pisum sativum*, le conjugué JA-Trp est 58 fois plus abondant que JA-Ile dans les fleurs, suggérant que JA-Trp pourrait également jouer un rôle dans cet organe (Staswick, 2009a). Le conjugué JA-Tyr est par ailleurs accumulé dans les fleurs de *Vicia faba* (Kramell et al., 2005). Il serait intéressant de connaître les quantités de tous les conjugués JA-acide aminés dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* pour déterminer lesquels pourraient être impliqués dans la signalisation des jasmonates contrôlant le développement floral chez cette espèce. Des conjugués JA-acide aminés pourraient également être des formes de stockage de JA.

COI1 est nécessaire au développement floral (Xie et al., 1998). Les oxydations de JA-Ile dans les fleurs suggèrent que les niveaux de ce conjugué doivent être contrôlés. Cependant, il reste à démontrer si JA-Ile est la seule hormone de type jasmonate active dans les fleurs car le mutant *jar1* est fertile. JA-Phe est formé seulement partiellement par JAR1 dans les feuilles, indiquant l'existence d'autres enzymes de conjugaison. On peut imaginer qu'un autre conjugué JA-acide aminé, produit par une autre enzyme que JAR1, pourrait avoir la capacité à lier COI1 et promouvoir des processus de développement floral.

RESULTATS partie 3 :
Diversité de l'oxydation de conjugués
JA-acides aminés : exemple de l'étude
de JA-Phe

7 IDENTIFICATION DE NOUVEAUX JASMONATES OXYDES : CYP94B3 ET CYP94C1 CATALYSENT LA CARBOXYLATION DE JA- PHE ET DE JA-ILE VIA DES INTERMEDIAIRES ALDEHYDES

7.1 Introduction et hypothèse de travail

JA-Ile est une phytohormone qui résulte de la conjugaison de l'acide jasmonique avec l'isoleucine par l'enzyme JAR1 (Staswick et Tiryaki, 2004; Thines et al., 2007). Bien que la majorité des travaux de recherche ait été consacrée au rôle de JA-Ile, il est cependant très probable que d'autres conjugués JA-acide aminé soient des acteurs dans la régulation des réponses aux jasmonates. Cette idée est soutenue par l'activité de JAR1, qui est capable de conjuguer JA avec environ la moitié des acides aminés existants, avec des efficacités variables *in vitro* (Staswick et Tiryaki, 2004). Ces conjugués n'ont pas tous été détectés chez *Arabidopsis thaliana*, car ils sont probablement présents dans des organes particuliers, à un stade de développement donné ou dans certaines conditions environnementales. Le rôle fondamental d'autres conjugués JA-acide aminé que JA-Ile a été illustré récemment avec la découverte du rôle possible du conjugué Jasmonoyl-Tryptophane (JA-Trp). Ce composé a été décrit comme étant un inhibiteur d'auxine endogène, dans le contexte de croissance racinaire (Staswick, 2009b).

Jasmonoyl-Phénylalanine (JA-Phe, figure 7-1) représente un autre conjugué JA-acide aminé qui pourrait avoir des propriétés biologiques.

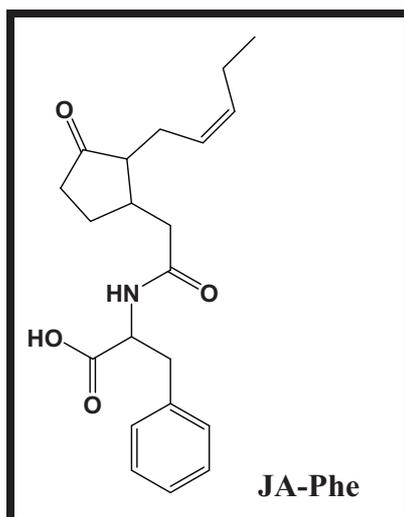


Figure 7-1 : Structure du conjugué Jasmonoyl-Phénylalanine (JA-Phe).

Chez le riz, le conjugué (JA-Phe) est un fort éliciteur de la synthèse de la phytoalexine sakuranetine, en induisant la naringénine 7-O-méthyltransférase (Tamogami et al., 1997). Chez *Arabidopsis thaliana*, JA-Phe est synthétisé dans les plantules de deux semaines (Staswick et Tiryaki, 2004) et des travaux ont montré que la blessure entraîne une accumulation de JA-Phe dans les feuilles blessées (Koo et al., 2009). La fonction biologique de ce conjugué est encore inconnue chez *Arabidopsis thaliana*. Cependant, il a été montré qu'un traitement JA-Phe permet d'inhiber la croissance racinaire, indiquant que ce conjugué permet probablement d'activer la voie des jasmonates (Fonseca et al., 2009a).

Des études enzymologiques ont montré que JAR1 catalyse la formation de JA-Phe *in vitro*. Cependant dans les plantules *jar1*, les niveaux de JA-Phe sont plus élevés que chez les plantes de type sauvage, suggérant qu'une autre enzyme forme ce conjugué dans les plantules (Staswick et Tiryaki, 2004).

Pour déterminer si l'accumulation de JA-Phe est dépendante de JAR1 dans les feuilles blessées de plantes adultes âgées de 7 semaines, nous avons mesuré les niveaux de JA-Phe chez le mutant *jar1* après blessure. Comme le montre la figure 7-2, l'accumulation de JA-Phe est plus progressive que celle de JA-Ile et les niveaux maximum ne sont atteints que 2 h après blessure chez les plantes de type sauvage Col0. Les niveaux de JA-Phe sont réduits dans les feuilles blessées du mutant *jar1*, indiquant l'implication de JAR1 dans sa synthèse (Figure 7-2).

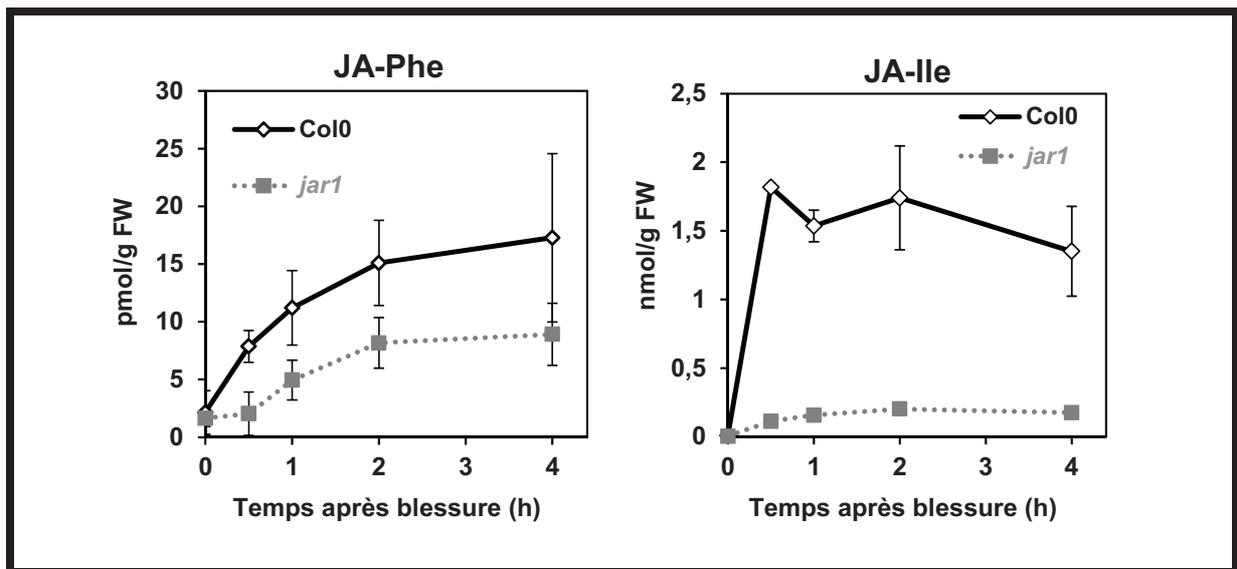


Figure 7-2 : Cinétiques d'accumulation de JA-Phe et de JA-Ile dans les feuilles blessées de Col0 et de *jar1*, mesurées par analyse UPLC-MS/MS. Les valeurs sont les moyennes (\pm SD) de 3 réplicats biologiques.

Cependant, alors que l'accumulation de JA-Ile est hautement dépendante de JAR1 (figure 7-2 et Koo et al. (2009)) nous avons détecté chez le mutant *jar1* une accumulation significative de JA-Phe à partir d'1 h après blessure. Notamment 2 h après blessure, les niveaux de JA-Phe chez *jar1* atteignent 50% de ceux de Col0. Ceci indique que l'accumulation de JA-Phe est seulement partiellement dépendante de JAR1 et qu'il existe une voie de synthèse alternative permettant l'accumulation de JA-Phe dans les feuilles blessées.

La synthèse de JA-Phe par une autre voie que JAR1 et son accumulation maximale plus tardive que celle de JA-Ile ont renforcé notre idée que JA-Phe pourrait également avoir des propriétés de signalisation et contrôler des réponses physiologiques différentes de celles de JA-Ile. Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 3, pages 102-119), CYP94B3 et CYP94C1 participent à la régulation des niveaux de JA-Ile. Nous avons donc posé l'hypothèse que les niveaux de JA-Phe pourraient être également contrôlés par un métabolisme oxydatif assuré par des CYP94s (Figure 7-3).

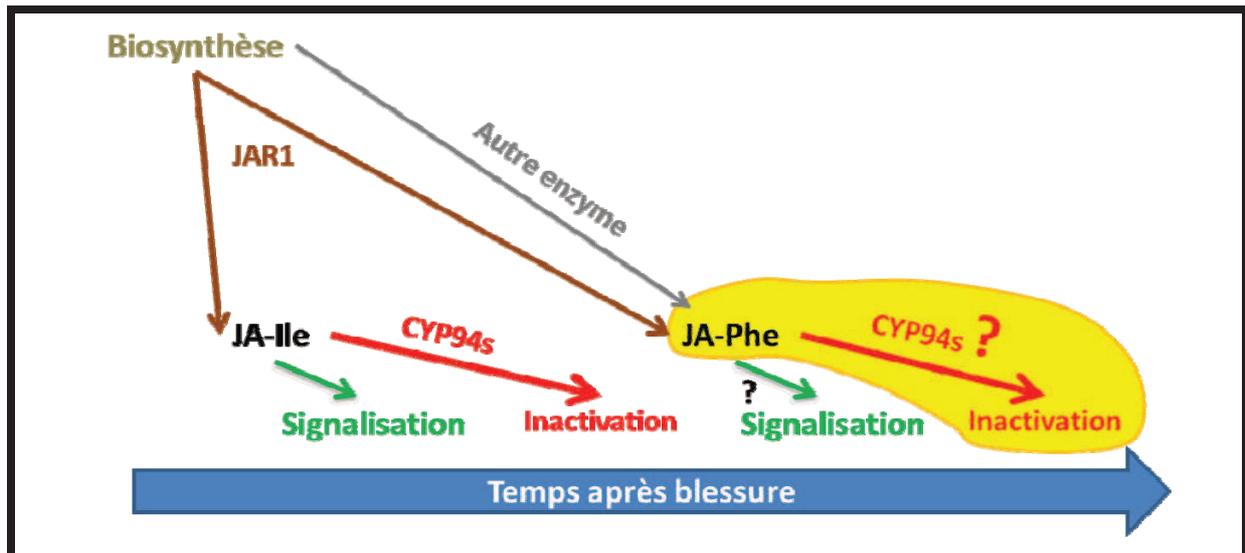


Figure 7-3 : Hypothèse de l'inactivation potentielle de JA-Phe par oxydations dépendantes de CYP94s. JA-Phe est synthétisé par JAR1 et une enzyme inconnue lors de la blessure. Son accumulation plus tardive que celle de JA-Ile suggère que ce conjugué pourrait assurer une signalisation contrôlant des réponses tardives. La molécule de signalisation JA-Ile étant inactivée par les oxydations catalysées par les CYP94s, une inactivation potentielle de JA-Phe par ces mêmes enzymes est envisagée.

Pour étudier cette hypothèse, il était nécessaire de mettre au point la détection des conjugués oxydés de JA-Phe afin de pouvoir les rechercher par UPLC-MS/MS dans les extraits complexes de plante où ils seraient probablement peu abondants. Ces composés n'avaient pas encore été décrits lorsque nous avons démarré nos travaux et nous ne disposions pas de molécules synthétiques de référence. Les milieux d'incubation sont moins complexes que les extraits de plante et permettent de détecter plus facilement de nouveaux composés par une méthode d'analyse globale (SCAN) en spectrométrie de masse. Cette méthode permet de déterminer la masse du produit, puis les conditions de détection pour une analyse avec une méthode beaucoup plus sensible (MRM) peuvent être mises au point, permettant ultérieurement la recherche du nouveau composé dans des extraits complexes de plante. Notre stratégie a donc consisté à commencer par une approche biochimique, afin de déterminer si JA-Phe peut être métabolisé par des CYP94s *in vitro*. Si des composés oxydés de JA-Phe sont produits, l'établissement de leurs conditions d'analyse par UPLC-MS/MS permettrait ensuite de les rechercher dans les extraits de plante et de déterminer s'ils sont accumulés *in vivo*, éventuellement de manière CYP94-dépendante.

7.2 Métabolisme de JA-Phe par CYP94C1 *in vitro*

CYP94B3 et CYP94C1 ont la capacité d'hydroxyler et de carboxyler JA-Ile. Dans nos conditions, CYP94C1 est cependant plus actif *in vitro* que CYP94B3 pour catalyser l'oxydation complète de l'hormone, après hydroxylation. Nous avons donc d'abord testé les capacités de CYP94C1 à oxyder JA-Phe et former des dérivés 12OH-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe. Dans ce but, nous avons mis en œuvre une approche biochimique. Des microsomes de levure exprimant CYP94C1 ont été incubés en présence de JA-Phe puis les produits formés ont été recherchés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Des dérivés oxydés de JA-Phe n'ayant pas encore été décrits dans la littérature lorsque nous avons débuté ces travaux, nous avons d'abord recherché les produits formés en mode SCAN.

7.2.1 Analyse en mode SCAN des milieux d'incubation

7.2.1.1 Recherche de pic NADPH-dépendant

La figure 7-4 présente les chromatogrammes obtenus à partir d'incubations de CYP94C1 en absence ou en présence de NADPH, le co-facteur nécessaire à l'activité des cytochromes P450. Un pic NADPH-dépendant avec un temps de rétention de 8,63 min a été observé en SCAN ESI(+) et ESI(-) (Figure 7-4A et C respectivement). Le temps de rétention de ce pic étant plus court que celui de JA-Phe (10,29 min) sur la colonne en phase inverse, il est probable que le ou les produit(s) formés par CYP94C1 soient des composés oxydés de JA-Phe.

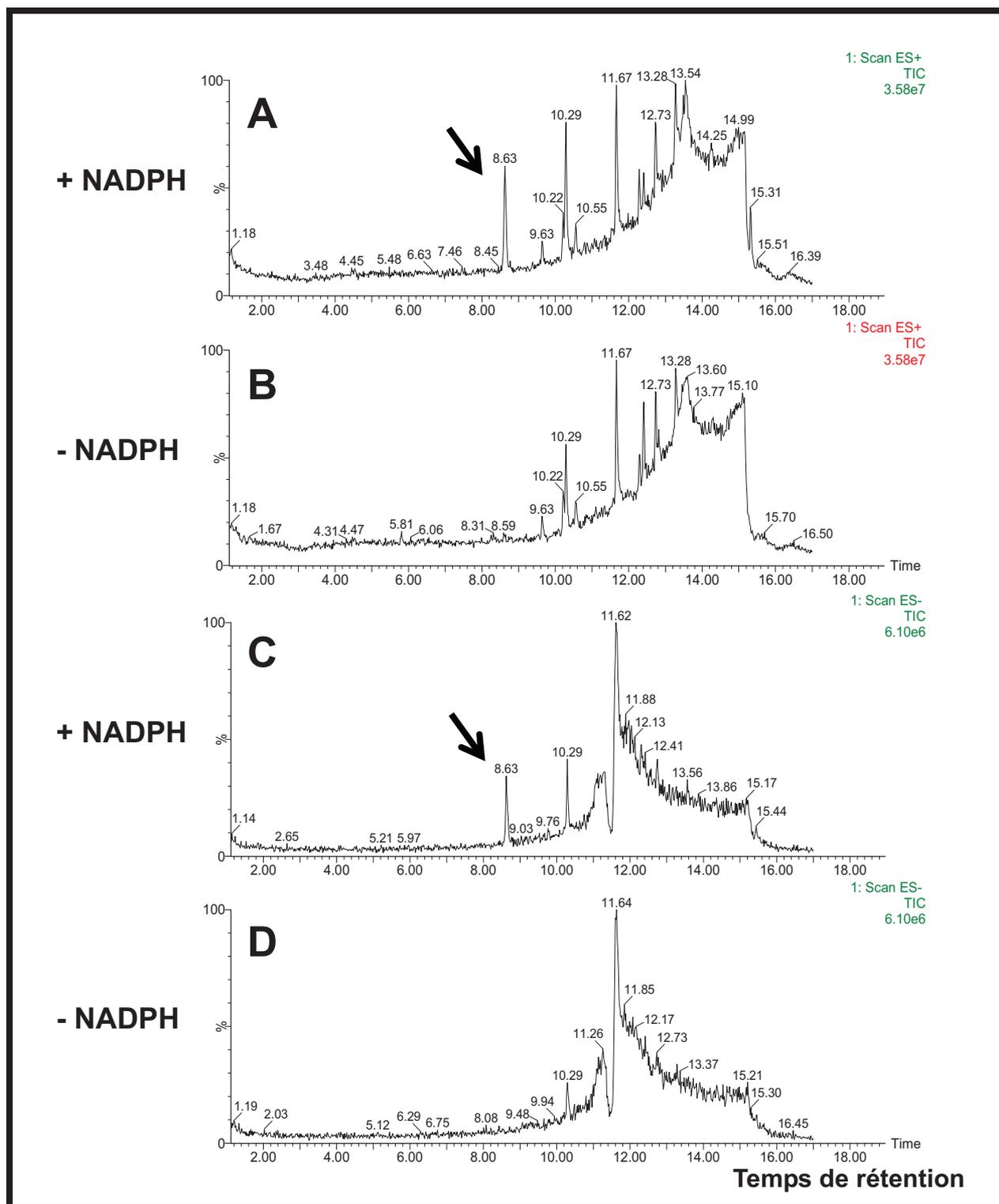


Figure 7-4 : Chromatogrammes des métabolites de JA-Phe produits par des microsomes de levure exprimant CYP94C1. Les SCANS ont été effectués en ESI(+) (A et B) ou ESI(-) (C et D). Les incubations de CYP94C1 avec JA-Phe ont eu lieu en présence de NADPH (A et C) ou en absence de NADPH (B et D). Les flèches désignent le pic NADPH-dépendant à 8,63 min.

7.2.1.2 Visualisation des masses m/z des ions contenus dans le pic NADPH-dépendant

Afin d'identifier le ou les produit(s) formé(s) par CYP94C1, nous avons recherché les ions présents au temps de rétention 8,63 min. Pour ceci, le spectre de masse des ions détectés au niveau de ce pic a été visualisé, pour les SCAN (ESI+) et ESI(-) (figure 7-5).

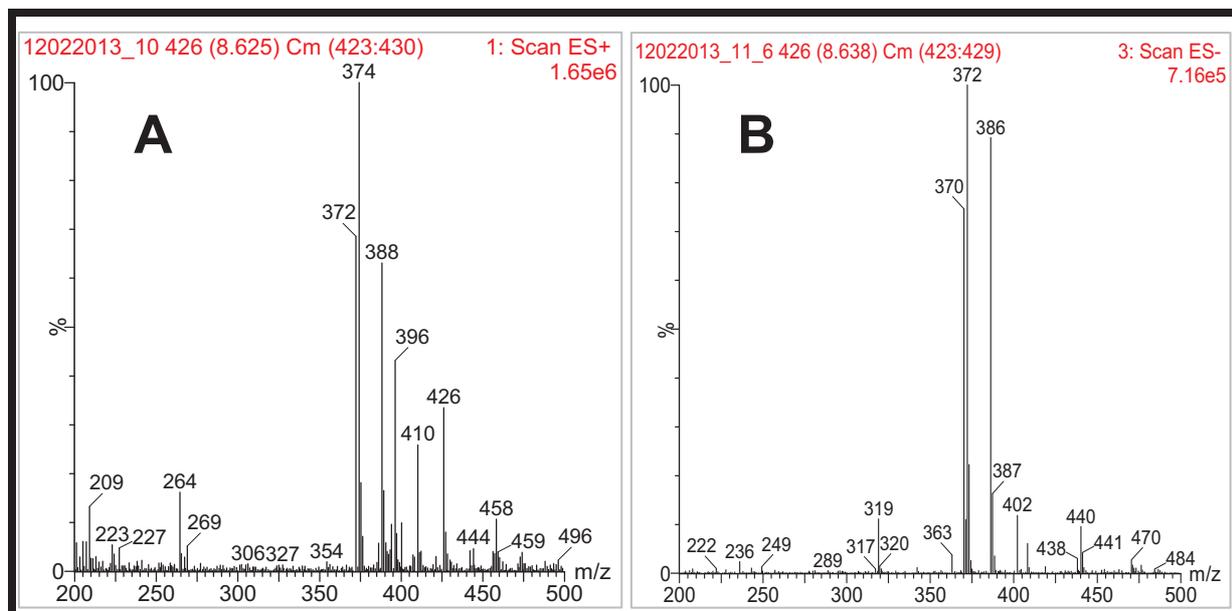


Figure 7-5 : Spectres d'ions des métabolites NADPH-dépendants produits dans les incubations de microsomes de levure exprimant CYP94C1 en présence de JA-Phe. Ces ions sont extraits du pic de la figure 7-4 dont le temps de rétention est 8,63 min, pour les SCANS en ESI(+) (Spectre A) ou en ESI(-) (Spectre B).

Les spectres d'ions de la figure 7-5, extraits des SCANS ESI(+) et ESI(-) au niveau du temps de rétention du pic NADPH-dépendant, sont assez complexes et suggèrent que plusieurs produits co-élués pourraient être formés par CYP94C1.

Les masses m/z 374 et 388 en ESI(+) (Figure 7-5A) et les m/z 372 et 386 en ESI(-) (Figure 7-5B) correspondent aux ions $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ prédits des 12OH-JA-Phe (masse= 373) et 12COOH-JA-Phe (masse= 387) potentiellement obtenus. Les ions de masse m/z 372 en ESI(+) et 370 en ESI(-) suggèrent la formation d'un 3^{ème} produit. Notre laboratoire avait déjà étudié l'activité de CYP94C1 avec des acides gras linéaires et un intermédiaire catalytique aldéhyde avait été identifié lors de la carboxylation du carbone terminal de la chaîne aliphatique (Kandel et al., 2007). Nous avons supposé que les ions m/z 372 en ESI(+) et 370 en ESI(-) pourraient être respectivement les $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ d'un intermédiaire catalytique aldéhyde potentiel, le 12CO-JA-Phe (masse= 371).

Des ions supplémentaires observés en ESI(+) pourraient correspondre à des adduits formés en source (figure 7-5): la masse m/z 396 correspond à celle d'un adduit $[M+Na]^+$ de 12OH-JA-Phe ; la masse m/z 410 un adduit $[M+Na]^+$ de 12COOH-JA-Phe ou bien un adduit $[M+K]^+$ de 12CO-JA-Phe ; la masse m/z 426 un adduit $[M+K]^+$ de 12COOH-JA-Phe.

Nous avons ensuite sélectionné une tension de cône optimale pour analyser les ions d'intérêt de masse m/z pouvant correspondre aux $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ de 12OH-JA-Phe, de 12CO-JA-Phe ou de 12COOH-JA-Phe. Pour les analyses en ESI(+), la détection des ions $[M+H]^+$ est optimale à 20 V. En ESI(-), les ions $[M-H]^-$ sont le mieux détectés avec une tension de cône de 30 V. La comparaison des signaux en mode ESI(+) et ESI(-) a montré que les signaux détectés étaient plus forts en mode positif, c'est pourquoi nous avons essentiellement utilisé le mode ESI(+) pour les analyses ultérieures.

CYP94C1 étant décrit comme capable d'hydroxyler et de carboxyler l'extrémité de la chaîne du JA du conjugué JA-Ile, la métabolisation de JA-Phe par CYP94C1 à cette même position est attendue : la production de 12OH-JA-Phe et de 12COOH-JA-Phe à partir de JA-Phe est cohérente d'un point de vue catalytique.

Afin de déterminer si le 3^{ème} produit de JA-Phe formé par CYP94C1 comporte effectivement une fonction aldéhyde, nous avons dû passer par une étape de dérivation.

7.2.2 Identification de 12CO-JA-Phe par dérivation à la méthoxyamine

La méthoxyamination est une méthode de dérivation chimique mettant en évidence les fonctions carbonyles d'une molécule. En présence de méthoxyamine hydrochloride, le groupement carbonyle d'une fonction aldéhyde ou cétone est remplacée par un groupement NOCH₃, ce qui ajoute une masse de 29 à la molécule de départ (Di Donna et al., 2013). Bien que cette méthode n'ait pas été appliquée auparavant pour des jasmonates, nous l'avons utilisée afin de vérifier la présence d'un groupement aldéhyde dans le composé 12CO-JA-Phe putatif.

JA-Phe et ses dérivés portent une cétone sur le pentacycle de la partie JA de la molécule. On s'attend donc à une dérivation au niveau de cette fonction carbonyle pour JA-Phe, 12OH-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et le 12CO-JA-Phe putatif (Figure 7-6). La fonction hydroxyle de

12OH-JA-Phe et la fonction carboxyle de 12COOH-JA-Phe ne sont pas sensibles à la méthoxyamine, alors que la fonction aldéhyde du 12CO-JA-Phe putatif sera normalement dérivatisée. Il en résulte que seul le 12CO-JA-Phe peut être dérivatisé deux fois : une première dérivatisation porte sur la cétone du pentacycle et la seconde dérivatisation porte sur la fonction aldéhyde en bout de chaîne (Figure 7-6).

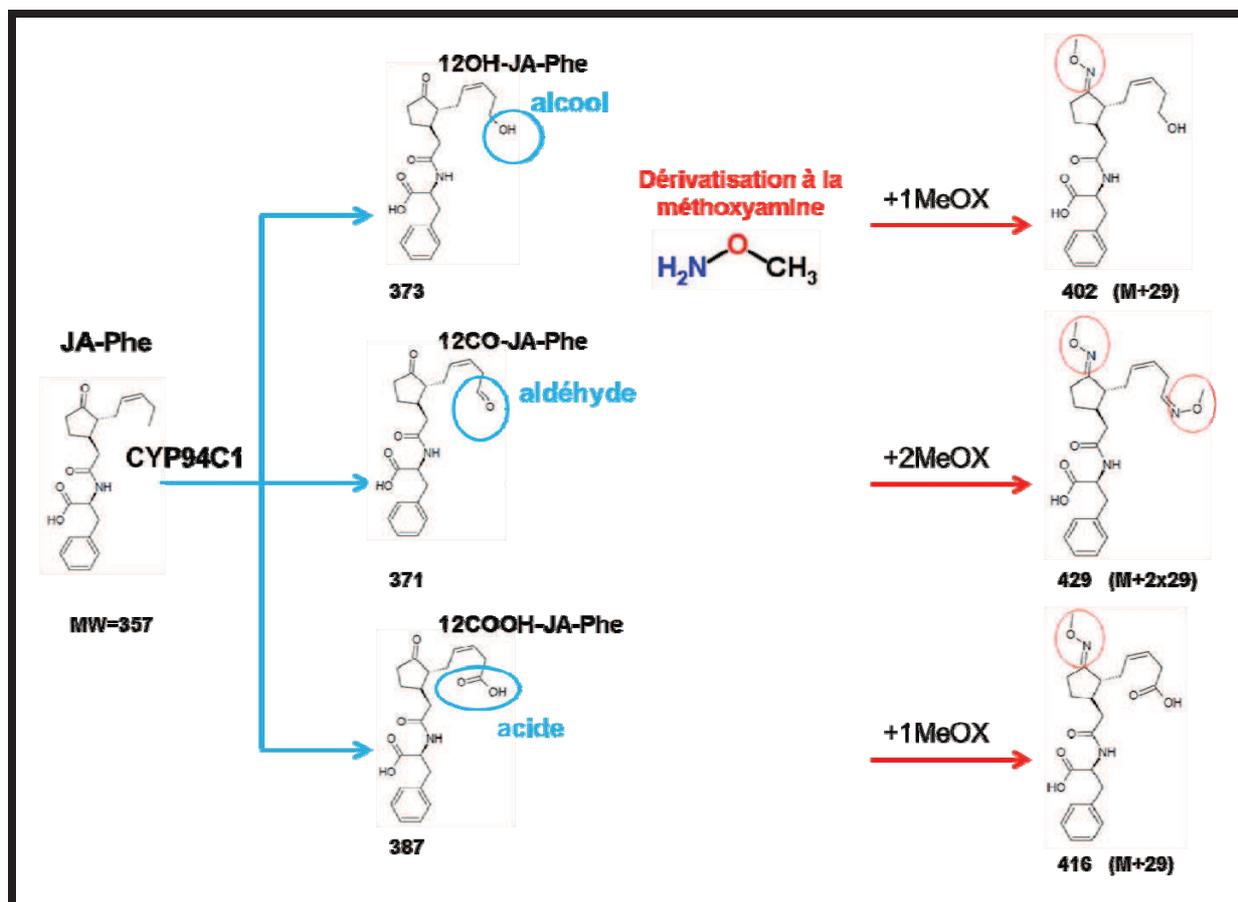


Figure 7-6 : Produits putatifs attendus après dérivatisation à la méthoxyamine des 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe. Les cercles rouges entourent les groupements NOCH₃ attendus après dérivatisation des fonctions carbonyles des composés.

L'extrait du milieu réactionnel en présence de NADPH contenant les microsomes de levure exprimant CYP94C1 avec JA-Phe a été traité avec de la méthoxyamine hydrochloride. Des analyses en UPLC-MS ont ensuite été réalisées et les ions correspondant aux molécules de JA-Phe, 12OH-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Phe non dérivatisées ou portant une ou deux dérivatisations ont été recherchés. L'ensemble des ions recherchés sont listés dans la figure 7-7.

ESI(+)	M	M + MeOX	M + (2 x MeOX)
JA-Phe	358	387	416
12OH-JA-Phe	374	403	432
12CO-JA-Phe	372	401	430
12COOH-JA-Phe	388	417	446

Figure 7-7 : Ions recherchés pour JA-Phe et ses formes oxydées avant et après réaction de méthyamination. Ensemble des m/z recherchées en mode ESI(+) correspondant aux ions des JA-Phe, 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe non-dérivatisés (M), dérivatisés une fois (M + MeOX) ou dérivatisés deux fois (M + (2 x MeOX)).

Les chromatogrammes des ions recherchés dans les extraits d'incubation, avant ou après traitement à la méthyamine, sont présentés dans la figure 7-8. JA-Phe, abondant avant dérivation (figure 7-8A), n'est plus détectable après dérivation (figure 7-8B). Par contre, un pic correspondant à JA-Phe dérivation une fois avec un temps de rétention de 11,08 min apparaît après traitement (figure 7-8D). On en déduit que la réaction de méthyamination a totalement consommé JA-Phe pour le dérivation une fois, alors qu'aucun signal correspondant à JA-Phe dérivation deux fois n'est observé (figures 7-8E et F). De la même manière, 12OH-JA-Phe est totalement consommé par le traitement (figures 7-8G et H) pour former un produit méthoxymé une fois (figures 7-8I et J). Tout comme pour JA-Phe, il n'y a pas de seconde dérivation (figures 7-8K et L). De manière similaire, la réaction de méthyamination est complète avec 12COOH-JA-Phe (figures 7-8S et T) pour former un produit méthoxymé une seule fois (figures 7-8U et V). Il n'y a pas de production de 12COOH-JA-Phe méthoxymé deux fois (figures 7-8W et X).

Le 12CO-JA-Phe putatif est également totalement consommé lors du traitement (figures 7-8M et N). Mais contrairement aux JA-Phe, 12OH-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe, le traitement permet d'obtenir une molécule de 12CO-JA-Phe comportant 2 groupements méthyamine (figure 7-8Q et R). Cette double dérivation est très efficace car on ne détecte pas de molécule de 12CO-JA-Phe dérivée qu'une fois (figure 7-8O et P).

Ainsi, les molécules de JA-Phe, 12OH-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe ont, comme attendu, été dérivationnées une seule fois alors que le 12CO-JA-Phe putatif a été dérivationné deux fois. On peut donc raisonnablement conclure que ce troisième produit formé par CYP94C1 à partir de JA-Phe est un intermédiaire aldéhyde, le 12CO-JA-Phe. En conclusion, cette méthode de méthyamination a permis de mettre en évidence un nouveau jasmonate portant une fonction aldéhyde, le 12CO-JA-Phe, produit par CYP94C1 *in vitro*.

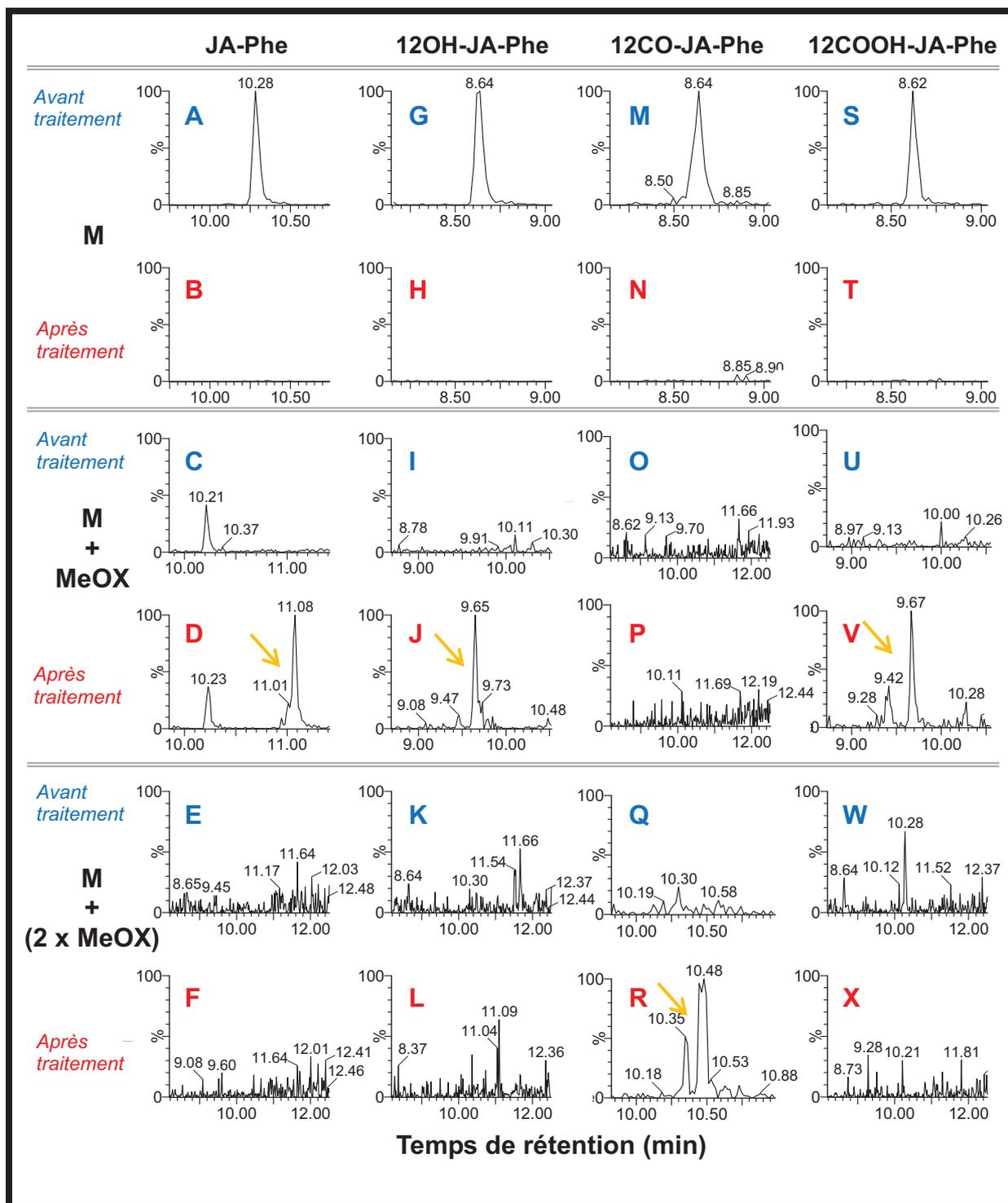


Figure 7-8 : Dérivatisation par la méthoxyamine de JA-Phe et des métabolites produits par CYP94C1. Les métabolites de JA-Phe produits dans les incubations en présence de NADPH de microsomes de levure exprimant CYP94C1 ont été analysés **avant traitement** et **après traitement** à la méthoxyamine hydrochloride. Les chromatogrammes d'ions sont extraits de SCAN en ESI(+). Les ions correspondant aux masses m/z « M » des composés non dérivatisés, aux masses m/z des composés dérivatisés une fois « M + MeOX » et aux masses m/z des composés dérivatisés deux fois « M + 2 x MeOX » sont présentés pour JA-Phe (A à F), 12OH-JA-Phe (G à L), 12CO-JA-Phe (M à R) et 12COOH-JA-Phe (S à X). Les flèches indiquent les pics obtenus après dérivatisation.

7.2.3 Mise au point de méthodes d'analyse en mode MRM pour 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe

Le mode SCAN a permis d'identifier les produits formés dans les milieux d'incubation, où les quantités de substrat (100 μ M) sont élevées. Le mode SCAN étant peu sensible et JA-Phe étant peu abondant dans la plante, nous avons ensuite développé des méthodes d'analyse en mode MRM pour pouvoir rechercher avec plus d'efficacité les 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe dans les extraits complexes de plante.

7.2.3.1 Sélection d'une énergie de collision et d'un ion fils

Des « daughter SCAN » avec différentes énergies de collision ont permis de mettre au point des transitions MRM pour les 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe. Les analyses en mode MRM sont basées sur la sélection d'un ion parent, qui est ensuite fragmenté pour produire des ions fils, puis un ion fils est sélectionné et détecté. La fragmentation d'une molécule dépend de l'énergie de collision appliquée. Par ailleurs, un ion parent va donner des ions fils de masse m/z spécifique après fragmentation. La double sélection, d'un ion parent, puis d'un ion fils permet d'augmenter la sensibilité de détection en diminuant le bruit de fond, mais également d'identifier une molécule d'intérêt car le couple ion parent/ion fils choisi est spécifique de la molécule d'intérêt.

Les ions parents des 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe ont déjà été choisis en mode ESI(+) dans les analyses précédentes. Afin de choisir l'ion fils optimal pour chacun de ces ions parents, nous avons effectué des daughter SCANS. Nous avons appliqué différentes énergies de collision à l'ion parent sélectionné, puis observé l'ensemble des ions fils produits après fragmentation de cet ion parent.

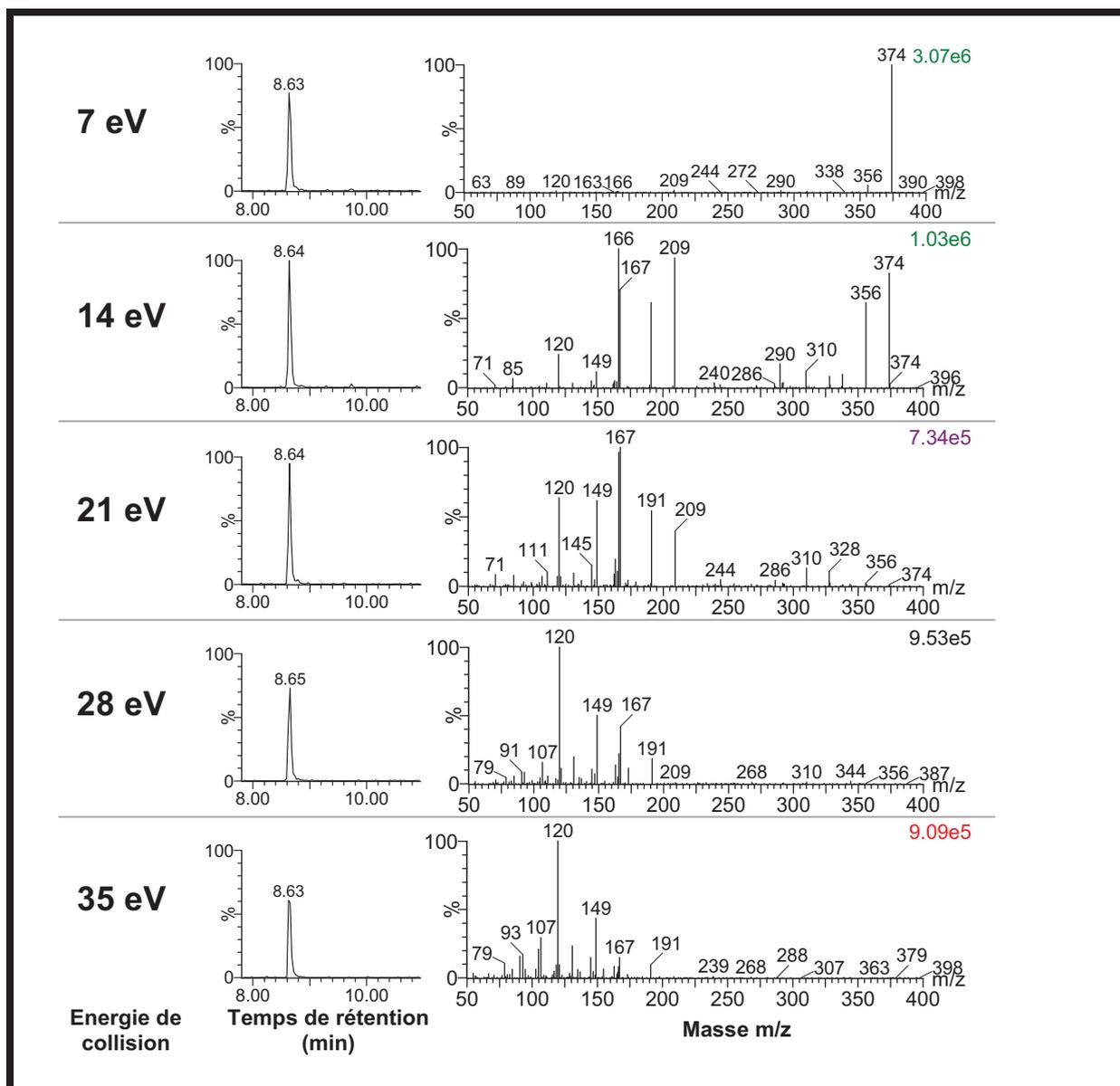


Figure 7-9 : Chromatogrammes et spectres de masse m/z des ions fils obtenus pour les daughters SCANS ESI(+) du 12OH-JA-Phe. Les daughters SCANS de l'ion parent de masse m/z 374 correspondant à l'ion $[M + H]^+$ de 12OH-JA-Phe ont été effectués, pour une tension de cône de 22 V et avec des énergies de collision de 7, 14, 21, 28 ou 35 eV.

La figure 7-9 montre que l'ion parent de 12OH-JA-Phe ($m/z = 374$) n'est quasiment pas fragmenté avec une énergie de collision de 7 eV. Des énergies de 14 et 21 eV permettent de fragmenter une partie des ions 374 et d'obtenir plusieurs ions fils (dont l'ion de masse m/z 356 qui correspond à $[M + H - H_2O]^+$). Une énergie de collision de 28 eV conduit à une fragmentation de la totalité des ions 374 et l'obtention d'un ion fils majoritaire ayant une m/z de 120. La transition MRM choisie pour le 12OH-JA-Ile est donc $374 > 120$ avec une énergie de collision de 28 eV.

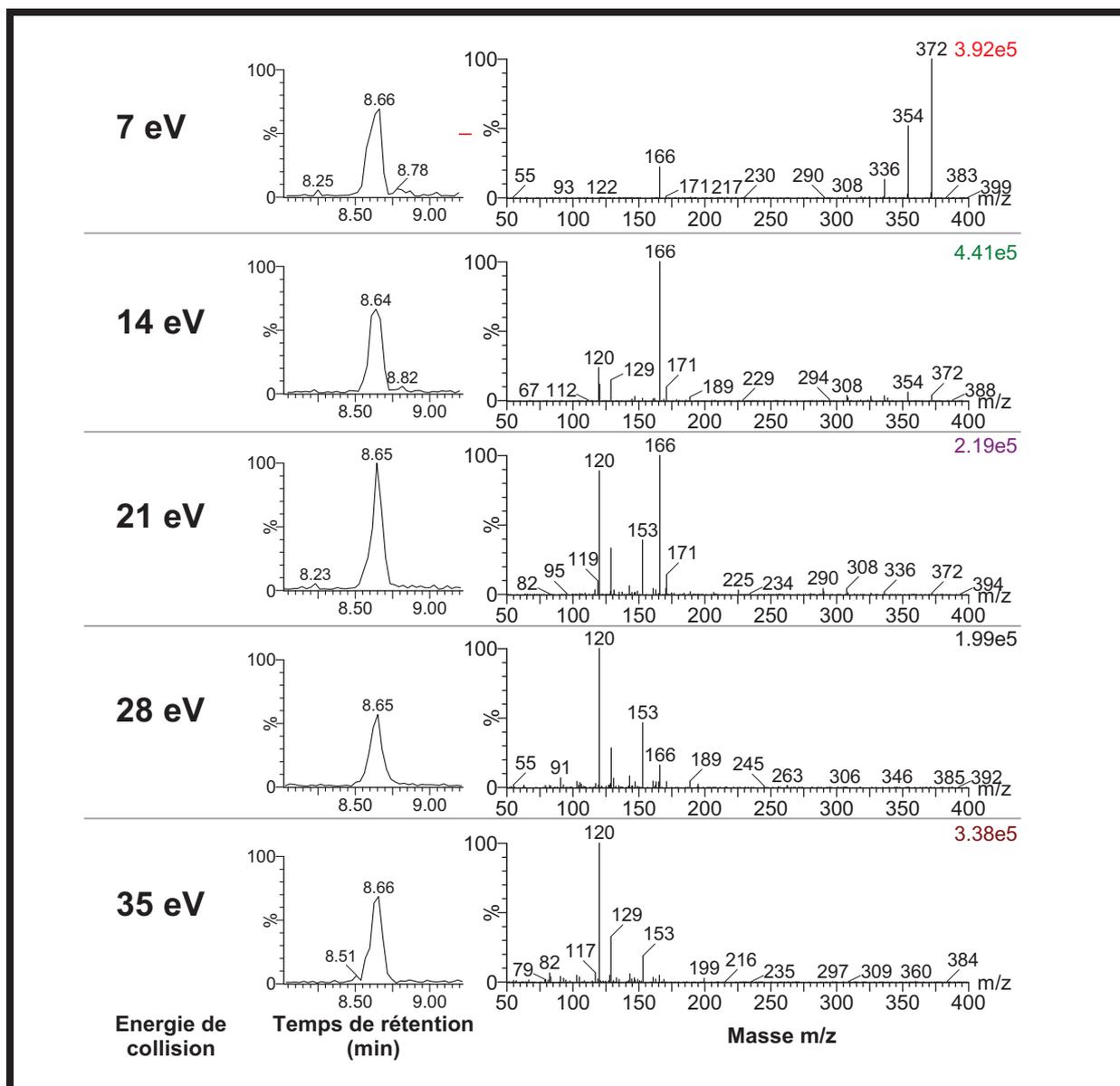


Figure 7-10 : Chromatogrammes et spectres de masse m/z des ions fils obtenus pour les daughters SCANS ESI(+) du 12CO-JA-Phe. Les daughters SCANS de l'ion parent de masse m/z 372 correspondant à l'ion $[M + H]^+$ de 12CO-JA-Phe ont été effectués, pour une tension de cône de 22 V et avec des énergies de collision de 7, 14, 21, 28 ou 35 eV.

La figure 7-10 indique que l'ion parent de 12CO-JA-Phe ($m/z = 372$) est peu fragmenté à une énergie de collision de 7 eV (l'ion de masse m/z 354 correspond à $[M + H - H_2O]^+$). Les énergies de 14 et 21 eV permettent de fragmenter la quasi-totalité de l'ion 372 puis à 28 et 35 eV la totalité de l'ion parent est fragmentée. Parmi les énergies de collision suffisantes pour fragmenter efficacement l'ion 372, celle de 14 eV a l'avantage de produire peu d'ions fils, dont un largement majoritaire, l'ion de masse m/z 166. Nous avons donc choisi pour l'analyse de 12CO-JA-Ile la transition MRM 372 > 166 avec une énergie de collision de 14 eV.

L'ion fils de masse m/z 166 pourrait être produit par une double fragmentation de 12CO-JA-Phe, comme présenté dans la figure 7-11.

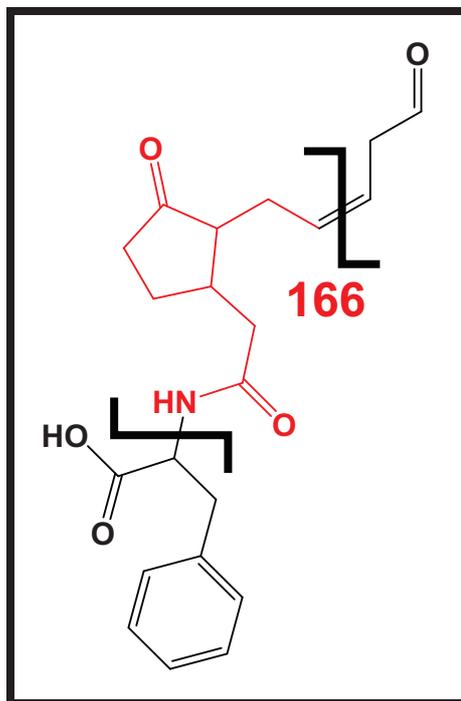


Figure 7-11 : Fragmentation possible de 12CO-JA-Phe pour donner l'ion fils de masse m/z 166.

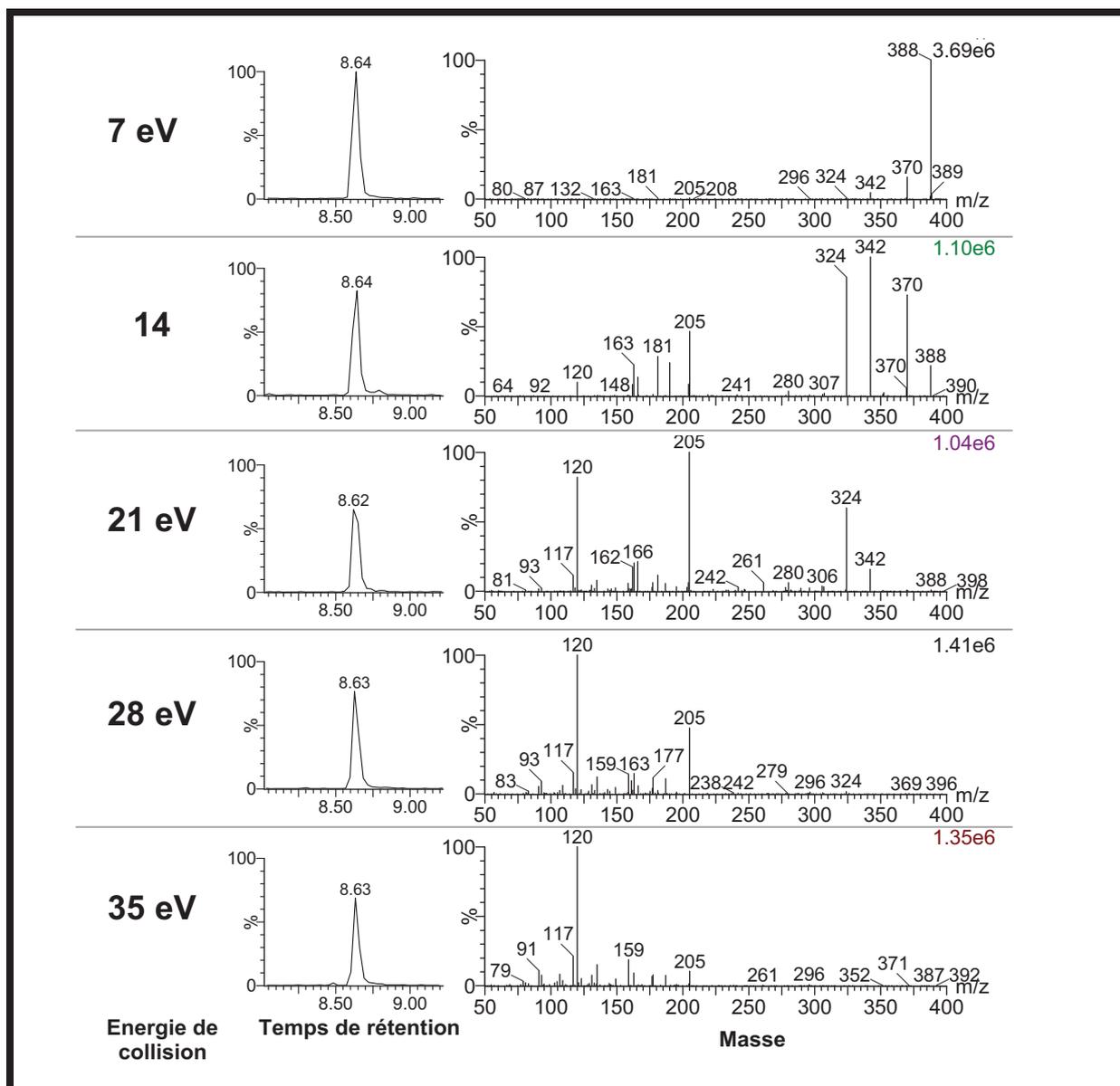


Figure 7-12 : Chromatogrammes et spectres de masse m/z des ions fils obtenus pour les daughters SCANS ESI(+) du 12COOH-JA-Phe. Les daughters SCANS de l'ion parent de masse m/z 388 correspondant à l'ion $[M + H]^+$ de 12COOH-JA-Phe ont été effectués, pour une tension de cône de 22 V et avec des énergies de collision de 7, 14, 21, 28 ou 35 eV.

La figure 7-12 montre qu'une énergie de collision de 7 eV n'est pas suffisante pour fragmenter efficacement l'ion parent 388 de 12COOH-JA-Phe. Les énergies de collision de 14, 21, 28 et 35 eV produisent toutes des ions fils. Cependant l'énergie de 35 eV produit un ion très largement majoritaire ($m/z = 120$) et abondant, c'est pourquoi cette énergie de collision a été choisie avec la transition MRM 388 > 120 pour la détection de 12COOH-JA-Phe.

7.2.3.2 Analyse en mode MRM des 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe dans les milieux d'incubation

Les transitions MRM précédemment établies nous ont ensuite permis d'analyser les milieux d'incubation de microsomes de levure exprimant CYP94C1 en mode MRM. Les profils MS/MS du substrat résiduel JA-Phe et de ses 3 formes oxydées, 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe sont présentés en figure 7-13.

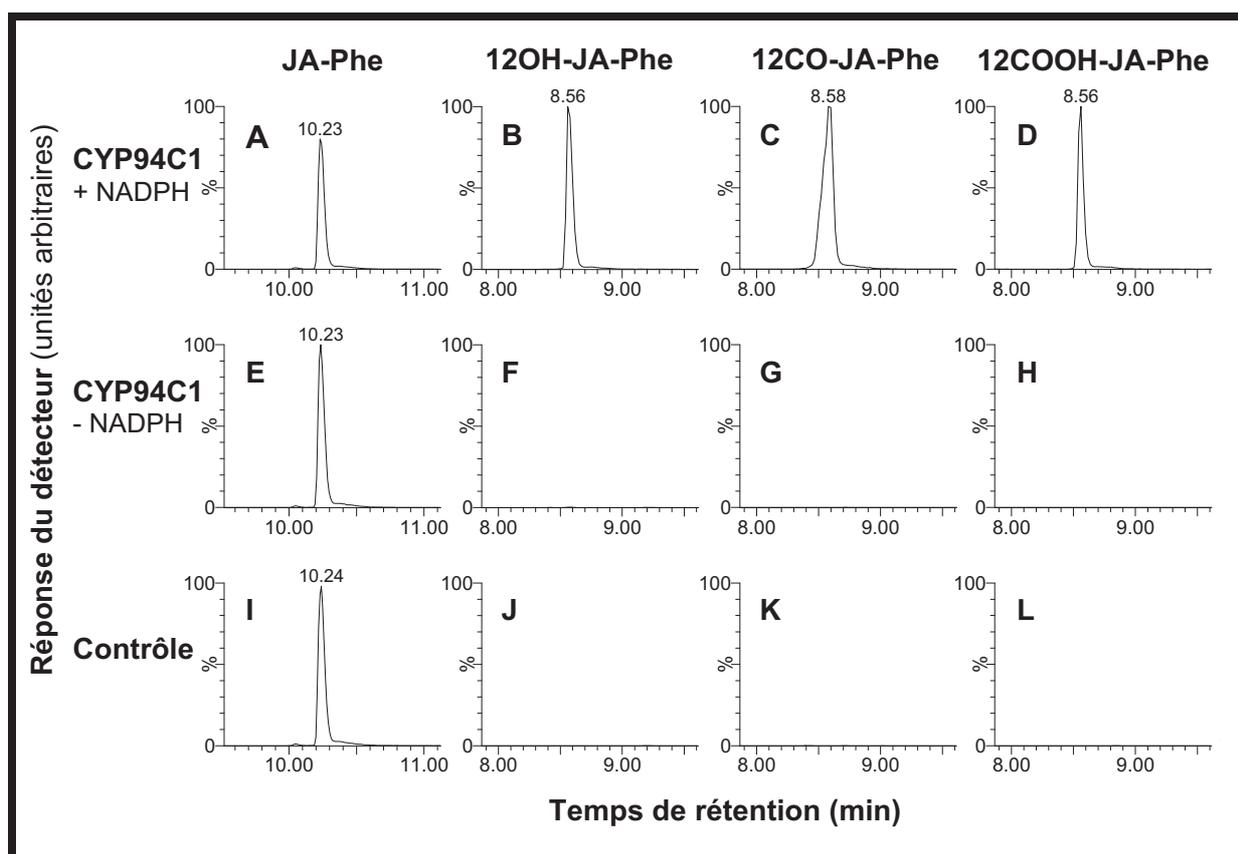


Figure 7-13 : Profils UPLC-MS/MS des métabolites des milieux réactionnels contenant JA-Phe et les microsomes de levure exprimant CYP94C1. Les chromatogrammes A à H sont issus d'analyse de milieux d'incubation de microsomes de levure exprimant CYP94C1 avec JA-Phe en présence (A à D) ou en absence de NADPH (E à H). Les chromatogrammes I à L ont été obtenus par analyse de milieux d'incubation contrôle de microsomes de levure transformée avec un vecteur vide, avec JA-Phe et en présence de NADPH. Les profils du substrat résiduel JA-Phe et des produits d'incubation 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe ont été obtenus en mode ES+ avec les transitions MRM suivantes : JA-Phe 358.15 > 119.9, 12OH-JA-Phe 374 > 120, 12CO-JA-Phe 372 > 166, 12COOH-JA-Phe 388 > 120.

Les 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe sont facilement détectés dans les incubations de microsomes exprimant CYP94C1 en présence de NADPH (figure 7-13B à D) mais pas en absence de NADPH, le cofacteur nécessaire à l'activité des cytochromes P450 (figure 7-13F à H). En outre, les composés oxydés ne sont pas non plus détectés dans des

incubations contrôle de microsomes de levure transformée avec un plasmide vide en présence de NADPH (figure 7-13J à L). Ceci démontre donc que CYP94C1 catalyse la production de 12OH-JA-Phe, de 12CO-JA-Phe et de 12COOH-JA-Phe *in vitro*.

En conclusion, nous avons mis en évidence la capacité de CYP94C1 à métaboliser JA-Phe en catalysant 3 réactions d'oxydation successives *in vitro*, conduisant à la formation d'une forme hydroxylée, le 12OH-JA-Phe, puis de l'intermédiaire catalytique aldéhyde 12CO-JA-Phe avant production de la forme carboxylée 12COOH-JA-Phe (figure 7-14).

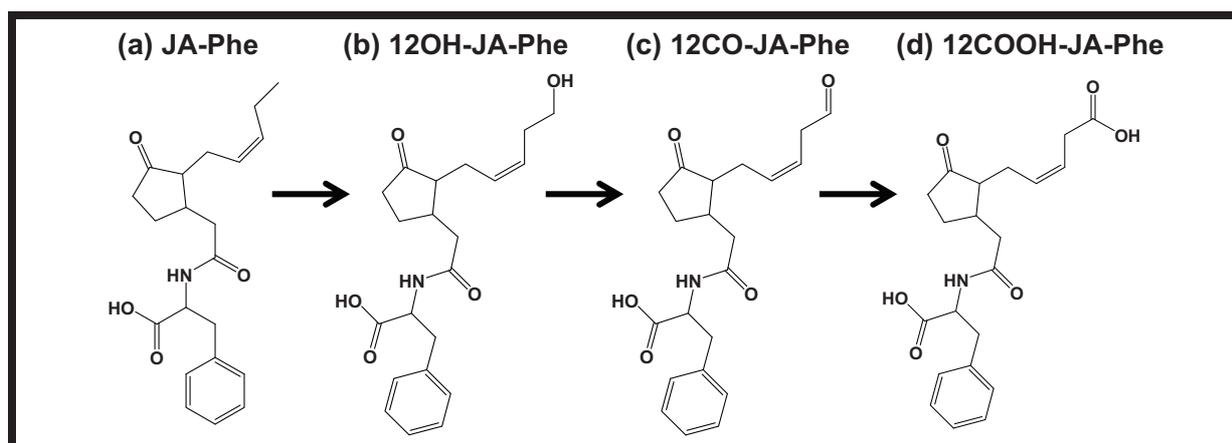


Figure 7-14 : Métabolisme de JA-Phe par CYP94C1 *in vitro* : CYP94C1 catalyse la carboxylation de JA-Phe via un intermédiaire aldéhyde. JA-Phe (a) et ses 3 formes oxydées produites par CYP94C1 : 12OH-JA-Phe (b), 12CO-JA-Phe (c) et 12COOH-JA-Phe (d).

7.3 Recherche d'un intermédiaire aldéhyde lors de la carboxylation de JA-Ile par CYP94C1 *in vitro*

L'identification d'un intermédiaire catalytique aldéhyde lors de la carboxylation de JA-Phe par CYP94C1 a conduit à l'hypothèse qu'un intermédiaire aldéhyde pourrait également être produit pour la carboxylation de JA-Ile par CYP94C1. Pour étudier cette hypothèse, la même stratégie que celle utilisée pour l'identification de 12CO-JA-Phe a été employée. Des microsomes exprimant CYP94C1 ont été incubés en présence de JA-Ile puis les produits ont été recherchés par UPLC-MS. Outre les ions correspondant aux 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile produits, des ions NADPH-dépendants supplémentaires de masses m/z 338 en ESI(+) et 336 en ESI(-) correspondant aux m/z $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ prédits de 12CO-JA-Ile sont détectés. Pour déterminer si ce 3^{ème} produit est effectivement une forme aldéhyde de JA-Ile, nous avons ensuite employé la méthode de dérivatisation par méthyloxyamination. Cette méthode a permis de confirmer la production de 12CO-JA-Ile (Figure 7-15D). Ces résultats et

méthodologies sont décrits dans une publication qui vient d'être soumise au journal *Metabolomics* (voir la publication pages 233-254). Une méthode MRM a ensuite été mise au point pour détecter le 12CO-JA-Ile non dérivatisé avec une grande sensibilité. Les profils MRM du 12CO-JA-Ile obtenus après analyse des milieux d'incubation de microsomes montrent la production de 12CO-JA-Ile par CYP94C1 à partir de JA-Ile en présence de NADPH (figure 7-15A, B, C).

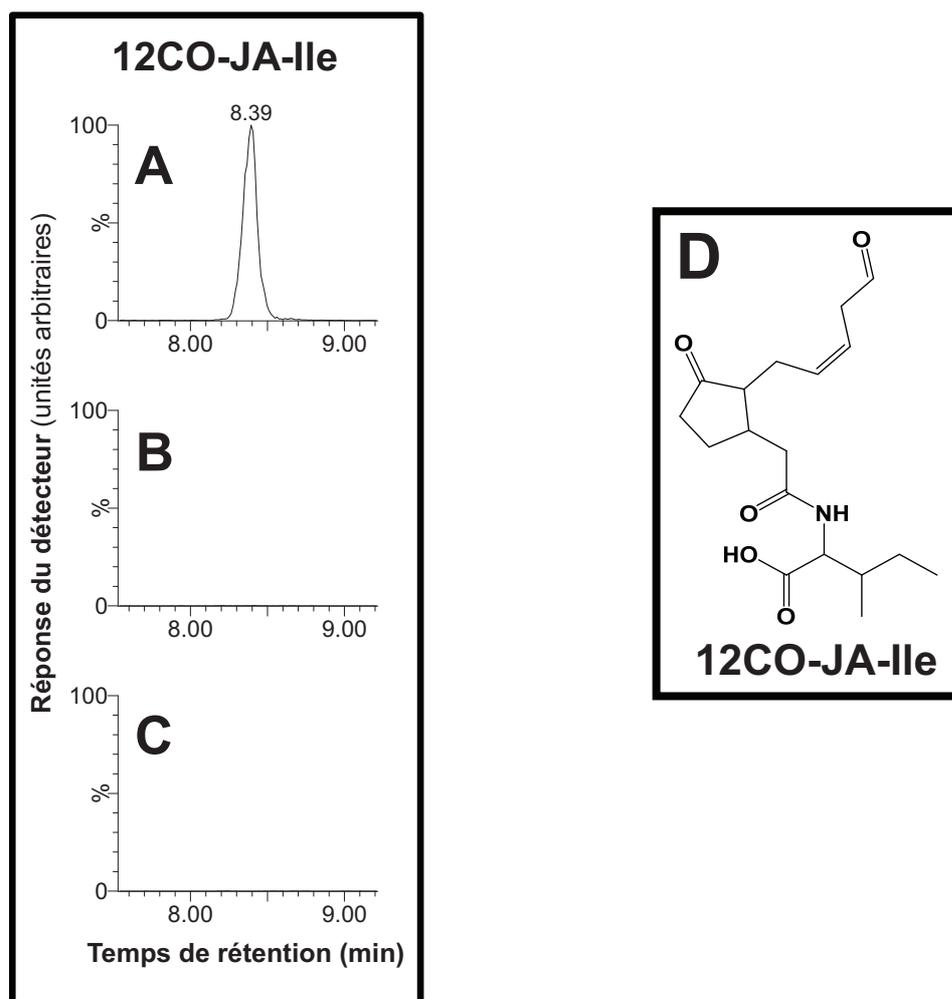


Figure 7-15 : Profils UPLC-MS/MS des métabolites des milieux réactionnels contenant des microsomes de levure exprimant CYP94C1 et JA-Ile. Les profils UPLC-MS/MS (A à C) du produit 12CO-JA-Ile (D), obtenus lors de l'incubation de microsomes exprimant CYP94C1 avec JA-Ile en présence (A) ou en absence (B) de NADPH. Des microsomes de levures transformées avec un plasmide vide et incubés en présence de NADPH servent de contrôle (C). Le 12CO-JA-Ile a été recherché avec la transition MRM 338.2 > 132.1 (ES+).

En conclusion, CYP94C1 forme également un intermédiaire catalytique aldéhyde lors de la carboxylation de JA-Ile *in vitro*. Tout comme pour JA-Phe, CYP94C1 catalyse *in vitro* la carboxylation de JA-Ile en 3 étapes. Les capacités catalytiques de CYP94C1 sont donc

similaires pour le métabolisme de JA-Ile et de JA-Phe, dans les deux cas il produit 3 dérivés qui diffèrent par leur degré d'oxydation.

7.4 Etude du métabolisme de JA-Phe et de JA-Ile par CYP94B1 et CYP94B3

CYP94B1 et CYP94B3 sont co-régulés avec CYP94C1, et CYP94B3 fonctionne également comme JA-Ile oxydase lors de la blessure foliaire (Heitz et al., 2012). Nous avons donc comparé les capacités enzymatiques de CYP94B1 et CYP94B3 en présence de JA-Phe (Figure 7-16A) ou de JA-Ile (Figure 7-16B).

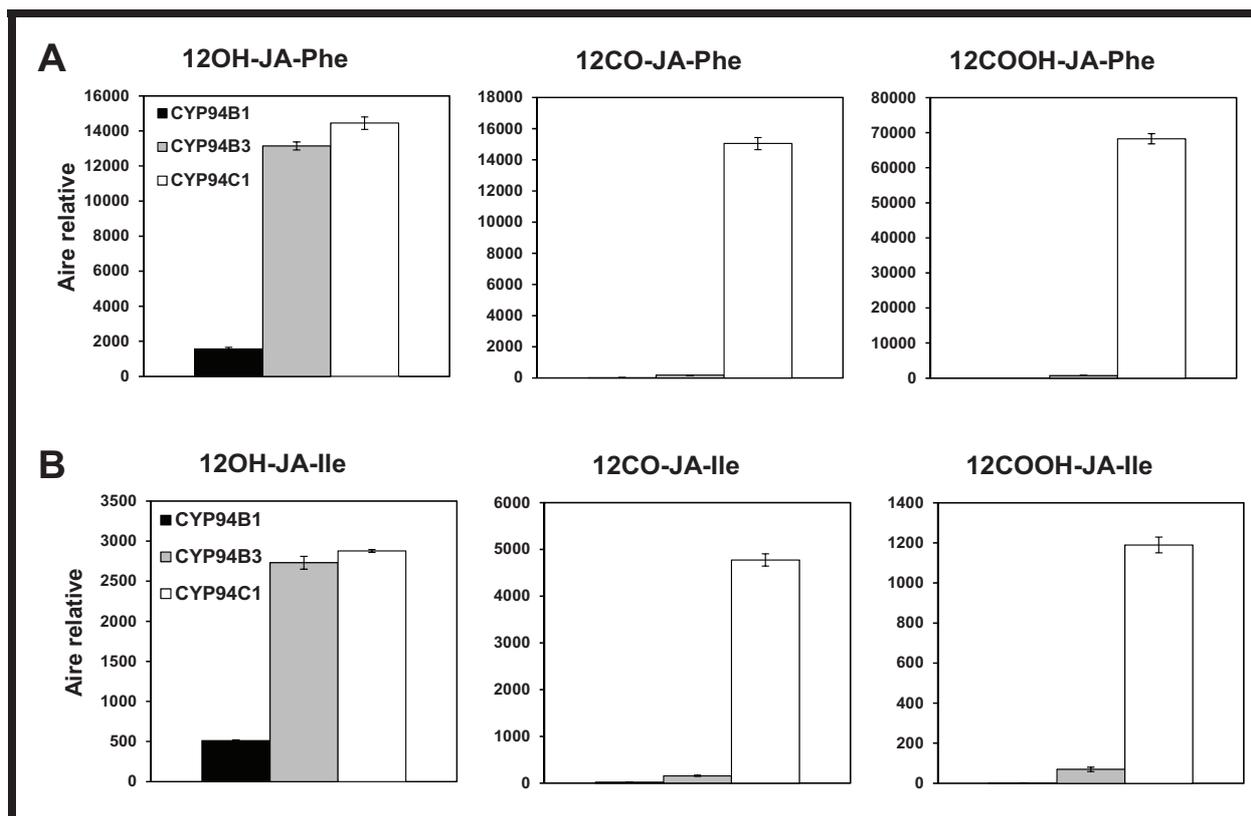


Figure 7-16 : Histogrammes présentant les capacités relatives de CYP94B1, CYP94B3 et CYP94C1 à accumuler chacun des produits oxydés de JA-Phe (A) ou de JA-Ile (B) dans les incubations de microsomes en présence de NADPH. L'aire du pic du produit obtenu (UPLC-MS/MS) a été corrigée par les quantités de protéines totales contenues dans les différents lots de microsomes. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm SD) de 3 incubations.

Les incubations de microsomes exprimant CYP94B1 ont permis d'établir les capacités de ce P450 à catalyser la production de 12OH-JA-Phe et de 12CO-JA-Phe, ce dernier étant détecté légèrement au-dessus du bruit de fond (figure 7-16A). Cependant, le 12COOH-JA-Phe n'a pas pu être détecté dans ces incubations. Les incubations de microsomes exprimant CYP94B3 montrent que celui-ci produit les 3 formes oxydées de JA-Phe mais dans des proportions différentes de CYP94C1 (figure 7-16A). En effet, CYP94C1 est plus efficace que CYP94B3 pour catalyser la formation d'aldéhyde de JA-Phe. Les enzymes CYP94B3 et

CYP94C1 sont plus efficaces que CYP94B1 pour hydroxyler JA-Phe *in vitro* dans nos conditions d'incubation.

CYP94B1 et CYP94B3 hydroxylent JA-Ile (figures 7-16B). Nous avons examiné si ces enzymes catalysent également la formation de 12CO-JA-Ile. CYP94B1 et CYP94B3 ont la capacité de produire du 12CO-JA-Ile, mais avec une efficacité beaucoup plus faible que CYP94C1 (Figure 7-16B). De la même manière que pour JA-Phe, CYP94B3 et CYP94C1 sont très efficaces pour catalyser l'hydroxylation, mais CYP94C1 est beaucoup plus efficace que CYP94B3 pour catalyser la formation de l'intermédiaire aldéhyde *in vitro*. Finalement, le fait que CYP94B3 soit moins efficace que CYP94C1 pour catalyser la production de 12COOH-JA-Ile pourrait être essentiellement dû à une capacité réduite de CYP94B3 pour former l'intermédiaire aldéhyde *in vitro*.

En conclusion, les tests enzymatiques de CYP94s *in vitro*, la méthode de dérivation par méthyamination et les analyses UPLC-MS/MS ont conduit à l'identification de 4 nouveaux jasmonates oxydés, produits *in vitro* par des CYP94s à partir de JA-Phe et de JA-Ile : 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Ile. Les capacités catalytiques de CYP94B1, caractérisé ici pour la première fois, sont similaires qualitativement à celles de CYP94B3, en se limitant principalement au produit hydroxylé. CYP94C1 se distingue en poursuivant l'oxydation des deux conjugués jusqu'aux stades aldéhyde puis acide.

7.5 Recherche des nouveaux jasmonates oxydés dérivés de JA-Phe et JA-Ile dans les feuilles blessées de Col0

Les approches *in vitro* ont conduit à l'identification de nouveaux jasmonates oxydés. Pour déterminer si les 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Ile peuvent être synthétisés *in vivo*, nous avons recherché ces composés dans des échantillons de feuilles blessées de plantes de type sauvage Col0. La recherche de ces molécules par UPLC-MS/MS dans les extraits de plante a pu être effectuée grâce aux transitions MRM mises au point précédemment, lors de l'identification de ces nouveaux composés dans les milieux d'incubations enzymatiques.

La figure 7-17 présente l'évolution des abondances des composés oxydés de JA-Phe et de JA-Ile dans une cinétique de blessure. Ne disposant pas de références de synthèse pour les

nouveaux composés oxydés, l'abondance relative est représentée par l'aire des pics respectifs. Les 12OH-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Ile sont détectés dans les extraits de feuille blessée (Figure 7-17C, G et F respectivement). Le niveau de ces composés augmente au cours du temps après blessure et leur cinétique d'accumulation est cohérente avec celle des conjugués non oxydés. En effet, 12OH-JA-Phe (Figure 7-17C) et 12COOH-JA-Phe (Figure 7-17G) s'accumulent plus tardivement que JA-Phe (Figure 7-17A), confortant l'idée que ces composés dérivent de JA-Phe après blessure et que les niveaux de JA-Phe peuvent être contrôlés par oxydation. Concernant 12CO-JA-Ile (Figure 7-17F), son accumulation est plus tardive que celle de JA-Ile (Figure 7-17B) et de 12OH-JA-Ile (Figure 7-17D), mais concomitante à celle de 12COOH-JA-Ile (Figure 7-17H). Ces cinétiques corroborent l'idée que 12CO-JA-Ile est un intermédiaire catalytique entre 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile.

Bien que l'intermédiaire aldéhyde de JA-Ile soit accumulé dans les feuilles blessées, nous n'avons pas pu détecter de 12CO-JA-Phe dans ces mêmes feuilles blessées (Figure 7-17E). Les niveaux maximum de JA-Phe étant plus de 100 fois plus faibles que ceux de JA-Ile, il est possible que cet intermédiaire soit également accumulé mais indétectable dans nos conditions d'analyse.

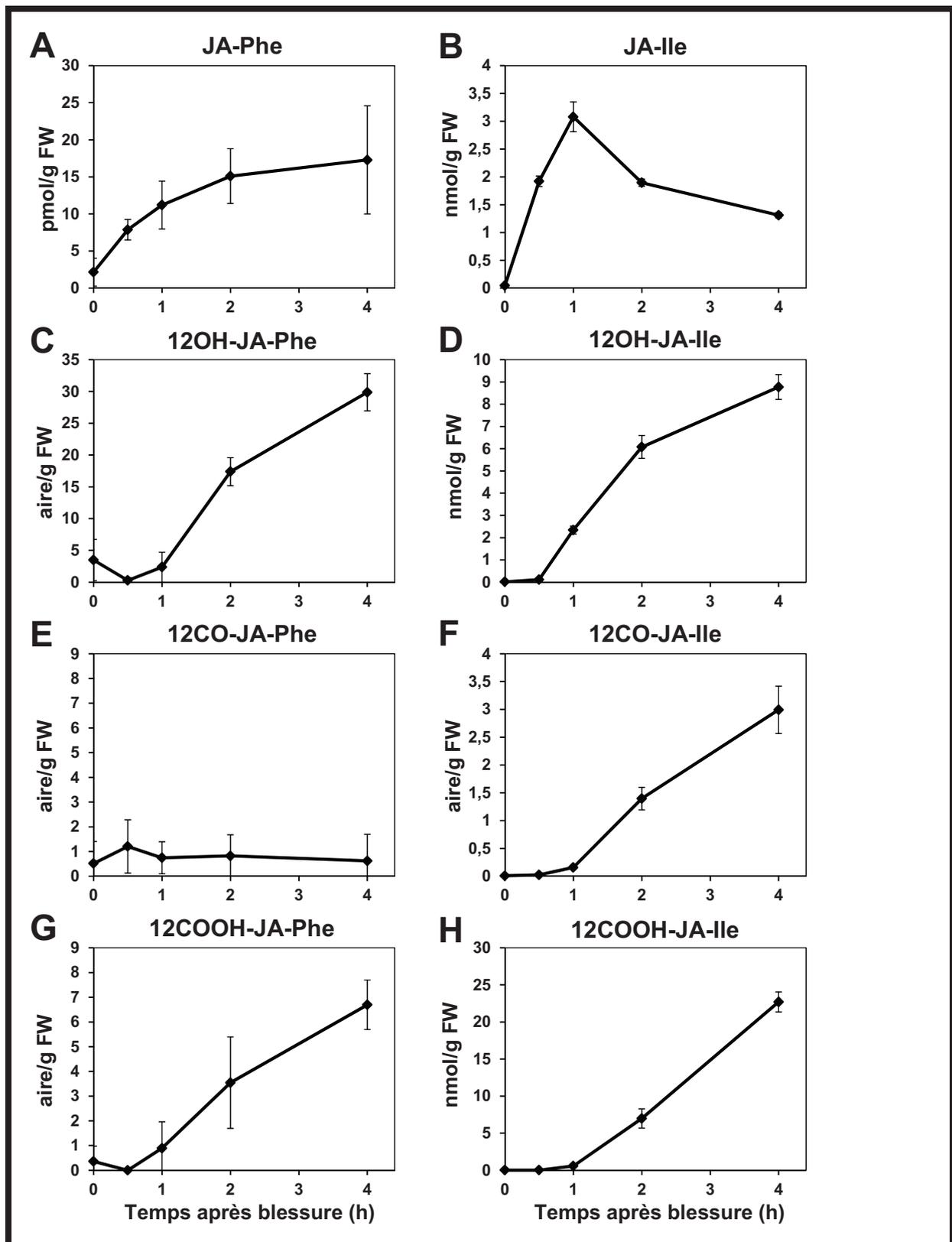


Figure 7-17 : Recherche des 3 dérivés oxydés de JA-Ile et de JA-Phe par UPLC-MS/MS dans des feuilles blessées de plantes sauvages Col0. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm SD) de réplicats biologiques.

7.6 Analyse des niveaux de 12OH-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Ile chez les mutants d'expression des gènes *CYP94s*.

Afin de déterminer le rôle potentiel des différents membres de la famille CYP94 dans l'accumulation de 12OH-JA-Phe, de 12COOH-JA-Phe et de 12CO-JA-Ile après blessure, nous avons analysé les jasmonates de feuilles blessées de mutants knock-out ou sur-exprimant *CYP94B3* ou *CYP94C1*. Les profils des formes oxydées de JA-Phe et de JA-Ile sont présentés en figures 7-18 et 7-19 respectivement.

Comme le montre la figure 7-18A, les niveaux de 12OH-JA-Phe chez *cyp94b3* sont très diminués, indiquant que CYP94B3 joue un rôle majeur dans l'accumulation de ce composé après blessure.

Chez *cyp94c1*, les niveaux mesurés de 12OH-JA-Phe ne sont pas modifiés. Par contre, les quantités de 12COOH-JA-Phe sont fortement réduites par rapport à celles de Col0, indiquant un rôle majeur de CYP94C1 dans l'accumulation de 12COOH-JA-Phe (figure 7-18B).

Chez le mutant *cyp94b3*, l'accumulation de 12COOH-JA-Phe plus forte que chez Col0 au temps 4h est surprenante, mais cette observation a également été faite sur un second lot de plante indépendant. On peut imaginer que CYP94B3 étant absent chez ce mutant, CYP94C1 ne compéterait plus avec CYP94B3 pour métaboliser JA-Phe, ce qui permettrait à CYP94C1 de convertir davantage de JA-Phe en 12COOH-JA-Phe.

Les niveaux de 12OH-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe sont fortement diminués chez le double mutant *cyp94b3c1*, indiquant que CYP94B3 et CYP94C1 sont deux enzymes essentielles pour l'accumulation de ces composés après blessure.

Les plantes surexprimant *CYP94B3* ou *CYP94C1* contiennent des niveaux de 12OH-JA-Phe plus faibles que Col0 (Figure 7-18A). L'accumulation de 12COOH-JA-Phe étant plus forte chez ces mutants (Figure 7-18B), la diminution des niveaux de 12OH-JA-Phe est probablement due à sa conversion accrue en 12COOH-JA-Phe.

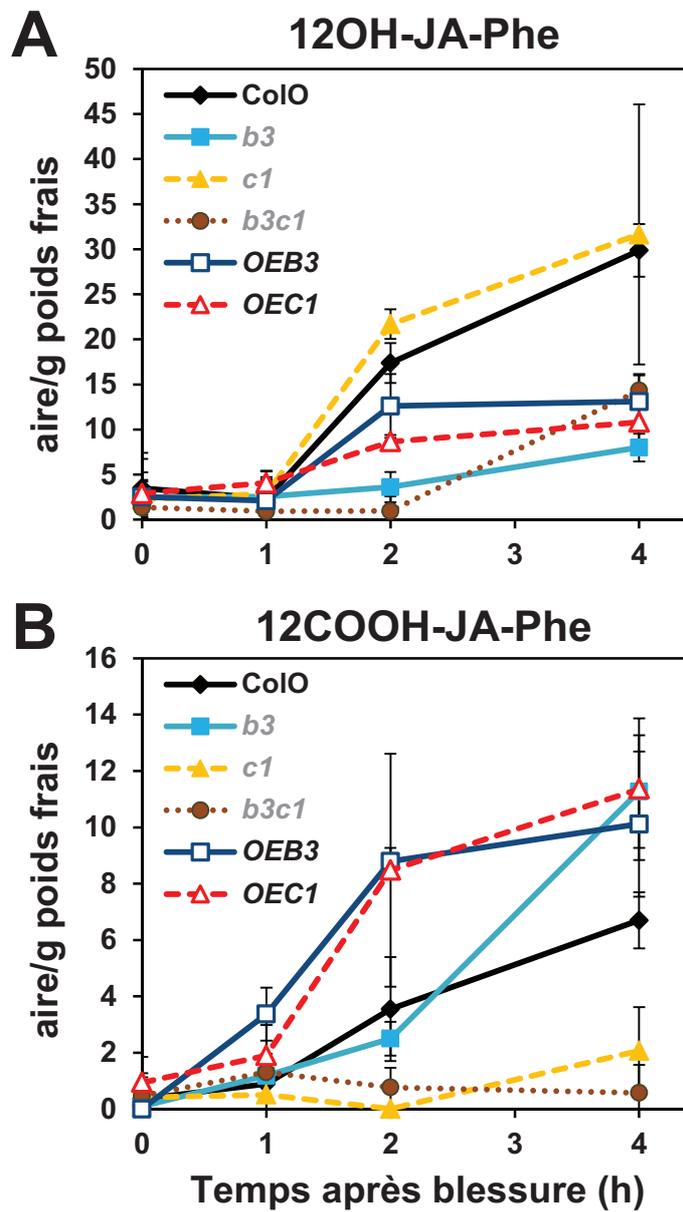


Figure 7-18 : Profils de 12OH-JA-Phe (A) et de 12COOH-JA-Phe (B) dans les feuilles blessées de mutants knock-out ou sur-exprimant *CYP94B3* ou *CYP94C1*, obtenus après analyse UPLC-MS/MS. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm SD) de réplicats biologiques.

L'impact des mutations sur les niveaux de 12CO-JA-Ile a également été examiné, en relation avec l'accumulation des 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile (Figure 7-19). Comme le montre la figure 7-19B, l'accumulation de 12CO-JA-Ile est très réduite chez *cyp94b3* et *cyp94b3c1*, alors que ses niveaux sont peu affectés chez *cyp94c1*. CYP94B3 semble donc responsable de l'accumulation de 12CO-JA-Ile après blessure. Ce résultat est assez inattendu au vu des résultats *in vitro*. Les niveaux de 12CO-JA-Ile si faibles chez *cyp94b3* pourraient également être dus aux faibles niveaux du précurseur 12OH-JA-Ile (figure 7-19A).

Chez les plantes sur-exprimant *CYP94B3* ou *CYP94C1*, on note une diminution des niveaux de 12OH-JA-Ile (figure 7-19A) et au contraire une augmentation des niveaux de 12COOH-JA-Ile (aux temps 1 h et 2 h) (figure 7-19C). Il est intéressant d'observer que chez ces mutants, les niveaux de 12CO-JA-Ile (figure 7-19B) sont similaires à ceux de Col0 (aux temps 1 h et 2 h). Ces différents profils illustrent bien que CYP94B3 et CYP94C1 ont la capacité de former *in vivo* du 12COOH-JA-Ile à partir de 12OH-JA-Ile, en passant par l'intermédiaire aldéhyde 12CO-JA-Ile.

Les quantités de 12COOH-JA-Ile (figure 7-19C) sont réduites d'environ de moitié chez les simples mutants *cyp94b3* et *cyp94c1* et très faibles chez le double mutant *cyp94b3c1*, confirmant des données précédentes (Heitz et al., 2012). Comme nous l'avons déjà décrit, cela indique que les deux enzymes sont responsables de la carboxylation de JA-Ile. Cependant, l'accumulation de 50% de 12COOH-JA-Ile observée chez *cyp94b3* peut paraître étonnante si l'on considère les très faibles niveaux de 12CO-JA-Ile. Il est possible que *in vivo*, CYP94C1 métabolise directement JA-Ile en 12COOH-JA-Ile majoritairement sans libérer les produits intermédiaires 12OH-JA-Ile et 12CO-JA-Ile. Les niveaux résiduels de 12COOH-JA-Ile chez le mutant *cyp94b3* résulteraient donc de la conversion directe de JA-Ile en 12COOH-JA-Ile par CYP94C1. De plus, CYP94C1 pourrait également convertir le 12OH-JA-Ile accumulé en 12COOH-JA-Ile, sans libérer l'intermédiaire 12CO-JA-Ile. Une hypothèse supplémentaire est que CYP94B1 pourrait catalyser la formation de 12OH-JA-Ile accumulé chez le mutant *cyp94b3*, pris en charge ensuite par CYP94C1 pour accumuler le 12COOH-JA-Ile.

L'ensemble de ces analyses montre que CYP94B3 et CYP94C1 jouent un rôle majeur dans l'accumulation de 12OH-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Ile au cours du temps après blessure foliaire.

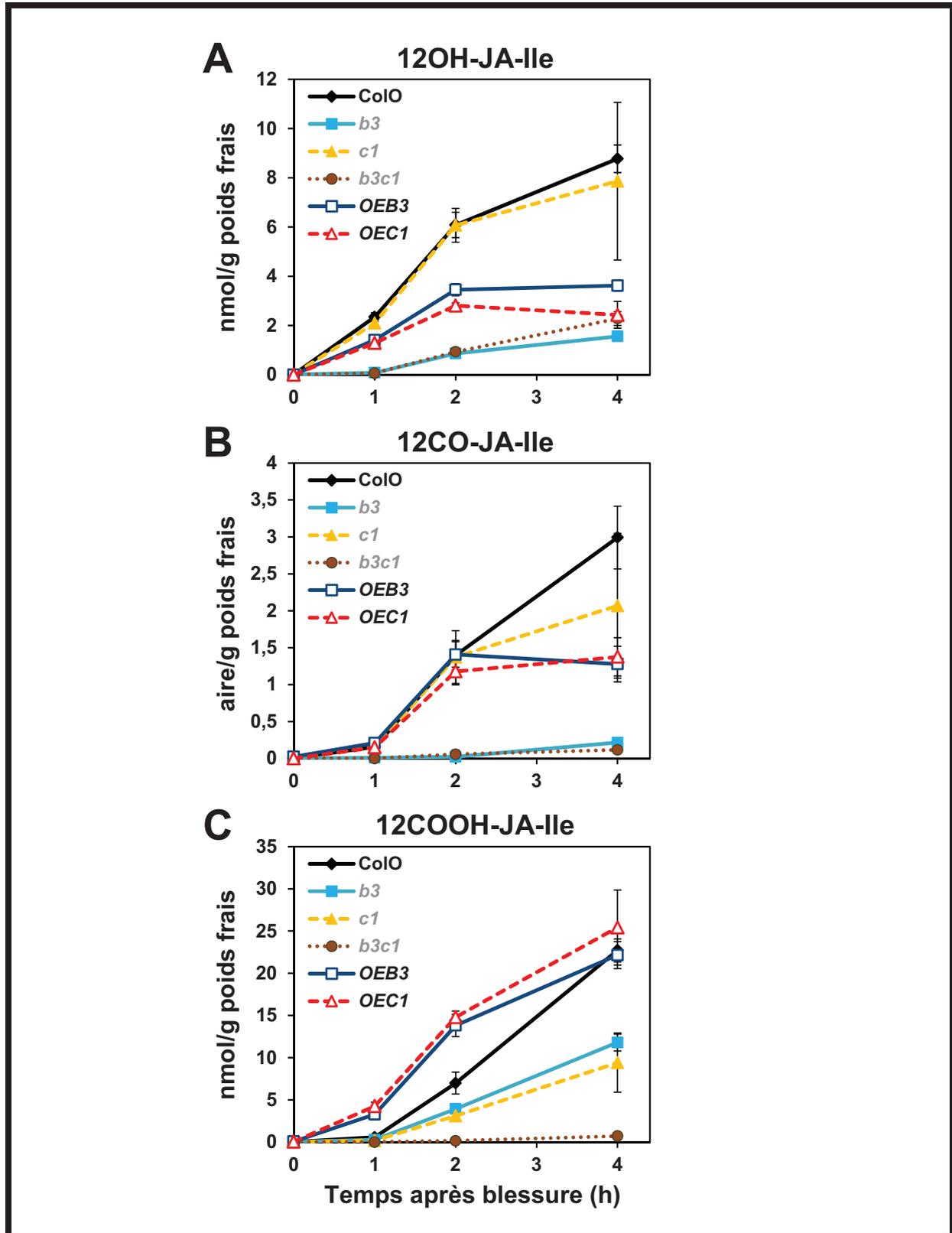


Figure 7-19 : Profils de 12OH-JA-Ile (A), de 12CO-JA-Ile (B) et de 12COOH-JA-Ile (C) dans les feuilles blessées de mutants knock-out ou sur-exprimant *CYP94B3* ou *CYP94C1*, obtenus après analyse UPLC-MS/MS. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm SD) de réplicats biologiques.

Les génotypes *cyp94b1* et *cyp94b1b3c1* ont également été analysés. Pour des raisons de lisibilité, les profils jasmonates du simple mutant *cyp94b1* et du triple mutant *cyp94b1b3c1* ont été représentés sur des graphiques distincts dans la figure 7-20, incluant à nouveau Col0 et le double mutant *cyp94b3c1* pour pouvoir comparer plus aisément les niveaux de métabolites entre ces génotypes.

L'analyse des jasmonates des mutants *cyp94b1* a montré que la mutation de *CYP94B1* seule n'affecte pas les niveaux de 12CO-JA-Ile, 12OH-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe (hormis au temps 4 h) (Figure 7-20B, D et E). En effet, le mutant *cyp94b1* présente des profils similaires à ceux de Col0. Par contre, le triple mutant *cyp94b1b3c1* présente des niveaux de 12CO-JA-Ile encore plus faibles que le double mutant *cyp94b3c1* (Figure 7-20B). En conséquence, de façon similaire aux observations chez *cyp94b3c1*, les niveaux des formes carboxylées sont très amoindris chez le triple mutant (Figure 7-20C et E). Toutefois, les niveaux de 12OH-JA-Ile étant également plus réduits chez le triple mutant (Figure 7-20A), il est difficile de déterminer si *CYP94B1* catalyse *in vivo* uniquement l'hydroxylation de JA-Ile ou s'il participe aussi à la formation d'aldéhyde. En effet, comme nous l'avons vu plus tôt, l'activité *in vitro* est à la limite du seuil de détection. Par ailleurs, les niveaux de 12OH-JA-Phe déjà très diminués chez *cyp94b3c1* le sont encore plus 4 h après blessure chez *cyp94b1b3c1* (Figure 7-20D). *CYP94B1* semble donc jouer un rôle mineur mais décelable dans la synthèse de 12OH-JA-Ile et 12OH-JA-Phe, alors que *CYP94B3* et *CYP94C1* assurent l'essentiel de l'accumulation des formes oxydées de JA-Ile et JA-Phe.

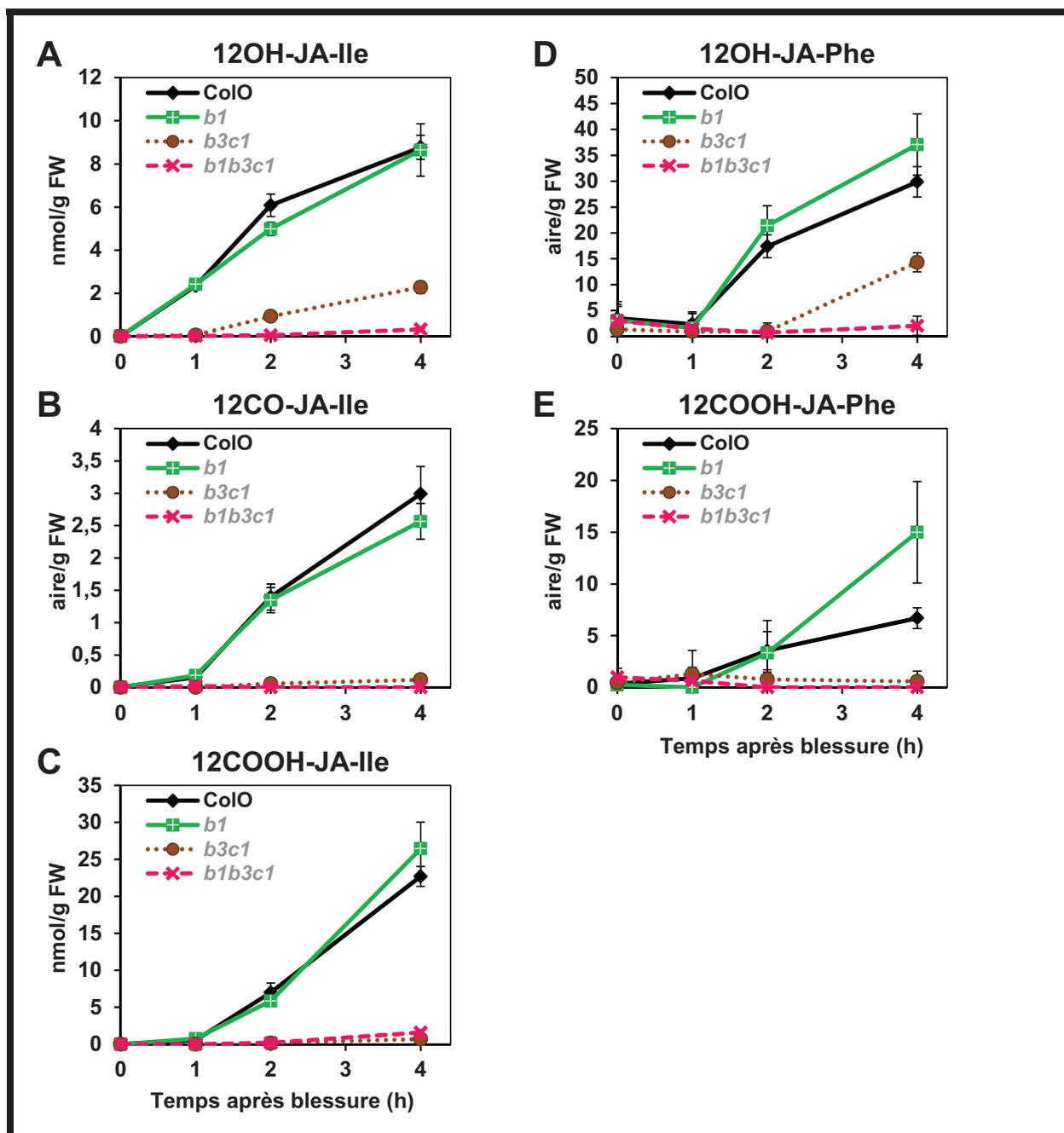


Figure 7-20 : Profils des formes oxydées de JA-Ile (A à C) et de JA-Phe (D et E) dans les feuilles blessées du simple mutant *cyp94b1* et du triple mutant *cyp94b1b3c1*, obtenus après analyse UPLC-MS/MS. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm SD) de réplicats biologiques.

7.7 Recherche de JA-Phe dans les fleurs ou des feuilles de Col0 infectées par *Botrytis cinerea*

Afin de déterminer si le conjugué JA-Phe est également accumulé dans d'autres conditions de stress que la blessure, nous avons recherché ce composé dans des feuilles de Col0 infectées par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. La figure 7-21 montre que JA-Phe est accumulé lors de l'infection, suggérant que JA-Phe pourrait déclencher des réponses de défense dans cette situation.

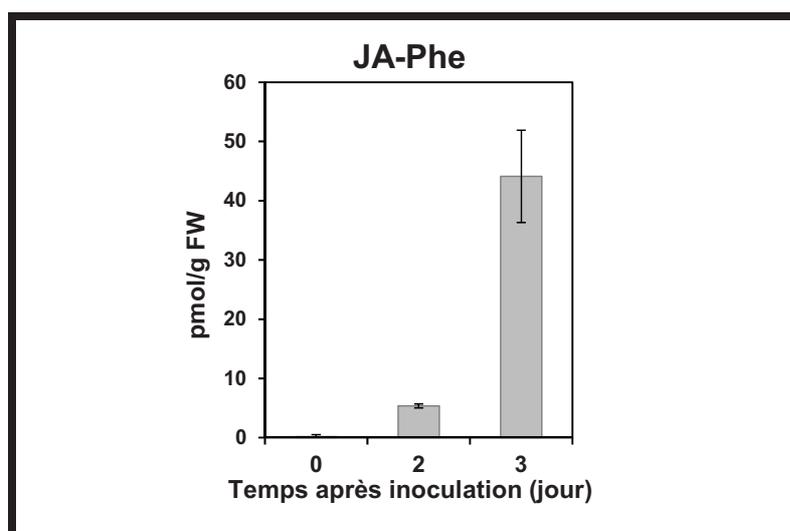


Figure 7-21 : Niveaux de JA-Phe dans les feuilles de Col0 au cours de l'infection par *Botrytis cinerea*.

La biosynthèse des jasmonates et la signalisation COI1-dépendante étant importantes pour le développement floral (Mandaokar et al., 2006), nous avons également recherché JA-Phe et ses formes oxydées dans les fleurs de Col0.

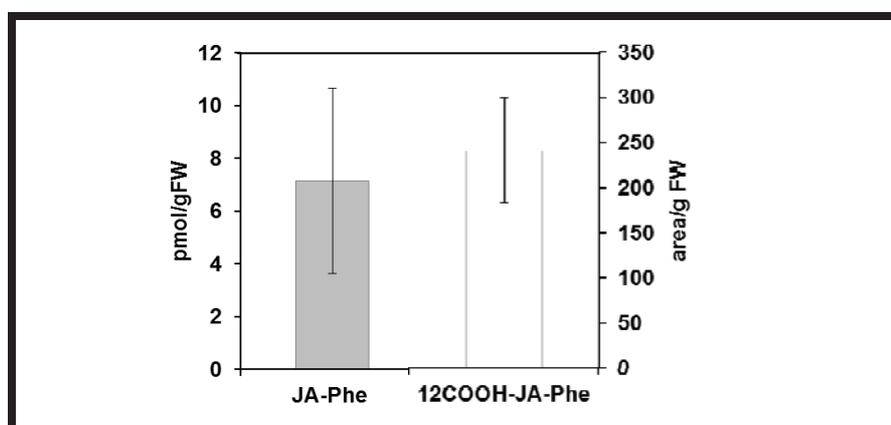


Figure 7-22 : Détection de JA-Phe et de 12COOH-JA-Phe par UPLC-MS/MS dans les extraits de fleurs ouvertes de Col0. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm SD) de réplicats biologiques. L'échelle de gauche s'applique à JA-Phe, celle de droite à 12COOH-JA-Phe.

Comme présenté en figure 7-22, JA-Phe a été dosé et du 12COOH-JA-Phe a pu être détecté dans les fleurs ouvertes. Ceci suggère que JA-Phe pourrait avoir un rôle à jouer dans le développement de la fleur et que ses niveaux sont régulés par carboxylation.

7.8 Conclusion

Des approches biochimiques, génétiques et métaboliques ont mis en évidence que CYP94B1, CYP94B3 et CYP94C1 métabolisent les conjugués JA-Phe et JA-Ile, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Des tests enzymatiques suivis d'analyses UPLC-MS/MS ont permis la mise en évidence de nouveaux jasmonates. Nous avons identifié les produits hydroxylés et carboxylés de JA-Phe dans les incubations de trois CYP94s en présence de JA-Phe. Les propriétés chimiques et l'instabilité des aldéhydes rendent leur identification difficile. En utilisant la méthode de dérivation par méthylation, nous avons pu caractériser les intermédiaires catalytiques aldéhydes 12CO-JA-Phe et 12CO-JA-Ile menant à la carboxylation des conjugués JA-Phe et JA-Ile respectivement. *In vitro*, CYP94C1 est plus efficace que CYP94B1 et CYP94B3 pour catalyser la formation d'aldéhyde. Trois des nouveaux jasmonates identifiés ont pu être détecté *in vivo*. En effet, les 12CO-JA-Ile, 12OH-JA-Phe et 12COOH-JA-Phe s'accumulent dans les feuilles blessées d'*Arabidopsis*, plus tardivement que leurs précurseurs non oxydés. Le 12CO-JA-Ile est le premier aldéhyde de jasmonate observé dans les plantes. L'analyse des profils métaboliques de mutants d'expression *CYP94s* a indiqué un rôle majeur de CYP94B3 dans l'accumulation de 12CO-JA-Ile et de 12OH-JA-Phe, tandis que celle de 12COOH-JA-Phe est essentiellement sous contrôle de CYP94C1. Le rôle mineur de CYP94B1 dans l'hydroxylation de JA-Ile et de JA-Phe a été révélé par l'analyse de feuille blessée du triple mutant *cyp94b1b3c1*. Les oxydations CYP94s-dépendantes de JA-Phe suggèrent que les niveaux de JA-Phe doivent être étroitement contrôlés par la plante. JA-Phe étant synthétisé également dans des feuilles d'*Arabidopsis* infectées par *Botrytis cinerea* et dans les fleurs, il est probable que ce composé ait des propriétés de signalisation conduisant à des réponses physiologiques attribuées à la voie des jasmonates.

7.9 Discussion

L'oxydation complète d'un méthyle en carboxyle passe par la formation d'intermédiaires hydroxyle et aldéhyde, comme nous l'avons observé pour JA-Phe et l'hormone JA-Ile. Les carboxylations d'ent-kaurène et d'acide ent-kaurénoïque menant à la synthèse de l'hormone GA₁₂ catalysées par CYP88A3 et CYP88A4 via des intermédiaires hydroxyle et aldéhyde ont également été décrites (Helliwell et al., 2001). Ainsi, ces oxydations successives catalysées par des P450s peuvent régir l'homéostasie de différentes hormones.

CYP94C1 catalyse la carboxylation de JA-Ile et de JA-Phe via des intermédiaires aldéhydes. Il avait également été montré auparavant que CYP94C1 catalyse la carboxylation en position oméga de l'acide laurique (C12 :0) via une carbonylation (Kandel et al., 2007). Il semble donc que, quel que soit le substrat, CYP94C1 réalise 3 étapes catalytiques successives sur le dernier carbone de la chaîne carbonée : ajout d'un groupement hydroxyle, puis conversion en un groupement aldéhyde avant formation d'une fonction carboxyle. Le fait que CYP94C1 métabolise de nombreux substrats et que chaque substrat conduise à la formation de 3 produits oxydés illustre les larges capacités enzymatiques de CYP94C1.

Après blessure, CYP94B3 est principalement responsable de l'accumulation des formes hydroxylées de JA-Ile et JA-Phe, tandis que CYP94C1 joue un rôle important dans la production des formes carboxylées des deux conjugués. Il est probable que cette spécificité catalytique soit liée à une conformation différente du site actif. Chez CYP94C1, le composé hydroxylé est probablement dans une position plus adéquate pour présenter le groupement hydroxyle au niveau de l'hème que chez CYP94B3, ce qui permettrait aux oxydations successives en aldéhyde et carboxyle d'être effectuées plus facilement.

Bien que métabolisant la chaîne pentényle de plusieurs conjugués JA-acide aminé, CYP94B3 et CYP94C1 sont spécifiques car ils ne métabolisent pas la chaîne pentényle de JA non conjugué. La présence d'acide aminé semble donc nécessaire pour positionner convenablement la chaîne pentényle de JA à proximité de l'hème.

Les formes oxydées de JA-Phe pourraient éventuellement avoir d'autres propriétés que JA-Phe ou être des intermédiaires pour la synthèse d'autres molécules. En effet, une forme glucosylée de JA-Ile, a été décrite (Kitaoka et al., 2014). Chez *cyp94c1*, l'absence d'augmentation de JA-Ile et de 12OH-JA-Ile pourrait être due à une conversion de l'excès de

JA-Ile en 12OH-JA-Ile puis en 12-O- β -Glucopyranosyl-JA-Ile. Tout comme le 12OH-JA-Ile semble être glucosylé, le 12OH-JA-Phe pourrait donc être par exemple un intermédiaire pour la synthèse d'un potentiel 12-O-Glc-JA-Phe. Les dérivés glucosylés sont souvent des formes de stockage.

Par ailleurs, les amido-hydrolases IAR3 et ILL6 métabolisant JA-Ile et 12OH-JA-Ile, on pourrait imaginer que les 12OH-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Ile pourraient également être hydrolysés par les amido-hydrolases IAR3, ILL6 ou ILR1, contribuant ainsi à la génération de 12OH-JA, de 12COOH-JA et d'un potentiel 12CO-JA respectivement.

Le fait que les 3 composés oxydés de JA-Ile soient accumulés après blessure suggère que chacun de ces composés pourraient avoir des rôles biologiques distincts. L'accumulation de 12CO-JA-Ile après blessure suggère que ce composé pourrait avoir une activité biologique. L'aldéhyde est électrophile et en contexte de stress, le carbone aldéhyde représente une cible pour des additions nucléophiles et peut interagir avec des groupes aminés de lysine ou d'arginine pour interférer avec la synthèse protéique (Schaunstein et al., 1977). L'addition de 12CO-JA-Ile sur des protéines pourrait modifier leurs fonctions et engendrer ainsi des réponses dépendant de la voie des jasmonates.

Comme JA-Ile, le conjugué JA-Phe est accumulé, puis hydroxylé et carboxylé dans les feuilles blessées. Ceci suggère qu'à l'instar de JA-Ile, JA-Phe pourrait également posséder des propriétés de signalisation, modulées par une inactivation partielle ou totale par oxydation. Les éléments régulant la signalisation de JA-Ile ont été très étudiés (Wasternack et Hause, 2013), cependant les acteurs d'une signalisation contrôlée par JA-Phe restent à découvrir.

CYP94B3 et CYP94C1 métabolisent JA-Ile et JA-Phe après blessure et jouent un rôle clé dans le contrôle des niveaux de ces jasmonates. On peut imaginer que d'autres conjugués JA-acide aminés puissent être oxydés par ces P450s. En effet très récemment, pendant nos travaux de recherche, l'hydroxylation de JA-Phe par CYP94B3 a été découverte indépendamment par une équipe japonaise (Kitaoka et al., 2014). Ces travaux décrivent l'accumulation de 12OH-JA-Val produit par CYP94B3. Le 12OH-JA-Ile est accumulé dès 30 min après blessure. Par contre, les 12OH-JA-Phe et 12OH-JA-Val sont accumulés plus tardivement (après 1 h). Ceci montre qu'au moins trois conjugués JA-acide aminé peuvent être oxydés par CYP94B3 après la blessure et suggère que d'autres conjugués JA-acide aminé

que JA-Ile pourraient avoir des fonctions dans la voie des jasmonates et être inactivés par oxydation CYP94-dépendante.

7.10 Article soumis au journal *Metabolomics* : Identification of the 12-oxojasmonoyl-isoleucine, a new jasmonate in Arabidopsis, by combining chemical derivatization and LC-MS/MS analysis.

1 Identification of the 12-oxo jasmonoyl-isooleucine, a new jasmonate in
2 Arabidopsis, by combining chemical derivatization and LC-MS/MS analysis

3

4 Emilie Widemann, Thierry Heitz, Laurence Miesch, Michel Miesch, Clément Heinrich , Franck
5 Pinot, Raphaël Lugan

6

7 E. Widemann, T. Heitz, F. Pinot, R. Lugan

8 Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche 2357 CNRS,
9 Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France

10 L. Miesch, M. Miesch, C. Heinrich

11 Laboratoire de Chimie Organique Synthétique, Institut de Chimie, Unité Mixte de Recherche
12 7177, Université de Strasbourg, CNRS, 1 rue Blaise Pascal 67008, Strasbourg Cedex, France

13

14 Corresponding author: Raphaël Lugan, raphael.lugan@ibmp-cnrs.unistra.fr, +33 (0)3 68 85
15 18 64

16

17

18 Abbreviated title: identification of 12-oxo jasmonoyl-isooleucine in Arabidopsis

19

20 **Abstract**

21 The Arabidopsis cytochrome P450 CYP94C1 is involved in the metabolism of jasmonates, a
22 family of phytohormones implicated in plant development and responses to bioagressors.
23 It has been shown to down-regulate the level of the active hormone jasmonoyl-isoleucine
24 (JA-Ile) by catalyzing its successive oxidation into hydroxyl (12OH-JA-Ile) and carboxyl
25 (12COOH-JA-Ile) derivatives. A meticulous investigation of the enzymatic reaction *in vitro*
26 reported here revealed the formation of a third oxidized product: UPLC-MS/MS data
27 matched a possible aldehyde, an intermediate form between 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-
28 Ile. To confirm the presence of an aldehyde group, the extracted metabolite from
29 incubations were derivatized with methoxyamine, an agent known to target carbonyl
30 functions specifically. UPLC-MS/MS analysis after derivatization confirmed the presence of
31 12-oxojasmonoyl-isoleucine (12CHO-JA-Ile). Methanolic extracts from Arabidopsis leaves
32 were then investigated after wounding, a treatment that triggers the accumulation of JA-
33 Ile and its oxidized derivatives. The 12CHO-JA-Ile produced a significant signal with the
34 same order of magnitude than the other oxidized forms. This study illustrates the
35 underestimated potential of chemical derivatization for rapid metabolite identification in
36 modern metabolomics and enriches our knowledge of the jasmonates family.

37

38

39 **Keywords :** Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), Chemical derivatization,
40 Jasmonates, Cytochrome P450

41

42

43 **1 Introduction**

44 Despite the constant improvement of analytical approaches and instruments, metabolomics
45 still encounters major limitations in terms of detection, identification and quantification
46 (Baker 2011; Patti *et al.*, 2012). The reason lies mostly in the wide range of metabolite
47 physicochemical properties and concentration ranges encountered in biological samples. *De*
48 *novo* identification is particularly challenging when pure reference standards are not
49 commercially available. The existence of isomers, unstable metabolites and poor database
50 comprehensiveness, especially in LC-MS based metabolomics, makes it even more difficult to
51 annotate metabolomics data. Even advanced analytical techniques face obvious gaps: high-
52 resolution mass spectrometry only offers a raw formula, MS/MS techniques produce
53 ambiguous results regarding isomers, while NMR requires a certain extent of purification
54 and concentration for efficient structural elucidation. Investigating a new structure is also an
55 investment of time and money, thus any shortcut toward results represents a valuable
56 saving. Chemical derivatization consists in the selective reaction of metabolites with
57 derivatizing agents targeting specific functional groups, with the aim of improving the
58 detectability of the metabolites (Kind and Fiehn, 2010). Many techniques have been
59 described so far to enhance the chromatographic behavior and ionization efficiency in GC-
60 MS or LC-MS driven metabolomics (Halket *et al.*, 2005; Kind and Fiehn, 2010; Zaikin *et al.*,
61 2009). Being specific to a molecular family, derivatization is by nature very suitable for
62 targeted profiling, *e.g.* amino acids, carboxylic acids, sugars, flavanones or phytohormones
63 (Di Donna *et al.*, 2013; Jubault *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2009; Roessner *et al.*, 2000). As
64 shown in this paper, it can also be used as a chemical diagnostic tool to identify new
65 compounds. We took advantage of the selective derivatization of carbonyl groups by
66 methoxyamine (MeOX), combined with LC-MS/MS, to identify 12CHO-JA-Ile, a new member

67 of the jasmonate family, an important class of phytohormones involved in plant
68 development and responses to biotic stresses (Ballaré, 2011; Wasternack, 2007). This
69 compound is a carbonyl intermediate in the catalytic oxidation of JA-Ile, the active hormone,
70 whose degradation depends on the two cytochromes P450 (P450) CYP94C1 and CYP94B3,
71 catalyzing its successive oxidation into 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile (Heitz *et al.*, 2012;
72 Koo *et al.*, 2011). To prove the unambiguous formation and significant accumulation of the
73 intermediate 12CHO-JA-Ile, the reaction catalyzed by CYP94C1 was investigated *in vitro*. The
74 presence of this compound was also investigated in the leaves of *Arabidopsis thaliana*, after
75 the wounding-induced activation of the jasmonate pathways.

76

77 **2 Material and methods**

78

79 **2.1 CYP94C1 protein production and *in vitro* enzymatic assays**

80 CYP94C1 was produced in a yeast optimized heterologous system as described in Heitz *et al.*
81 (2012). The coding sequence was amplified from an *Arabidopsis* genomic library, cloned in
82 the plasmid pYeDP60, and introduced into the *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 strain.
83 Yeast has only three cytochromes P450, which are expressed at a negligible level under the
84 growth condition used. Yeast cultures were grown, and cytochrome P450 expression was
85 induced as described in Pompon *et al.* (1996). Then cells were harvested by centrifugation
86 and manually broken with glass beads (0.45 mm diameter) in a buffer (50 mM Tris-HCl (pH
87 7.5), 1 mM EDTA, 600 mM sorbitol). The homogenate was centrifuged for 10 min at 10,000
88 × g. The resulting supernatant was centrifuged for 1 h at 100,000 × g. The pellet consisting of
89 microsomal membranes was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, and 30%
90 (v/v) glycerol with a Potter-Elvehjem homogenizer and stored at -30 °C. All procedures for

91 microsomal preparation were carried out at 0–4 °C. The total protein content in the
92 microsomes, 9.2 mg/mL, was estimated by the Bradford method. For determination of
93 CYP94C1 enzymatic capabilities, the incubation medium (0.1 mL) contained 30
94 µL microsomes in 20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 1 mM NADPH, and JA-Ile (100 µM; JA-
95 Ile was obtained according to the method reported by Kramell *et al.*, 1988). The reaction was
96 initiated by the addition of NADPH and, after 30 min at 27 °C, was stopped by the addition of
97 200 µL of acetonitrile containing 0.2 % acetic acid. The mixture was centrifuged for 10 min at
98 2000 × g, and the supernatant was cleared by filtration through a 0.22-µm filter. Metabolites
99 in incubation media were directly analyzed by UPLC-MS/MS.

100

101 2.2 Leaf wounding and jasmonate extraction

102 *Arabidopsis thaliana* plants of the Col0 ecotype were grown under a 12 h/12 h photoperiod
103 in a growth chamber regulated at 21 °C. Between 5 and 7 fully expanded leaves of 6–7-
104 week-old plants were wounded 3 times across the midvein with a hemostat. Four hours
105 later, wounded leaves were quickly harvested and flash-frozen in liquid nitrogen before
106 storing at –80 °C until jasmonate extraction. Leaves of unwounded plants were also collected
107 as a control. The jasmonate extraction solvent, consisting of ice-cold 90% methanol
108 containing 9,10-dihydro-JA-Ile as an internal standard, was added to frozen leaf powder
109 (130–150 mg fresh weight) in a 2 mL microtube containing glass beads. The ratio was 750 µL
110 of extraction solvent for 150 mg fresh weight leaves. The material was ground twice for 30 s
111 with a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-Le-Bretonneux,
112 France) and homogenized on a rotary agitator (25 min, 4 °C). Homogenates were cleared by
113 centrifugation at 18,000 × g and supernatants were concentrated under nitrogen flux before

114 one night at -30 °C. A last centrifugation at 18,000 × g removed precipitates and
115 supernatants were saved for UPLC-MS/MS analysis.

116

117 2.3 Chemical derivatization

118 The protocol was adapted from Di Donna *et al.*, 2013. A solution of methoxyamine
119 hydrochloride was prepared at 126 mg/mL in ultrapure water. The samples were derivatized
120 by adding the methoxyamine solution 84:16 (V/V) to obtain a methoxyamine final
121 concentration of 20 mg/mL. The samples were then agitated at 900 rpm for 90 min at 40 °C
122 before LC-MS analysis.

123

124 2.4 UPLC-MS/MS

125 Jasmonates from plant extracts and enzymatic incubations media were analyzed by ultra-
126 performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. All analyses
127 were performed using a Waters Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA) equipped with an
128 electrospray ionization source (ESI) and coupled to an Acquity UPLC system (Waters).
129 Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 × 2.1
130 mm, 1.7 μm; Waters) and a pre-column. The mobile phase consisted of water (A) and
131 methanol (B), both containing 0.1% formic acid. The run started by 2 min of 95% A, then a
132 linear gradient was applied to reach 100% B at 12 min followed by isocratic run using B
133 during 2 min. Return to initial conditions was achieved in 3 min, with a total run time of 17
134 min. The column was operated at 35 °C with a flow rate of 0.35 mL/min, injecting 3 or 5 μL
135 samples. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. The nebulizer gas flow was set
136 to 50 L/h and the desolvation gas flow was set to 900 L/h. The interface temperature was set
137 to 400 °C, and the source temperature was set to 135 °C. The capillary voltage was set to 3.4

138 kV. For all MS experiments cone voltage (CV) was set to 25V, for MS/MS experiments
139 (daughter scans and multiple reactions monitoring), cone voltage and collision energies (CE)
140 were tested between 8V and 32V, optimal values were selected for each compound upon
141 signal to noise ratio. Multiple reactions monitoring transitions are : JA-Ile, ES⁺, 324>151,
142 CV=25V, CE=20eV ; 12-OH-JA-Ile, 338>130, ES⁺, CV=25V, CE=23eV ; 12COOH-JA-Ile, ES⁺,
143 352>130, CV=25V, CE=23eV ; 12CHO-JA-Ile, ES⁺, 338>132, CV=16V, CE=16eV ; JA-Ile-MeOX,
144 ES⁺, 353>322, CV=24V, CE=8eV ; 12CHO-JA-Ile-2MeOX, ES⁺, 396>365, CV=24V, CE=8eV. Data
145 acquisition and analysis were performed with the MassLynx software (Waters, Mildorf, MA,
146 USA).

147

148 **3 Results**

149 As already reported (Heitz *et al.*, 2012), CYP94C1 was found very effective at converting its
150 natural substrate JA-Ile into both 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile, two products with very
151 similar chromatographic behaviors in reverse phase, eluting respectively at 8.38 and 8.35
152 min under our conditions of analysis. MS scanning between 8.30 and 8.50 min showed the
153 expected molecular ions and adducts of the two compounds (Fig. 1) : in positive mode,
154 12OH-JA-Ile gave a molecular ion[M+H]⁺ at m/z 340, but also *in-source* adducts and
155 fragments [M+Na]⁺ at m/z 362, [M+K]⁺ at m/z 378, [M+H-H₂O]⁺ at 322 and in negative mode
156 [M-H]⁻ at m/z 338. 12COOH-JA-Ile gave [M+H]⁺ at m/z 354, [M+Na]⁺ at m/z 376, [M+H]⁺ at
157 m/z 392 and [M-H]⁻ at m/z 352. Other ions were also observed that could not match any
158 obvious adduct of either the hydroxyl or the carboxyl derivatives of JA-Ile: 338, 360, 376, 320
159 in positive mode, and 336 in negative mode. It was hypothesized that they could be the
160 [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺, [M+H-H₂O]⁺ and [M-H]⁻, respectively, of a didehydro-12OH-JA-Ile,
161 most likely the 12CHO-JA-Ile. MS/MS fragmentation of m/z 338 in positive mode gave a mass

162 signal m/z 320, possibly formed by the loss of H_2O , and also m/z 292 and 274 after the
163 successive loss of another molecule of water and of the carboxyl of the isoleucine moiety at
164 position 1' (Fig. 1); m/z 132 corresponds to the isoleucine moiety, and 153 could be due to
165 the opening of the ring between carbons 3 and 7 and the neutral loss of 186. In negative
166 mode, m/z 130 is tentatively assigned as the isoleucine moiety, and 172 results from a
167 breakage between carbon 3 of the JA ring and carbon 2 of the lateral chain. This
168 fragmentation pattern is consistent with a JA-Ile derivative and allowed the setup of an
169 MRM method for this compound in positive mode, with the transition 338>132. The analysis
170 in MRM mode confirms the NADPH-dependent production of three almost co-eluting,
171 though distinct, compounds when CYP94C1 is fed with JA-Ile (Fig. 2).

172 To confirm the identity of the putative 12CHO-JA-Ile, samples were derivatized with
173 methoxyamine hydrochloride, a reagent known to target carbonyl groups (Knapp, 1979). All
174 JA-Ile derivatives possess a ketone function on the ring of the jasmonate moiety at position
175 6; but only 12CHO-JA-Ile would also bring an aldehyde function, at position 12. 12CHO-JA-Ile
176 is thus the only compound expected to be derivatized twice. Because methoxyamination
177 increases the monoisotopic mass by 29 amu for each carbonyl group, JA-Ile, 12OH-JA-Ile and
178 12COOH-JA-Ile were expected to produce positive molecular ions at m/z 353, 369 and 383,
179 respectively, while 12CHO-JA-Ile was expected to produce m/z 396. The MS scan conducted
180 in positive mode clearly demonstrated that only the putative 12CHO-JA-Ile had been
181 derivatized twice, therefore confirming its identity (Fig. 3). Data also indicate that the
182 derivatization was fully efficient since no trace of underivatized compound was detected
183 after methoxyamination, which validates the method; *i.e.*, the saturating concentration of
184 methoxyamine. The molecular ion m/z 396 at 10.28 min of the derivatized 12CHO-JA-Ile was
185 fragmented in MS/MS (Fig. 4), revealing the ions 365 and 334, corresponding to two

186 successive losses of 31 neutral moieties (MeOX groups). It was then possible to optimize
187 MRM transitions for the derivatized JA-Ile and 12CHO-JA-Ile, for further *in vivo* investigation.
188 Since 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile levels have been reported to reach a maximum in
189 Arabidopsis leaves 4h post-wounding (Heitz *et al.*, 2012), plant extracts sampled just before
190 and 4h post-wounding were derivatized and screened in MRM mode for the presence of
191 jasmonates. The results show the clear induction of JA-Ile accumulation 4h post-wounding
192 and less expectedly, the accumulation of the newly characterized compound 12CHO-JA-Ile.

193

194 **4 Discussion**

195 Chemical derivatization is an ancient and proven trick in analytical chemistry (Knapp, 1979).
196 In modern metabolomics, it is still an unavoidable step in most GC-MS analyses and a case-
197 by-case option for improved LC-MS (Halket *et al.*, 2005). Although it is rightly considered as
198 both time consuming and source of bias, it can hardly be discarded given the improvement
199 brought to critical aspects of analysis: chromatographic separation, detection limit, and
200 dynamic range. For example, despite derivatization-free methods described recently for
201 quantifying trivial metabolites such as amino acids (Langrock *et al.*, 2006), derivatization
202 remains the method of choice, providing better peak shapes and shorter runs (Jubault *et al.*,
203 2008; Lugan *et al.*, 2010).

204 Several methods have been reported recently for the chemical derivatization of carbonyl
205 groups in LC-MS profiling studies, with the aim of improving an inherently low MS ionization
206 (Berdyshev, 2011; Eggink *et al.*, Eggink *et al.*, 2010; 2008; Lu *et al.*, 2013). The drawback of
207 these techniques is a lack of simplicity, either because of limited reagent availability or
208 labour-intensive procedures; on the contrary, the method reported here is very simple.
209 Methoxyamination was not meant to improve the analysis, indeed the nonpolar methoxime

210 function is less ionisable by electrospray than the original carbonyl and the MS signal was
211 consistently lower after derivatization (not shown). Alternatives do exist, such as
212 hydroxylamine, which would render the molecule more polar and ionisable, while
213 ethoxyamine would make it even less polar; either reagent might be appropriate depending
214 on the desired physicochemical properties of the derivatized molecules. Here we used
215 derivatization strictly as an identification technique, combined with orthogonal data from
216 mass spectrometry, in accordance with the Chemical Analysis Working Group
217 recommendations for *de novo* identification (Sumner *et al.*, 2007). It provided evidence for
218 the presence of an aldehyde function on an oxidized form of JA-Ile.

219 Hydroxylation of aliphatic chains by P450 monooxygenases is well described (Höfer *et al.*,
220 2013); the resulting products are alcohols, but also carboxylic acids : liver P450s were found
221 to oxidize carbon chains to acids (Le Bouquin *et al.*, 2005; Scheller *et al.*, 1998) and in plants
222 the JA-Ile-12-hydroxylase activity of CYP94B3 and CYP94C1 was recently established as these
223 P450 catalyze a cascade of ω -oxidations leading from a methyl group to both hydroxyl and
224 carboxyl functions (Heitz *et al.*, 2012; Kitaoka *et al.*, 2011). The oxidation mechanism
225 involves successive monooxygenation steps, with the transient formation of a gem-diol
226 (hydrated aldehyde) which then rearranges to the carboxyl (Le Bouquin *et al.*, 2005; Scheller
227 *et al.*, 1998). This type of reaction can also lead *in vitro* to limited amounts of aldehyde, if
228 this intermediary product dissociates from the active enzyme site (Bell-Parikh and
229 Guengerich, 1999). The CYP76B6 from *Catharanthus roseus* has been found to catalyze, *in*
230 *vitro* and *in vivo*, the successive oxidation of geraniol, a plant monoterpene, into hydroxy
231 and oxogeraniol, but it was not able to catalyze further conversion into the carboxyl function
232 (Miettinen *et al.*, 2014).

233 The incubation of JA-Ile in the presence of CYP94C1 and NADPH produces 12OH-JA-Ile and
234 12COOH-JA-Ile as expected, but also 12CHO-JA-Ile, described here for the first time. *In vitro*
235 assays provided samples with quite concentrated products and low background noise, which
236 allowed the setup of MRM optimization for subsequent *in vivo* investigation. 12CHO-JA-Ile
237 was found accumulated in leaf extracts as a response to wounding, just like JA-Ile and the
238 other oxidized forms. It suggests 12CHO-JA-Ile could be more than a simple catabolic
239 intermediate between 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile. This finding raises questions about a
240 possible biological function for this new jasmonate, and about the existence of other
241 aldehydes produced similarly from other jasmonoyl conjugates. In this perspective, 12CHO-
242 JA-Ile might be active on its own or might become involved in branched pathways leading to
243 other putatively bioactive compounds.

244

245 **Concluding Remarks**

246 Our study shows how a derivatization technique can provide a straightforward way to
247 confirm the identity of a new metabolite. LC-MS/MS data are rarely sufficient, especially
248 when the compounds under focus are not abundant and display very close physicochemical
249 properties, making purification challenging. The range of existing derivatization chemicals is
250 large enough to cover most kinds of metabolites. The rapid and simple identification of
251 12CHO-JA-Ile described here paves the way for further investigation that will be necessary to
252 establish a putative function, including studies of its accumulation pattern, in terms of
253 kinetics, levels reached and response to stimuli.

254

255

256 **References**

- 257 Baker, M. (2011). Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nature Methods*, 8, 117-
258 121.
- 259 Ballaré, C. (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and
260 rascals. *Trends in Plant Science*, 16, 249-257.
- 261 Bell-Parikh, L. C., Guengerich, F. P. (1999). Kinetics of Cytochrome P450 2E1-Catalyzed
262 Oxidation of Ethanol to Acetic Acid via Acetaldehyde. *The Journal of Biological Chemistry*,
263 274, 23833-23840.
- 264 Berdyshev, E. V. (2011). Mass spectrometry of fatty aldehydes. *Biochimica et Biophysica*
265 *Acta*, 1811, 680-693.
- 266 Di Donna, L., Taverna, D., Mazzotti, F. *et al.* (2013). Comprehensive assay of flavanones in
267 citrus juices and beverages by UHPLC-ESI-MS/MS and derivatization chemistry. *Food*
268 *Chemistry*, 141, 2328-2333.
- 269 Eggink, M., Witjans, M., Ekkebus, R. *et al.* (2008). Development of a Selective ESI-MS
270 Derivatization Reagent: Synthesis and Optimization for the Analysis of Aldehydes in
271 Biological Mixtures. *Analytical Chemistry*, 80, 9042-9051.
- 272 Eggink, M., Witjans, M., Kretschmer, A. *et al.* (2010). Targeted LC-MS derivatization for
273 aldehydes and carboxylic acids with a new derivatization agent 4-APEBA. *Analytical and*
274 *Bioanalytical Chemistry*, 397, 665-675.
- 275 Guengerich, P.(2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to
276 Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 612-640.
- 277 Halket, J. M., Watermann, D., Przyborowska, A., Patel, R. K. P., Fraser, P. D., Bramley, P. M.
278 (2005). Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS
279 and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*, 56, 219-243.

280 Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R. *et al.* (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3
281 Catalyze Two Successive Oxidation Steps of Plant Hormone Jasmonoyl-isoleucine for
282 Catabolic Turnover. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 6296-6306.

283 Höfer, R., Dong, L., André, F. *et al.* (2013). Geraniol hydroxylase and hydroxygeraniol oxidase
284 activities of the CYP76 family of cytochrome P450 enzymes and potential for engineering the
285 early steps of the (seco)iridoid pathway. *Metabolic Engineering*, 20, 221-232.

286 Jubault, M., Hamon, C., Gravot, A. *et al.* (2008). Differential regulation of root arginine
287 catabolism and polyamine metabolism in clubroot-susceptible and partially resistant
288 *Arabidopsis* genotypes. *Plant Physiology*, 146, 2008–2019.

289 Kind, T., Fiehn, O. (2010). Advances in structure elucidation of small molecules using mass
290 spectrometry. *Bioanalytical Reviews*, 2, 23-60.

291 Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M. *et al.* (2011). *Arabidopsis* CYP94B3 Encodes Jasmonyl-L-
292 Isoleucine 12-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Jasmonate. *Plant*
293 *and Cell Physiology*, 10, 1757-1765.

294 Knapp, D. R., *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley and Sons, Inc.,
295 1979.

296 Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H. *et al.* (2009). Highly Sensitive and High-
297 Throughput Analysis of Plant Hormones Using MS-Probe Modification and Liquid
298 Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Application for Hormone Profiling in
299 *Oryza sativa*. *Plant cell and Physiology*, 50, 1201-1214.

300 Koo, A. J. K., Cooke, T. F., Howe, G. A. (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates
301 catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proceedings of the*
302 *National Academy of Sciences*, 22, 9298-9303.

303 Kramell, T., Schmidt, J., Schneider, G., Sembdner, G., and Schreiber, K. (1988). Synthesis of n-
304 (jasmonoyl)amino acid conjugates. *Tetrahedron* 44, 5791–5807.

305 Patti, G. J., Yanes, O., Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy.
306 *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 263-269.

307 Langrock, P., Czihal, P., Hoffmann, R., (2006). Amino acid analysis by hydrophilic interaction
308 chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry. *Amino Acids*,
309 30, 291-297.

310 Le Bouquin, R., Skrabs, M., Kahn, R. *et al.* (2001). CYP94A5, a new cytochrome P450 from
311 *Nicotiana tabacum* is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the α -alcohol and to the
312 corresponding diacid. *European Journal of Biochemistry*, 268-3083-3090.

313 Lu, Y., Yao, D., Chen, C. (2013). 2-Hydrazinoquinoline as a Derivatization Agent for LC-MS-
314 Based Metabolomic Investigation of Diabetic Ketoacidosis. *Metabolites*, 3, 993-1010.

315 Lugan, R., Niogret, M-F., Leport, L. *et al.* (2010). Metabolome and water homeostasis analysis
316 of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic
317 stress in this halophyte. *The Plant Journal*, 64, 215-229.

318 Miettinen, K., Dong, L; Navrot, N. *et al.* (2014). The seco-iridoid pathway from *Catharanthus*
319 *roseus*. *Nature Communications*, 5, 1-11.

320 Pompon, D., Louerat B., Bronine, A., Urban, P. (1996). Yeast expression of Animal and Plant
321 P450s in Optimized Redox Environments. *Methods in Enzymology*, 272, 51-64.

322 Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N. and Willmitzer, L. (2000). Simultaneous
323 analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *The*
324 *Plant Journal*, 23, 131–142.

325 Scheller, U., Zimmer, T., Bercher, D., Schauer, F., Schunk, W-H. (1998). Oxygenation Cascade
326 in Conversion of n-Alkanes to α,ω -Dioic Acids Catalyzed by Cytochrome P450 52A3. The
327 Journal of Biological Chemistry, 273, 32528-32534.

328 Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D. *et al.* (2007). Proposed minimum reporting standards
329 for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards
330 Initiative (MSI). Metabolomics, 3, 211-221.

331 Wasternak, C. (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and
332 Action in Plant Stress Response, Growth and Development. Annals of Botany, 100, 681-697.

333 Zaikin, V., Kalket, J. M. A handbook of derivatives for mass spectrometry. IM Publications,
334 West Sussex, 2009.

335

336

337

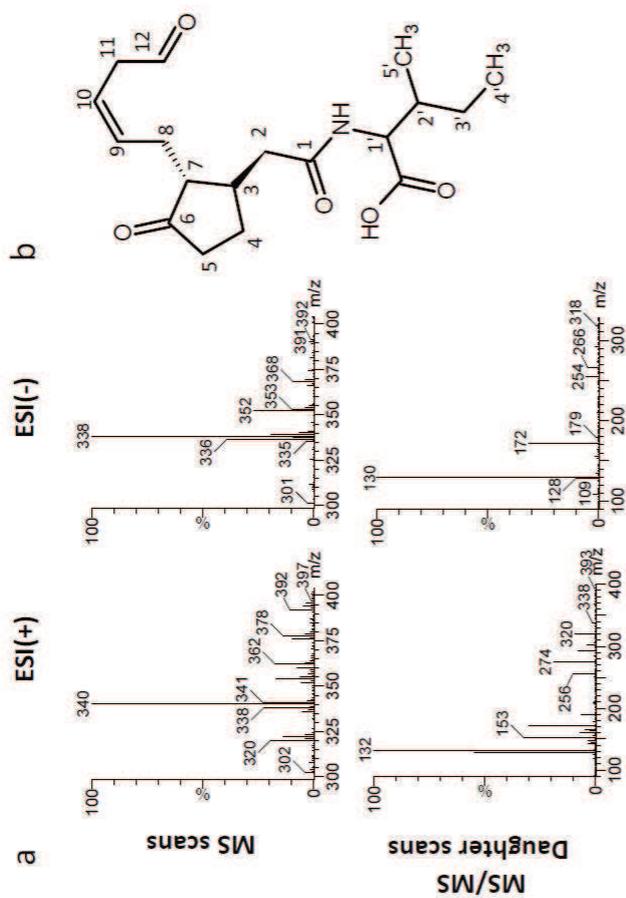


Fig. 1 Analysis of *in vitro* assay of CYP94C1 incubated with JA-ile and NADPH. MS scans and MS/MS daughter scans ESI spectra at 8.37 min, in positive and negative modes. MS/MS spectra are shown for m/z 338 in positive mode and m/z 336 in negative mode (a). 12CHO-JA-ile structure with carbon numbering (b).

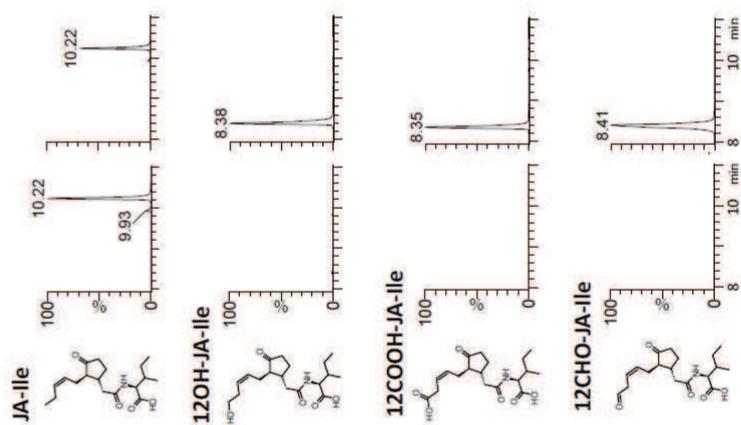


Fig. 2 Analysis of *In vitro* assays of CYP94C1 incubated with JA-ile only (left column) or JA-ile and NADPH (right column). Multiple reactions monitoring chromatograms are shown for JA-ile: 324>151, 12OH-JA-ile: 338>130, 12COOH-JA-ile: 352>130 and the putative 12CHO-JA-ile: 338>132.

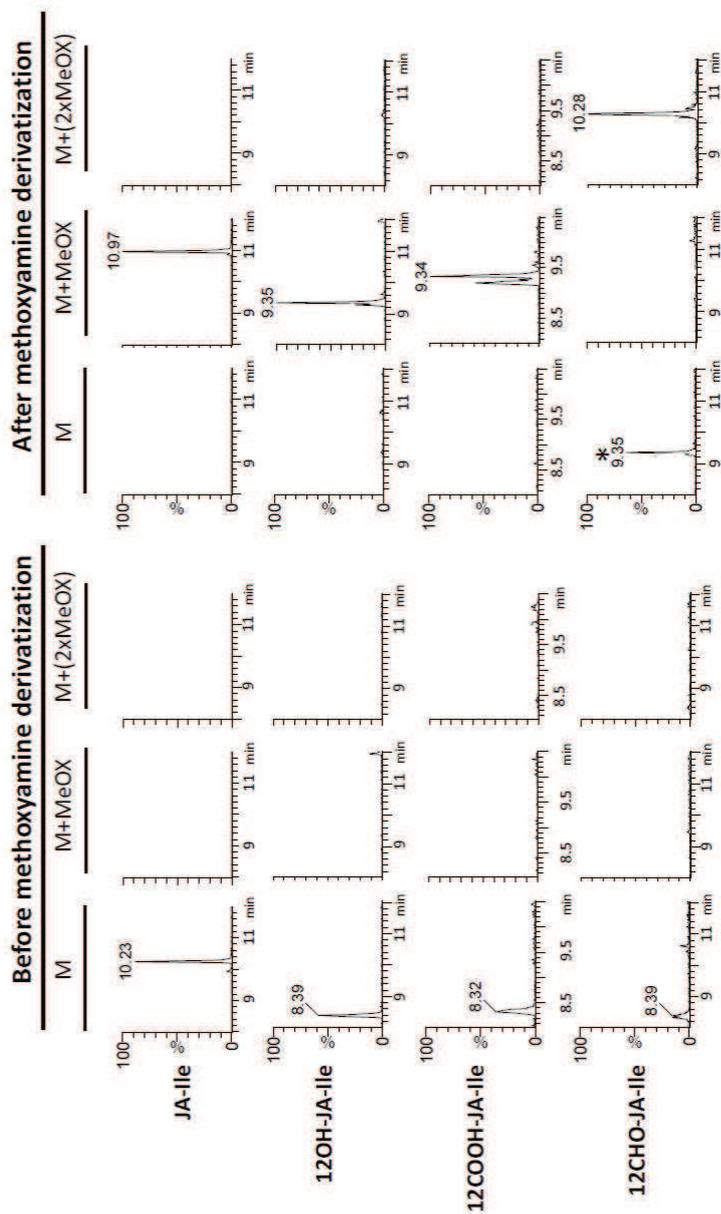


Fig. 3 Analysis of *in vitro* assay of CYP94C1 incubated with JA-Ile and NADPH. Extracted ions chromatograms from positive MS scans of the products were screened for the addition of one or two methoxime groups, before and after methoxyamine derivatization. *m/z* for JA-Ile are 324.2, 353.2 and 381.3; *m/z* for 12OH-JA-Ile are 340.2, 369.2 and 398.3; *m/z* for 12COOH-JA-Ile are 354.2, 383.2 and 412.2; *m/z* for 12CHO-JA-Ile *m/z* are 338.2, 367.2 and 396.2. * The peak at 9.35 for *m/z* 338.2 is produced by *in source* loss of MeOx from 12OH-JA-Ile-MeOx, it is not related to 12CHO-JA-Ile.

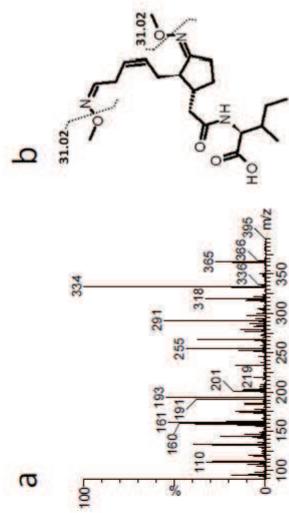


Fig. 4 Analysis of *In vitro* assay of CYP94C1 incubated with JA-Ile and NADPH and derivatized with methoxyamine. MS/MS spectrum at 10.28 min of m/z 396.2 (a) ; fragmentation pattern showing the loss of one or two methoxime groups explaining the daughter ions 365 and 334 respectively (b).

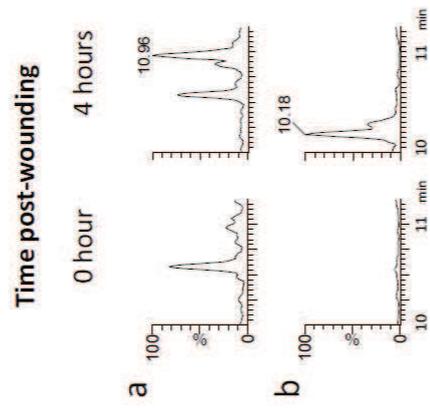


Fig. 5 Analysis of Arabidopsis leaf extracts derivatized with methoxyamine. Multiple reactions monitoring chromatograms of JA-Ile-MeOX: 353>322 (a) and 12CHO-JA-Ile-2MeOX: 396>365 (b) are shown before and 4 hours post-wounding.

7.11 Article en préparation : Identification of new oxidized jasmonates: CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 hydroxyl Jasmonoyl-Phenylalanine and Jasmonoyl-Isoleucine further oxidized to carboxyl derivatives through aldehyde intermediate.

1 Identification of new oxidized jasmonates: CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 hydroxylate
2 Jasmonoyl-Phenylalanine and Jasmonoyl-Isoleucine which are further oxidized to carboxyl
3 derivatives through aldehyde intermediate.
4

5 ¹Widemann E., ¹Grausem B., ²Heinrich C., ¹Lugan R., ¹Ulmann P., ²Miesch L.,
6 ²Miesch M., ¹Aubert Y., ¹Heitz T & ¹Pinot F.

7

8 ¹Département Réseaux Métaboliques chez les Végétaux. IBMP-UDS-CNRS UPR 2357,
9 28 Rue Goethe, F-67083 Strasbourg Cedex, France

10 ²Laboratoire de Chimie Organique Synthétique, UMR 7177/UDS, 1 rue Blaise Pascal
11 67008, Strasbourg, Cedex.

12

13 Corresponding author :

14 Franck Pinot

15 IBMP-ULP-CNRS UPR 2357

16 Département Réseaux Métaboliques chez les Végétaux,

17 28 Rue Goethe, F-67083 Strasbourg Cedex, France

18 Tel labo (00 33) 368 85 18 37

19 Tel office (00 33) 368 85 18 43

20 franck.pinot@ibmp-cnrs.unistra.fr

21

22 Keyword index : cytochrome P450, hormone, signalisation, stress, environment,
23 metabolomics.

24

25

26 **ABSTRACT**

27

28 The role of the Jasmonoyl-Phenylalanine (JA-Phe), an understudied conjugate in the
29 jasmonate hormonal pathway, remains to be elucidated. We describe here post-wounding
30 accumulation, in *Arabidopsis* leaves, of JA-Phe and its oxidized forms 12OH-JA-Phe and
31 12COOH-JA-Phe. Timing of JA-Phe accumulation is delayed compared to the one of
32 Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile). JA-Phe was also detected during fungal infection and in
33 developed flowers. Heterologously expressed cytochromes P450 CYP94B1, CYP94B3 and
34 CYP94C1 produced the hydroxyl 12OH-JA-Phe which was further oxidized into the
35 carboxyl 12COOH-JA-Phe by CYP94B3 and CYP94C1. With the latter enzymes the
36 aldehyde intermediate 12COH-JA-Phe was newly characterized. CYP94B1 produced almost
37 exclusively hydroxyl, CYP94B3 produced hydroxyl but also formed aldehyde and carboxyl,
38 when CYP94C1 readily catalysed aldehyde and carboxyl formation. Loss- and gain-of-
39 function plant lines were analyzed for their metabolic profile after leaf wounding.
40 Compared to WT plants, the levels of 12OH-JA-Phe were drastically reduced in *cyp94b3*
41 whereas *cyp94c1* and *cyp94b3c1* accumulated much less 12COOH-JA-Phe. The data
42 indicate that, *in planta*, hydroxylation by CYP94B3 and carboxylation by CYP94C1
43 turnover JA-Phe produced post-wounding. We also describe 12COH-JA-Ile, a new
44 aldehyde jasmonate compound that accumulates post-wounding. We propose that
45 members of the CYP94 family are multifunctional actors in the oxidative clearance of JA-
46 aminoacid conjugates.

47

48

49 **INTRODUCTION**

50

51 In the model plant *Arabidopsis*, cytochrome P450 enzymes (P450s) represent the
52 largest gene superfamily behind F-Box proteins and receptor-like kinases (Nelson and
53 Werck-Reichhart, 2011). Thanks to oxygen activation through binding to their heme, P450s
54 are able to catalyse thermodynamically disfavoured reactions like hydroxylation of
55 unfunctionalized alkyl groups in hydrocarbons and fatty acids (Coon, 2005). They can also
56 catalyse epoxidation, N- and S- oxidation, C-, N- and O- dealkylation, isomerisation (Durst
57 and O'Keefe, 1995). P450s represent up to 1% of total genes in plant species and
58 *Arabidopsis*, poplar, rice and grape possess 246, 312, 356 and 457 P450s, respectively
59 (reviewed in Mizutani and Ohta (2010)). In comparison, the human genome codes for 57
60 P450s (Nebert *et al.* 2013). If complete sequencing allowed precise numbering and sorting
61 in some plant species, the physiological roles of the majority of P450s remain to be
62 established. Mizutani and Ohta (2010) reported that in *Arabidopsis* less than 30% of the
63 P450s have a characterized function. The multiplicity of P450s in a single plant species is
64 thought to reflect a mechanism of adaptation to the environment. Plants are sessile
65 organisms and rely on a battery of chemicals for survival. They have developed a highly
66 complex metabolic network using the diversified catalytic properties of the P450s (Nelson,
67 2006). Induction of plant P450s expression by numerous factors corroborates the hypothesis
68 of their participation to plant adaptation. Indeed, expression of plant P450s genes is
69 enhanced by a variety of physical and chemical agents (Durst and O'Keefe, 1995). For
70 example, *CYP94A1* from *Vicia sativa* is induced by chemical stress (Benveniste *et al.* 2005),
71 atmospheric pollutants (Kastner *et al.* 2010), methyl jasmonate (Pinot *et al.* 1998),
72 *CYP709C1* from wheat is induced by xenobiotics and a safener (Kandel *et al.* 2005),
73 *CYP94C1* from *Arabidopsis* is inducible by methyl jasmonate and by wounding (Kandel *et al.*
74 2007; Heitz *et al.* 2012).

75 In the different strategies of plant adaptation, involvement of P450s has been well
76 investigated for example in the context of protective envelope synthesis as well as in
77 hormone synthesis and catabolism (Pinot and Beisson, 2011; Mizutani and Ohta, 2010).
78 When plant conquered land ca. 400 million years ago they had to face stresses like
79 desiccation, UV radiation and pathogens. They have evolved cutin and suberin, hydrophobic
80 biopolymers that represent the first physical barrier between plant and environment. These
81 polymers are constituted mainly of FA linked together via ester bonds between ω -hydroxyl
82 and carboxyl groups of fatty acids (Pinot and Beisson, 2011). The first P450 dependent fatty
83 acid ω -hydroxylases characterized were *CYP94A1* (Tijet *et al.* 1998) and *CYP86A1*
84 (Benveniste *et al.* 1998) making members of these families potential actors in cutin or
85 suberin synthesis. Investigations performed with *Arabidopsis* mutants clearly confirmed the
86 key role of members of the CYP86 family in the ω -hydroxylation of fatty acids before their
87 incorporation in cutin and suberin (Pinot and Beisson, 2011). Such a role for P450s from
88 CYP94 family remains to be established. However as mentioned above, they have been
89 recently shown to be able to form hydroxylate and carboxylate conjugates of fatty acids
90 derivatives.

91 Besides physical barriers, hormonal control is of primary importance for plant life
92 cycle and adaptation to constraints due to environmental changes (Santner and Estelle, 2009;

93 Depuydt and Hardtke, 2011). P450s participate to plant hormone homeostasis and are
94 involved in biosynthesis or inactivation of various hormones including jasmonates (Mizutani
95 and Ohta, 2010). Jasmonates are lipid-derived phytohormones that regulate plant growth and
96 development as well as responses to biotic and abiotic stresses (Wasternack and Kombrink,
97 2010; Fonseca *et al.* 2009; Acosta and Farmer, 2010; Wasternack and Hause, 2013). During
98 the last decade jasmonates synthesis and perception have been deeply investigated and fine
99 mechanisms of these processes are now well documented (Wasternack and Hause 2013;
100 Acosta and farmer, 2010). In *Arabidopsis*, CYP74A1 plays a key role in early steps of
101 jasmonates synthesis. This atypical P450 exhibits an allene oxide synthase activity and
102 catalyses dehydration of 13-hydroperoxide of linolenic acid to yield an unstable C18 allene
103 oxide, an upstream precursor of jasmonic acid (Stumpe and Feussner, 2006). A major
104 breakthrough was the discovery of JAR1, a jasmonic acid-amino acid synthetase able to
105 conjugate jasmonic acid to isoleucine (Staswick and Tiryaki, 2004). The resulting
106 Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile) was then identified as the endogenous bioactive jasmonate
107 (Fonseca *et al.* 2009). Mechanism of JA-Ile perception is well documented (Katsir *et al.*
108 2008). Briefly, Jasmonate ZIM-domain (JAZ) proteins prohibit transcription of JA-Ile-
109 responsive genes by blocking transcription factors (*e.g.* MYC2). In presence of JA-Ile, the
110 coronatine-insensitive1 (COI1) receptor interacts with JAZ proteins that are ubiquitinated
111 and then degraded by the 26S proteasome, leading to de-repression of JA-responsive genes.
112 In contrast, until recently, metabolic inactivation of jasmonates was poorly documented.
113 This lack of information was in part filled first with two independent reports describing
114 *Arabidopsis* CYP94B3 as a JA-Ile hydroxylase responsible for 12OH-JA-Ile accumulation
115 after wounding (Koo *et al.* 2011, Heitz *et al.* 2012). We then demonstrated that beside
116 hydroxylation, CYP94B3 could also catalyse carboxylation of JA-Ile and we showed that a
117 second member of CYP94 family, CYP94C1, was the major actor involved in this latter
118 reaction (Heitz *et al.* 2012). We also elucidated a second catabolic pathway of JA-Ile,
119 proceeding through cleavage of the JA-Ile conjugate by the amido-hydrolases IAR3 and
120 ILL6 (Widemann *et al.* 2013). So far, role of JA-Ile has focused the majority of researche
121 efforts, however it is likely that other Jasmonoyl-Amino acids are additional actors in
122 hormonal regulation. This gets support from results obtained by Staswick and Tiryaki
123 (2004) who first characterized JAR1 enzymatic activity. They demonstrated that this
124 enzyme is able to conjugate, with varying efficiency *in vitro*, about half of the existing
125 amino acids to jasmonic acid. These conjugates have not all been detected in *Arabidopsis*
126 likely because they might be present in very specific organs, development stage or
127 environmental conditions. Jasmonoyl-Tryptophan has been described as an auxin inhibitor
128 (Staswick, 2009) illustrating fundamental role of such conjugates. Very recently, Kitaoka *et*
129 *al.* (2014) reported capabilities of CYP94B3 to catalyse, *in vitro*, hydroxylation of
130 Jasmonoyl-Phenylalanine and -Valine.

131 We describe here the metabolism of Jasmonoyl-Phenylalanine (JA-Phe), the most
132 abundant Jasmonoyl-Amino acid conjugate present in *Arabidopsis thaliana* seedlings after
133 JA-Ile (Staswick and Teryaki, 2004). After heterologous expression in yeast, we
134 investigated *in vitro*, the catalytic capabilities of 3 members of the CYP94 family to oxidize
135 JA-Phe. Our results show that this conjugate is differently metabolized by CYP94B1,
136 CYP94B3 and CYP94C1. We demonstrate accumulation of JA-Phe and its oxidized forms

137 in wounded leaves. We showed that *Botrytis cinerea* infection of Arabidopsis also leads to
138 JA-Phe accumulation in leaves and that JA-Phe is present in developed flowers. Over-
139 expressor and KO lines were used to assess the role of CYP94s *in planta* and we confirmed
140 distinct key roles of these enzymes in the maintenance of JA-Phe balance. We further show
141 that CYP94-mediated oxidation of JA-Ile and JA-Phe generates the aldehyde forms of the
142 conjugates and that 12COH-JA-Ile is accumulated in wounded leaves. We discuss the
143 possible biological significance of the multiple oxidation steps of Jasmonoyl-Amino acids
144 and we hypothesise that due to an unusual low substrate specificity, members of CYP94
145 family might be involved in the general metabolism of jasmonates leading to hormonal
146 control.
147

148 **METHODS:**

149

150

151 **Cloning of CYP94C1, CYP94B3 and CYP94B1.**

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

164

165

166 **Heterologous expression of CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 in yeast.**

167

168 CYP94C1, CYP94B1 and CYP94B3 were produced in a yeast optimized
169 heterologous system as described in Heitz *et al.* 2012. Coding sequences were introduced
170 into *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 strain. Yeast has only three cytochromes P450,
171 which are expressed at a negligible level under growth condition used. Yeast cultures were
172 grown and cytochrome P450 expression was induced as described in (Pompon *et al.* 1996).
173 Then cells were harvested by centrifugation and manually broken with glass beads (0.45 mm
174 diameter) in a buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 600 mM sorbitol). The
175 homogenate was centrifuged for 10 min at 10,000 *g*. The resulting supernatant was
176 centrifuged for 1 h at 100,000 *g*. The pellet consisting of microsomal membranes was
177 resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, and 30% (v/v) glycerol with a
178 Potter-Elvehjem homogenizer and stored at -30 °C. All procedures for microsomal
179 preparation were carried out at 0-4 °C. The total protein content in the microsomes was
180 estimated by the Bradford method.

181

182

183 **Enzyme activities.**

184

185 Chemical synthesis of amine conjugates of jasmonic acid was achieved by
186 condensation of (3R, 7R/ 3S, 7S)-JA with Phenylalanine or Isoleucine according to the
187 reported method (Kramell *et al.* 1988; Kramell *et al.* 1996; Kramell *et al.* 1997; Kramell
188 *et al.* 1999). Physical data are in accordance with those reported (Kramell *et al.* 1988; Kramell
189 *et al.* 1996; Kramell *et al.* 1997; Kramell *et al.* 1999). **R,R -JA-Phe: ¹H NMR** (CDCl₃, 300

190 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),
191 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,
192 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-
193 1.48 (m, 1H), 0.94 (t, 3H, J =7.5 Hz) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 219.6, 174.7,
194 168.3, 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,
195 21.0, 14.5 ppm. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc: 380.1832; found: 380.1846. **S,S-JA-Phe: ^1H**
196 **NMR** (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.24-7.31 (m, 3H), 7.14-7.17 (m, 2H), 6.16 (d, 1H, J =6.1 Hz),
197 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),
198 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
199 (m, 4H), 1.78-1.86 (m, 1H), 1.31-1.43 (m, 1H), 0.94 (t, 3H, J =7.5 Hz) ppm. ^{13}C NMR
200 (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 219.9, 175.1, 171.7, 136.3, 134.4, 129.7, 128.9, 127.5, 125.3, 54.4,
201 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:
202 380.1832; found: 380.1846. For determination of enzyme activities, the incubation medium
203 (0.1 ml) contained 0.4 mg of microsomal proteins from transformed yeast in 20 mM sodium
204 phosphate (pH 7.4), 1 mM NADPH and the substrate JA-Ile or JA-Phe (100 μM). The
205 reaction was initiated by the addition of NADPH and after 20 min at 27°C, was stopped by
206 the addition of 200 μl of acetonitrile containing 0.2 % acetic acid. The mixture was
207 centrifuged for 10 min at 2000 g, and the supernatant was cleared by filtration through a
208 0.22- μm filter. Metabolites in incubations media were directly analyzed by UPLC-MS/MS.
209
210

211 **Plant material and treatment.**

212 *Arabidopsis thaliana* genotypes, all in the Col0 ecotype were grown under a 12 h/12
213 h photoperiod in a growth chamber regulated at 21°C. T-DNA insertion lines used were:
214 *cyp94c1* (SALK_55455) and *cyp94b3* (CS302217), all obtained from the Nottingham
215 Arabidopsis Stock Center (NASC). The double mutant *cyp94b3c1* was obtained by crossing
216 single mutants. Overexpressing lines were generated by cloning the *CYP94C1* or the
217 *CYP94B3* ORF successively in the Gateway (Invitrogen) vectors pDONR207 and pB7WG2
218 downstream of the CaMV 35S promoter. Binary vector constructs were transferred to
219 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 and introduced by floral dip transformation into
220 WT plants. T3 homozygous plants were used in all experiments. For wounding experiment,
221 between 5 and 7 fully expanded leaves of 6-7-week-old plants were wounded 3 times across
222 the midvein with a hemostat. Leaves were harvested at different time post-wounding and
223 quickly flash-frozen in liquid nitrogen before storing at -80 °C until jasmonates extraction.
224 Leaves of unwounded plants were also collected as a control. *Botrytis cinerea* infection was
225 performed as described in La Camera *et al.* (2009). The jasmonates extraction solvent,
226 consisting of ice-cold 90% methanol containing 9,10-dihydro-JA-Ile as an internal standard,
227 was added to frozen leaf powder (130–150 mg fresh weight preweighed) in a tube
228 containing glass beads. The proportion respected was 750 μl of extraction solvent for 150
229 mg leaves fresh weight. The material was ground twice for 30 s with a Precellys 24 tissue
230 homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-Le-Bretonneux, France) and homogenized on
231 a rotary agitator (25 minutes, 4°C). Homogenates were cleared by centrifugation at 18,000 g
232 and supernatants were concentrated under nitrogen flux before one night at -30°C. A last

233 centrifugation at 18,000 g removed precipitates and supernatants were saved for UPLC-
234 MS/MS analysis.

235

236

237 **Jasmonates profiling.**

238

239 Jasmonates profiling was achieved as previously described (Heitz *et al.* 2012).
240 Briefly, the relative quantification in samples was achieved by reporting MS peak areas
241 relative to internal standard peak area and mass of biological material. Absolute
242 quantifications of JA-Ile, 12OH-JA-Ile, 12COOH-JA-Ile and JA-Phe were determined by
243 comparison of sample signal with dose-response curves established with pure compounds.
244 All analyses were performed using a Waters Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA
245 USA) equipped with an electrospray ionisation source (ESI) and coupled to an Acquity
246 UPLC system (Waters, USA). Chromatographic separation was achieved using an Acquity
247 UPLC BEH C₁₈ column (100 x 2.1 mm, 1.7 µm; Waters) and pre-column. The mobile phase
248 consisted of (A) water and (B) methanol, both containing 0.1 % formic acid. The run started
249 by 2 min of 95% A, then a linear gradient was applied to reach 100% B at 12 min, followed
250 by isocratic run using B during 2 min. Return to initial conditions was achieved in 3 min,
251 with a total run time of 17 min. The column was operated at 35°C with a flow-rate of 0.35
252 ml/min, injecting 3 µl samples. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. The
253 nebulizer gas flow was set to 50 l/h, and the desolvation gas flow to 900 l/h. The interface
254 temperature was set to 400°C and the source temperature to 135°C. The capillary voltage
255 was set to 3.2 kV and the cone voltage to 25 V, the ionization was in positive or negative
256 mode. Low mass and high mass resolution were 14 for the first mass analyzer and 13 for the
257 second, ion energies 1 and 2 were 0.6 V, entrance and exit potential were 2 V and detector
258 (multiplier) gain was 650 V. Data acquisition and analysis were performed with the
259 MassLynx software (Waters, Mildorf, MA). The transitions, at different collision energy
260 (ce) were in negative mode: 12OH-JA-Ile 338>130 (ce=23eV); 12COOH-JA-Ile 352>130
261 (ce=23eV); and in positive mode : JA-Ile 324>151 (ce=20eV); 9,10-dihydro-JA-Ile 326>280
262 (ce=24eV); JA-Phe 358>119 (ce=32eV); 12COH-JA-Ile 338>132 (ce=16eV); 12OH-JA-Phe
263 374>120 (ce= 28eV); 12COH-JA-Phe 372>166 (ce=14); 12COOH-JA-Phe 388>120
264 (ce=35). For identification of 12COH-JA-Ile and 12COH-JA-Phe, samples were derivatized
265 with methoxyamine hydrochloride, a reagent known to target carbonyl groups (Halket *et al.*
266 2005).

267

268

269 **RESULTS**

270

271 **Metabolization of JA-Phe by CYP94C1, aldehyde derivatives formation.**

272

273 In a previous report we showed that CYP94B3 and CYP94C1 define a major
274 pathway for oxidative catabolism of the plant hormone JA-Ile (Heitz *et al.* 2012). Presence
275 in *Arabidopsis* seedlings of another Jasmonoyl-Amino acid, JA-Phe, was established during
276 the characterization of conjugating enzyme JAR1 (Staswick and Tiryaki, 2004). To first test
277 the catalytic capabilities of CYP94C1 toward JA-Phe, we performed incubations of this
278 potential substrate with microsomes of recombinant yeast expressing CYP94C1. Incubation
279 media were extracted, residual substrate and metabolites were resolved by LC-MS/MS
280 analysis (Fig. 1A-D). Based on their detection in multiple reaction monitoring we identified
281 12OH-JA-Phe (Fig. 1B and Fig. 2) and the corresponding carboxyl 12COOH-JA-Phe (Fig.
282 1D and Fig. 2). Unexpectedly, we detected the formation of a compound that had the
283 characteristics of the aldehyde 12CHO-JA-Phe (Fig. 1C and Fig. 2) identified by using a
284 methoxyamidation derivatization procedure (see Methods). None of these metabolites were
285 formed in absence of cytochrome P450 required cofactor NADPH (Fig. 1 F-H) or in
286 incubations performed with microsomes of yeast transformed with a void plasmid (Fig. 1J-
287 L), ensuring that they originate from enzymatic reaction catalysed by CYP94C1.

288 When we previously put in light the ability of CYP94C1 to produce 12OH-JA-Ile
289 and 12COOH-JA-Ile (Heitz *et al.* 2012), we did not investigate the aldehyde 12COH-JA-Ile
290 formation (Fig. 3D). To do so, in the present work we incubated microsomes of yeast
291 expressing CYP94C1 with JA-Ile and conducted LC-MS/MS analysis to assess or not
292 production of 12COH-JA-Ile (Fig. 3D). It was indeed formed and identified based on its
293 detection in multiple reaction monitoring (Fig. 3A). It was not produced in the absence of
294 NADPH (Fig. 3B) or in incubation with microsomes of yeast transformed with a void
295 plasmid (Fig. 3C).

296

297

298 **Catalytic capabilities of CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1.**

299

300 In *Arabidopsis* the CYP94 family contains 6 members distributed in 3 subfamilies:
301 CYP94B1, CYP94B2, CYP94B3, CYP94C1, CYP94D1 and CYP94D2. Two of them,
302 CYP94C1 and CYP94B3 are strongly induced at the transcriptional level upon wounding,
303 CYP94B1 being also induced but to a lower extend (Heitz *et al.* 2012). Incubations with
304 JA-Phe and JA-Ile were performed with microsomes of yeast expressing each wound
305 inducible CYP94. LC-MS/MS analysis were run to monitor metabolite production and to
306 determine the ratio of hydroxyl, aldehyde and carboxyl form for each substrate/enzyme
307 combination. As shown in Figure 4, CYP94B1 exhibiting the lower induction upon
308 wounding produced, *in vitro*, hydroxyl derivative of JA-Phe (Fig. 4A) and JA-Ile (Fig. 4B).
309 The aldehyde derivatives of JA-Phe (Fig 4A) and JA-Ile (Fig. 4B) were also detected but at
310 a level close to the background. If aldehyde and carboxyl derivatives of both JA-Phe (Fig.
311 4A) and JA-Ile (Fig. 4B) were detected in incubations with CYP94B3, this enzyme
312 produced mainly the hydroxyl derivative (Fig. 4A and Fig. 4B). In contrast, incubations with

313 CYP94C1 showed a higher production of aldehyde and carboxyl of JA-Phe and JA-Ile (Fig.
314 4A and Fig. 4B).

315

316

317

318

319

320 **Accumulation of JA-Phe, JA-Ile and their oxidized derivatives after leaf wounding.**

321

322 We investigated if JA-Phe and its oxidized derivatives accumulated post-wounding
323 as previously shown for JA-Ile (Heitz *et al.* 2012). Mechanical damage was inflicted with
324 forceps mimicking attacks by herbivores. Leaves were harvested at different times post-
325 wounding and extracted for jasmonates content determination by LC-MS/MS analysis. As
326 shown in Figure 5A, JA-Phe accumulated immediately and steadily after wounding and rose
327 all along the time course until 4 h post-wounding. This pattern is slightly different from the
328 one of JA-Ile which reached a maximum 1 h post-wounding before decreasing (Fig. 5B).
329 Production of these two Jasmonoyl-Amino acids also differs in terms of quantity. JA-Ile
330 being 2 orders of magnitude more abundant than JA-Phe (Fig. 5A, B). One hour post-
331 wounding, 12OH-JA-Phe (Fig. 5C) and 12COOH-JA-Phe (Fig. 5G) started to accumulate.
332 For JA-Ile derivatives in addition to expected 12OH-JA-Ile (Fig. 5D) and 12COOH-JA-Ile
333 (Fig. 5H) we also observed accumulation of 12COH-JA-Ile (Fig. 5F). The corresponding
334 aldehyde of JA-Phe remained just above background level (Fig. 5E).

335

336

337 ***In vivo* roles of CYP94B3 and CYP94C1 in oxidized derivatives of JA-Phe and JA-Ile**
338 **production.**

339

340 After finding that CYP94B3 and CYP94C1 were able to produce, *in vitro*, oxidized
341 derivatives of JA-Phe, experiments were conducted to assess their *in vivo* role in this
342 metabolic pathway. Similarly to the experiment described in Figure 5, we wounded WT
343 plants along with a series of mutants: *cyp94c1* and *cyp94b3* single mutants carrying a T-
344 DNA insertion, *cyp94b3c1* double mutant and two mutants over-expressing either *CYP94C1*
345 or *CYP94B3* under the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Compared to WT plants, the
346 level of 12OH-JA-Phe was drastically reduced in *cyp94b3* and not affected in *cyp94c1* (Fig.
347 6A). This corroborates results of *in vitro* experiments (Fig. 4) showing that CYP94B3
348 mainly produces 12OH-JA-Phe whereas CYP94C1 is more dedicated to aldehyde and
349 carboxyl formation. The minor role of CYP94C1 in 12OH-JA-Phe accumulation also gets
350 support from the measured level of this compound which is similar in *cyp94b3c1* and
351 *cyp94b3* (Fig. 6A). The lower level of 12OH-JA-Phe measured in both over expressing
352 mutants compared to WT plants is correlated with a concomitant increase in 12COOH-JA-
353 Phe (Fig. 7C). This hypothesis gets support from Figure 6B which shows that the level of
354 12COOH-JA-Phe is higher in over expressing *CYP94C1* than in WT plants. While
355 CYP94C1 overexpression is sufficient on its own to catalyze full oxidation of JA-Phe to
356 COOH-JA-Phe, a similar excess of 12COOH-JA-Phe in CYP94B3 overexpressor may arise

357 from oxidation by CYP94C1 of an excess of 12OH-JA-Phe produced by CYP94B3. As
358 expected, mutants lacking CYP94C1 (*cyp94c1* and *cyp94b3c1*) accumulated less 12COOH-
359 JA-Phe than WT plants (Fig. 6 A, B).

360 We also monitored post-wounding accumulation of 12COH-JA-Ile levels *in planta* to
361 investigate involvement of CYP94B3 and CYP94C1 in its formation. This led to
362 accumulation of aldehyde up to 4 h post-wounding in WT plants (Fig. 7B). Its formation
363 was almost abolished in both *cyp94b3* and *cyp94b3c1* mutants (Fig. 7B). This, together with
364 the fact that formation of 12OH-JA-Ile is drastically affected in these mutants (Fig. 7A),
365 suggests that the aldehyde formed *in vivo* mainly originates from 12OH-JA-Ile produced by
366 CYP94B3. *In vitro* experiment illustrated in Figure 4 showed that CYP94C1 is the main
367 actor in aldehyde production. However *cyp94c1* retains 70% of the WT plants aldehyde
368 level (Fig. 7B), it is likely that even if CYP94B3 produced much less aldehyde than
369 CYP94C1 *in vitro* (Fig. 4B), *in vivo*, its activity is sufficient to provide the main pool of
370 12OH-JA-Ile precursor. Both mutants over expressing *CYP94B3* or *CYP94C1* contained less
371 aldehyde than WT plants. This might be explained by its further oxidation into 12COOH-
372 JA-Ile.

373

374

375 **JA-Phe accumulates during infection by *Botrytis cinerea* and in developed flowers.**

376

377 We then analyzed two other physiological models where jasmonates metabolism and
378 signalling are known to occur, namely infection with a necrotrophic fungus and flower
379 development. Leaves were harvested 2 and 3 days post-infection and extracted for JA-Phe
380 content determination by LC-MS/MS analysis. Non infected leaves were used as a control.
381 As shown on Figure 8, this Jasmonoyl which is barely detectable in non infected leaves is
382 detected 2 days post-infection and its accumulation increases at least until 3 days post-
383 infection. We also detected JA-Phe in developed flowers during normal development at the
384 level of *ca.* 15 pmol/g FW corresponding to the amount detected in wounded leaves.

385

386

387 **DISCUSSION**

388

389 The understanding of the strategies used by plants to survive in hostile environment
390 after land colonisation *ca.* 400 million years ago, has always represented a very exciting and
391 challenging task for biologists. During the last two decades, a tremendous effort focused on
392 P450 studies was devoted to this task.

393 In a single plant species, presence of multiple P450s exhibiting wide array of
394 catalytic capabilities allows the synthesis of a vast number of secondary metabolites
395 required for adaptation. Synthesis of precursors of structural polymers such as cutin, suberin
396 and sporopollenin which form protective envelopes of plants by members of CYP86,
397 CYP77 and CYP703 might represent the best illustration of the fundamental role of P450s in
398 resistance to stress and adaptation (Pinot and Beisson, 2011). Besides protective envelopes,
399 hormonal control is of primary importance in these events. In this context, P450s also have a
400 crucial role to play and they have been shown to be involved in synthesis and catabolism of
401 major hormones (Mizutani and Ohta, 2010). Involvement of at least 10 P450s belonging to 5
402 distinct subfamilies in metabolism of brassinosteroid in *Arabidopsis* is a good example of the
403 key role of P450s in maintenance of hormone homeostasis (Mizutani and Ohta, 2010)

404 Among hormones, jasmonates mainly act in plant defence and plant development
405 (Wasternack and Hause, 2013). They all originate from jasmonic acid which biosynthesis,
406 properties and mechanism of action have been extensively studied (Wasternack and Hause,
407 2013). On the contrary their catabolism and inactivation remain to be unravelled. In a
408 previous report (Kandel *et al.* 2007) we highlighted the abilities of CYP94C1 to catalyse the
409 complete oxidation of a methyl to a carboxyl function on linear fatty acids. This made this
410 enzyme a good candidate to test for the production of 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile
411 that had been described in *Arabidopsis* (Glauser *et al.* 2008). Indeed, biochemical and
412 genetic approaches demonstrated involvement of CYP94C1 in the production of these
413 compounds (Heitz *et al.* 2012). In the course of JAR1 characterization, Staswick and Tiryaki
414 (2004) detected the presence of JA-Phe in *Arabidopsis* seedlings. The biological function of
415 this compound is still unknown. Using a root growth inhibition assay, Fonseca *et al.* (2009)
416 showed that it can activate the JA pathway in *Arabidopsis*. In rice, it is a strong elicitor of
417 the phytoalexin sakuranetin synthesis through induction of naringenin 7-O-
418 methyltransferase (Tamogami *et al.* 1997). The wound-induced accumulation of JA-Phe that
419 we describe here is also consistent with a role as key jasmonate molecule. Time course of
420 post-wounding accumulation of JA-Phe is slightly different from the one of JA-Ile
421 suggesting distinct roles in the context of stress response. Accumulation of JA-Phe observed
422 after *Botrytis* infection (Fig. 8) gives a potential role to this jasmonoyl in response to
423 pathogens. *In vitro*, recombinant GST-JAR1 can conjugate JA to Phe, however in *jar1*
424 alleles, JA-Phe was not negatively affected and was even more abundant than in WT
425 *Arabidopsis* (Staswick and Tiryaki, 2004). This suggests existence of at least another JA-
426 conjugating enzyme which would confirm biological importance of JA-Phe.

427 Production of *Arabidopsis* mutants altered in JA-Phe metabolism could be of great
428 help to explore importance of this derivative. This first requires identification of enzymes
429 involved in its metabolism. Based on our previous work (Heitz *et al.*, 2012) and on a recent
430 report by Kitaoka *et al.* (2014), we explored the capacity of three members of the CYP94

431 family to metabolize JA-Phe. Its accumulation after wounding led us to test catalytic
432 capacities toward this compound, of CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 all shown to be
433 strongly induced post-wounding at the transcriptional level (Heitz *et al.* 2012). Our results
434 show that *in vitro*, all three enzymes can hydroxylate JA-Phe but carboxylation occurs only
435 with CYP94B3 and CYP94C1. Detailed analysis showed that CYP94B1 and CYP94B3 are
436 mainly involved in the hydroxylation step when formation of aldehyde and subsequent
437 carboxylation are taken in charge by CYP94C1. Metabolic investigations with KO and
438 overexpressing lines of *Arabidopsis* perturbed in expression of *CYP94B3* and *CYP94C1*
439 corroborate these results.

440 As mentioned above, P450s implication in plant hormone homeostasis is well
441 documented (Mizutani and Ohta, 2010). In some cases, a simple hydroxylation of the active
442 hormone is sufficient to suppress its biological effect: CYP707A2 catalyses 8-hydroxylation
443 of abscisic acid which is the pivotal point of control of seed dormancy, and over expression
444 of CYP707A2 in *Arabidopsis* results in shortening after-ripening period to overcome
445 dormancy (Millar *et al.* 2006). Inactivation of brassinosteroid activities after hydroxylation
446 on C26 position by CYP734A1 in *Arabidopsis* also shows impact of this oxidation (Turk *et*
447 *al.* 2005). In the jasmonate pathway, the fact that *Arabidopsis* evolved P450s specialized
448 either in hydroxylation or in carboxylation suggests that these conversions do not represent
449 exclusively catabolism and that intermediates could retain some activities. If biological
450 function and mode of action for JA-Phe remain to be established, different works shed light
451 on JA-Ile mode of action. Molecular cloning and docking simulation showed that pentenyl
452 side chain of JA-Ile interacts with a hydrophobic pocket of COI1 *via* van der Waals bonds
453 (Wasternack and Kombrink 2010). It can be postulated that hydroxylation of JA-Ile only
454 modulates level of interaction without complete abolition. This hypothesis gets support
455 from results obtained by Koo *et al.* (2011) showing that 12OH-JA-Ile is less efficient than
456 JA-Ile but can still promote COI1-JAZ3 interaction. This shows that in the case of JA-Ile the
457 effect of hydroxylation step on biological activity seems to be less drastic than for abscisic
458 acid or brassinosteroids. During characterization of amido-hydrolases implicated in JA-Ile
459 turn over, we showed that unlike the 12COOH-JA-Ile, the 12OH-JA-Ile was hydrolyzed by
460 IAR3 and ILL6 suggesting that the carboxyl derivative was an ultimate metabolite and that
461 hydrolyse of the hydroxyl derivative could correspond to a second way of deactivation. In
462 this context, it is interesting to note that Kitaoka *et al.* (2014) described 12-O-B-
463 glucopyranyl-jasmonoyl-L-isoleucine in *Arabidopsis* which formation also could represent a
464 deactivation step. Presence of 12-hydroxyjasmonic acid glucosylated on the hydroxyl
465 function has been described in different plants (Miersch *et al.* 2007) and the first enzyme
466 capable of performing this reaction has been purified in *Oryza sativa* and has been shown to
467 be induced at the transcriptional level after wounding (Seto *et al.* 2009).

468 Complete oxidation of a methyl to a carboxyl occurs via formation of hydroxyl and
469 aldehyde intermediates. Schneider *et al.* (1999) showed that the bacterial cytochrome P450
470 BM-3 catalysed this reaction and proposed that in the pathway leading from hydroxyl to
471 carboxyl, the enzyme hydroxylates the carbon already carrying a hydroxyl group. The
472 resulting gem-diol intermediate, well documented in reactions catalysed by P450s,
473 especially in the pathway of steroid metabolism (Reviewed in Scheller *et al.* 1998) will then
474 rearrange to aldehyde and carboxyl. Chemical properties and instability make aldehydes

475 difficult to identify. We developed an analytical method which allowed us to assess the *in*
476 *vitro* formation of 12COH-JA-Phe and 12COH-JA-Ile by members of the CYP94 family.
477 Interestingly, we showed that 12COH-JA-Ile accumulates post-wounding (Fig 7B). This is
478 the first *in planta* report of an aldehyde derivative of a jasmonate. Contrary to its hydroxyl
479 precursor, there is no description so far of a biological effect of this compound. In the
480 context of plant stress, it is noteworthy that being electrophile, the aldehyde functional
481 group represents a target for nucleophilic addition and can interact with amino groups of
482 lysine and arginine. Schaunstein *et al.* (1977) demonstrated the implication of aldehydes in
483 cross-linkage of protein and in interference with protein synthesis.

484 Reactions catalysed by P450s are irreversible and thermodynamically disfavoured
485 (Schlichting *et al.* 2000). To circumvent this problem, plants have evolved P450s
486 characterized by a high substrate specificity, where the substrate has to be tightly fixed in
487 the active site allowing positioning of the targeted atom of substrate right next to the ferryl-
488 oxo moiety of P450. This substrate specificity is well illustrated by P450s involved in
489 brassinosteroid pathways (Mizutani and Ohta, 2010; Nomura and Bishop, 2006):
490 *Arabidopsis* possess *ca.* 10 distinct P450s catalysing reactions on almost identical substrates,
491 *i.e.* CYP90B1 catalyses C22-hydroxylation of campesterol and CYP90D1 catalyses C23-
492 hydroxylation of 6-deoxy campesterol. Results obtained when we first characterized
493 CYP94C1 suggested that the active site of this enzyme had an unusual relaxed conformation
494 because it could accommodate aliphatic substrates with chain length ranging from C12 to
495 C18 with various number of unsaturations (Kandel *et al.* 2007). The present work confirms
496 that members of CYP94 family, characterized so far, exhibit a substrate specificity lower
497 than what is usually observed for P450s in general. This hypothesis also gets support from
498 the work of Kitaoka *et al.* (2014) who showed that CYP94B3 hydroxylates JA-Ile and JA-
499 Phe as well as JA-Leu and JA-Val. It first could be assumed that only the JA moiety of the
500 molecule is important for activity, but the fact that free JA is not metabolized by CYP94C1
501 and CYP94B3 (Heitz *et al.* 2012) shows that conjugation to an amino acid is required for
502 catalytic activity. JAs other than those studied in this work possess distinct properties:
503 Jasmonoyl-Tryptophan can act as an auxin inhibitor (Staswick, 2009), *cis*-jasmon and
504 OPDA exhibit properties different from the ones of JA (reviewed in Miersch *et al.* 2007).
505 Many molecules belonging to the jasmonate family have already been described
506 (Wasternack and Hause, 2013) and it is likely that many others remain to be discovered. It
507 can be postulated that *Arabidopsis* evolved members of the CYP94 family with an unusual
508 wide substrate specificity in order to be able to metabolize many derivatives with a limited
509 number of P450s. In this context it can be mentioned that neither catalytic activity nor
510 biological functions have been attributed to CYP94D1 and CYP94D2. Their involvement in
511 the metabolism of unknown jasmonates could be a working hypothesis.

512 In the context of plant resistance, importance of P450s metabolizing conjugated
513 amino acids or free amino acids is not restricted to Jasmonoyl-Amino acids. Plants produce
514 in response to elicitors present in the oral secretion of herbivores volatile chemicals that
515 attract predators of the herbivores. Volicitin is a major elicitor present in the oral secretion
516 of caterpillar (Lait *et al.* 2003). This molecule consists in an ω -1 hydroxyl of linolenic acid
517 linked to L-glutamine. Paré *et al.* (1998) suggested that hydroxylation occurred within the
518 caterpillar but it is conceivable that metabolites produced by members of CYP709 family

519 (Kandel *et al.* 2005) have eliciting properties. Aldoximes are precursors of defence
520 compounds and are produced via amino acid oxidation performed by members of the
521 CYP79 family (Hamberger and Bak, 2013). Contrary to Jasmonoyl-Amino acids or to
522 volicitin, for aldoximes formation, oxidation occurs on the amino acid. Presence of amido
523 hydrolase in *Populus trichocarpa* remains to be established but interestingly, in this species
524 formation of aromatic nitrogenous volatiles results from oxidation by CYP79D6 and
525 CYP79D7 of L-Phe that could be released from JA-Phe (Irmisch *et al.* 2013).

526 Conjugates of amino acids with hormones or with lipids derivatives are also present
527 in bacteria (Roberto *et al.*, 1990) as well as in animals (Salmon and Higgs, 1987). In the
528 latter ones they are mainly represented by leukotrienes which are inflammatory mediators
529 resulting from the conjugation between a derivative of arachidonic acid and different amino
530 acids (i.e. cystein, glycin, glutamic acid). P450s also play a role in leukotriene inactivation
531 (Selhgal *et al.* 2011). It is noteworthy that arachidonic acid is the precursor of prostaglandins
532 equivalent to jasmonic acid in plants. These conjugates are conserved in organisms as
533 different as plants, bacteria and animals, suggesting they have fundamental and essential
534 functions. Now we have in our hands, biochemical, molecular and genetic tools to continue
535 to unravel the physiological meaning of these signal molecules and P450s metabolizing
536 them in plants.

537

538

539 REFERENCES

540

541 Acosta I.F. & Farmer E.E. (2010) Jasmonates. *The Arabidopsis Book* 8: e0129.
542 <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0129>.

543 Benveniste I., Bronner R., Wang Y., Compagnon V., Michler P., Schreiber L., Salatiin J-P., Durst F. & Pinot F.
544 (2005) CYP94A1 a plant cytochrome P450-catalyzing fatty acid ω -hydroxylase is selectively induced by
545 chemical stress in *Vicia sativa* seedlings. *Planta* 221, 881-890.

546 Benveniste I., Tijet N., Adas F., Philipps G., Salatiin J-P. & Durst F. (1998) CYP86A1 from *Arabidopsis*
547 *thaliana* encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res.*
548 *Commun.* 243, 688-693.

549 Coon M. J. (2005) Cytochrome P450: Nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol.*
550 *Toxicol.* 45, 1-25.

551
552 Depuydt S. & Hardtke C.S. (2011) Hormone signaling cross-talk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21,
553 373-375.

554 Durst F. & O'Keefe D.P. (1995) Plant cytochromes P450: an overview. *Drug Metabolism and Drug*
555 *Interactions* 12, 171-206.

556
557 Fonseca S., Chico J.M. & Solano R. (2009) The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core
558 signalling molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 539-547.

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

561
562 Glauser G., Grata E., Dubugnon L., Rudaz S., Farmer E.E. & Wolfender J.L. (2008) Spatial and temporal
563 dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J. Biol. Chem.*
564 283, 16400-16407.

565 Halket J. M., Watermann D., Przyborowska A., Patel R. K. P., Fraser P. D. & Bramley P. M. (2005). Chemical
566 derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.* **56**,
567 219-243.

568
569 Hamann T. & Moller B.L. (2007). Improved cloning and expression of cytochrome P450s
570 and cytochrome P450 reductase in yeast. *Protein Expr. Purif.* **56**, 121-127.

571 Hamberger B. & Bak S. (2013) Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical
572 diversity. *Phil. Trans. R. Soc. B* **368**, 20120426.

573
574 Heitz T., Widemann E., Lugan R., Miesch L., Ullmann P., Désaubry L., Holder E., Grausem B., Kandel S.,
575 Miesch M., Werck-Reichhart D. & Pinot F. (2012) Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two
576 successive oxidation steps of the plant hormone jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *J. Biol. Chem.*
577 **287**, 6296-6306.

578 Irmisch S., McCormick A.C., Boeckler G.A., Schmidt A., Reichelt M., Schneider B., Block K., Schnitzler J.P.,
579 Gershenzon J., Unsicker S.B., Köllner T.G. (2013) Two herbivore-induced cytochrome P450 enzymes
580 CYP79D6 and CYP79D7 catalyze the formation of volatile aldoximes involved in poplar defense. *Plant Cell*
581 **25**, 4737-4754.

582
583 Kandel S., Morant M., Benveniste I., Blée E., Werck-Reichhart D. & Pinot F. (2005). Cloning functional
584 expression and characterization of CYP709C1 the first sub-terminal hydroxylase of long chain fatty acid in
585 plant. Induction by chemicals and methyl jasmonate. *J. Biol. Chem* **280**, 35881-35889.

586 Kandel S., Sauveplane V., Compagnon V., Franke R., Millet Y., Schreiber L., Werck-Reichhart D. & Pinot F.
587 (2007). Characterization of a methyl jasmonate and wounding responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis*
588 *thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation *in vitro*. *FEBS J.* **274**, 5116-5127.

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

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

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

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

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

601 Kramell R., Schneider G. & Miersch O. (1996) Resolution of Racemic Jasmonic Acid and Abscisic Acid by
602 Chiral High Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis* **7**, 209-212.

603 Kramell R., Schneider G. & Miersch O. (1997) Chiral Separation of Amide Conjugates of Jasmonic Acid by
604 Liquid Chromatography. *Chromatographia* **45**, 104-108.

605 Kramell R., Miersch O., Schneider G. & Wasternack C. (1999) Liquid Chromatography of Jasmonic Acid
606 Amine Conjugates. *Chromatographia* **49**, 42-46.

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

610
611 Lait C.G., Albom H.T., Teal P.E. & Tumlinson J.H. (2003) Rapid biosynthesis of N-linolenoyl-L-glutamine,
612 an elicitor of plant volatiles, by membrane-associated enzyme(s) in *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
613 **100**, 7027-7032.

614

- 615 Miersch O., Neumerkel J., Dippe M., Stenzel I. & Wasternack C (2007) Hydroxylated jasmonates are
616 commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling.
617 *New Phytol.* **177**, 114-127.
- 618 Millar A.A., Jacobsen J.V., Ross J.J., Helliwell C.A., Poole A.T., Scofield G., Reid J.B. & Gubler F. (2006)
619 Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.* **45**,
620 942-954.
- 621 Mizutani M. & Ohta D. (2010) Diversification of P450 Genes during land plant evolution. *Annu. Rev. Plant*
622 *Biol.* **61**, 291-315.
623
- 624 Nebert D.W., Wikvall K. & Miller W.L. (2013) Human cytochromes P450 in health and disease. *Phil. Trans.*
625 *R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, 20120426.
626
- 627 Nelson D. (2006) Plant cytochrome P450s from moss to poplar. *Phytochem. Rev.* **5**, 193-204.
- 628 Nelson D. & Werck-Reichhart D. (2011) A P450-centric view of plant evolution. *Plant J.* **66**, 194-211.
629
- 630 Nomura T. & Bishop G.J. (2006) Cytochrome P450s in plant steroid hormone synthesis and metabolism.
631 *Phytochem. Rev.* **5**, 421-432.
- 632 Paré P.W., Alborn H.T. & Tumlinson J.H (1998) Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles.
633 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13971-13975.
634
- 635 Pinot F. & Beisson F. (2011) Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and
636 physiological roles. *FEBS J.* **278**, 195-205.
- 637 Pinot F., Benveniste I., Salatin J-P. & Durst F. (1998) Methyl jasmonate induces lauric acid ω -hydroxylase
638 activity and accumulation of CYP94A1 transcripts but does not affect epoxide hydrolase activities in *Vicia*
639 *sativa* seedling. *Plant Physiol.* **118**, 1481-1486.
- 640 Pompon D., Louerat B., Bronine A. & Urban P. (1996) Yeast expression of Animal and Plant P450s in
641 Optimized Redox Environments. *Methods in Enzymology* **272**, 51-64.
- 642 Roberto F.F., Klee H., White F., Nordeen R., & Kosuge T. (1990) Expression and fine structure of the gene
643 encoding N epsilon-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase from *Pseudomonas savastanoi*. *Proc. Natl. Acad.*
644 *Sci. USA* **87**, 5797-5801.
645
- 646 Salmon J.A. & Higgs G.A. (1987) Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.*
647 **43**, 285-296.
648
- 649 Santer A & Estelle M. (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* **459**,
650 1071-1078.
- 651 Schaunstein E., Esterbauer H. & Zollner H. (1977) Saturated aldehydes. In: JR Lagando (ed) Aldehydes in
652 biological systems. Methuen, New York, pp. 1-24.
- 653 Scheller U., Zimmer T., Becher D. Schauer F. & Schunck, W-H. (1998) Oxygenation cascade in conversion of
654 n-alkanes to α,ω -dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.* **273**, 32528-32534.
- 655 Schlichting I., Berendzen J., Chu K., Stock A.M., Maves S.A., Benson D.E., Sweet R.M., Ringe D., Petsko
656 G.A. & Sligar S.G. (2000) The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Nature* **287**,
657 1615-1622.
- 658 Schneider S., Wubbolts M.G., Sanglard D. & Withold B. (1999) Production of alkanedioic acids by
659 cytochrome P450_{BM-3} monooxygenase: oxidation of 16-hydroxyhexadecanoic to hexadecane-1,16-dioic acid.
660 *Biocatalysis and Biotransformation*, **17**, 163-178.
- 661 Sehgal N., Agarwal V., Valli, R.K., Joshi S.D. Antonovic L., Strobel H.W. & Ravindranath V. (2011)
662 Cytochrome P4504f, a potential therapeutic target limiting neuroinflammation. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 53-
663 64.

- 664 Seto Y., Hamada S., Matsuura H., Matsushige M., Satou C., Takahashi K., Masuta C., Ito H., Matsui H. &
665 Nabeta K. (2009) Purification and cDNA cloning of a wound inducible glucosyltransferase active toward 12-
666 hydroxy jasmonic acid. *Phytochemistry* **70**, 370-379.
- 667 Staswick P.E. (2009) The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin
668 inhibitors. *Plant Physiol.* **150**, 1310-1321.
- 669 Staswick P.E. & Tiryaki I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates
670 it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2117-2127.
- 671 Stumpe M. & Feussner I. (2006) Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem. Rev.* **5**, 347-357.
- 672 Tamogami S., Rakwal R. & Kodama O. (1997) Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic
673 acid through induction of naringenin-7-O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice
674 (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett.* **401**, 239-242.
- 675 Tijet N., Helvig C., Pinot F., Le Bouquin R., Lesot A., Durst F., Salatin J-P. & Benveniste I. (1998) Functional
676 expression in yeast and characterization of a clofibrate-inducible plant cytochrome P-450 (CYP94A1) involved
677 in cutin monomers synthesis. *Biochem. J.* **332**, 583-589.
- 678 Turk E. M., Fujioka S., Seto H., Shimada Y., Takatsuto S., Yoshida S., Wang H., Torres Q.I., Ward J.M.,
679 Murthy G., Zhang J., Walker J.C. & Neff M.M. (2005) BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate
680 Arabidopsis photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant J.* **42**, 23-34.
- 681 Wasternack C. & Kombrink E. (2010) Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in
682 plant stress responses and development. *ACS Chem. Biol.* **5**, 63-77.
- 683 Wasternack C. & Hause B. (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in
684 plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany. Annals of*
685 *Botany*, **111**, 1021-1058.
- 686 Widemann E., Miesch L., Lugan R., Holder E., Heinrich C., Aubert Y., Miesch M., Pinot F., & Heitz T.
687 (2013) The Amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and
688 generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in arabidopsis leaves. *J. Biol. Chem.* **288**, 31701-31714.

689
690

691 **Figure 1: UPLC-MS/MS analysis of metabolites produced by CYP94C1 with JA-Phe.**

692 JA-Phe was incubated with microsomes of yeast expressing CYP94C1 in presence (panels
693 A-D) or in absence (panels E-H) of NADPH. Control incubations were also performed in
694 presence of NADPH with microsomes of yeast transformed with a void plasmid (panels I-
695 L). Microsomes (0.4 mg of protein) were incubated with JA-Phe (100 μ M) for 20 min at
696 27°C. Residual substrate (JA-Phe) and metabolites (12OH-JA-Phe, 12COH-JA-Phe and
697 12COOH-JA-Phe) were identified by LC-MS/MS based on their retention times and
698 detection in multiple reaction monitoring.

699 **Figure 2: Structures** of (a) Jasmonoyl-Phenylalanine, (b) 12-Hydroxy-Jasmonoyl-
700 Phenylalanine; (c) 12-Oxo-Jasmonoyl-Phenylalanine and (d) 12-Carboxy-Jasmonoyl-
701 Phenylalanine.

702
703
704

705 **Figure 3: UPLC-MS/MS analysis of 12COH-JA-Ile produced by CYP94C1.**

706 JA-Ile (100 μ M) was incubated with microsomes of yeast expressing CYP94C1 in presence
707 (panel A) or in absence (panel B) of NADPH. Control incubation was also performed in
708 presence of NADPH with microsomes of yeast transformed with a void plasmid (panel C).
709 Microsomes (0.4 mg of protein) were incubated with JA-Ile (100 μ M) for 20 min at 27°C,
710 12COH-JA-Ile was identified by LC-MS/MS.

711 **Figure 4 : CYP94B1, CYP94B3 and CYP94C1 exhibit different catalytic capabilities.**

712 JA-Phe and JA-Ile were incubated for 20 min at 27°C with 0.4 mg of microsomal proteins
713 from yeast expressing CYP94B1, CYP94B3 or CYP94C1 in presence of NADPH. The
714 relative quantification of metabolites for each enzyme was achieved by reporting peak areas
715 relative to internal standard (9,10-dihydro-JA-Ile) peak area.

716 **Figure 5: Accumulation of JA-Phe, JA-Ile and their oxidized derivatives in wounded**
717 **leaves.**

718 Leaves were wounded with forceps, harvested at different times post-wounding and
719 analyzed for jasmonate content by LC-MS/MS analysis. JA-Phe and its oxidized derivatives
720 levels are represented in left panels; JA-Ile and its oxidized derivatives levels are
721 represented in right panels. Levels are expressed in area/g fresh weight when no standards
722 were available. Data are mean \pm S.E. from three biological samples.

723 **Figure 6: Involvement of members of CYP94 family in post-wounding production of**
724 **12OH-JA-Phe and 12 COOH-JA-Phe.**

725 Leaves were wounded with forceps, harvested at different time post-wounding and analyzed
726 for 12OH-JA-Phe and 12COOH-JA-Phe content by LC-MS/MS analysis. Panel A, 12OH-
727 JA-Phe levels; panel B, 12COOH-JA-Phe levels. Data are mean \pm S.E. from three
728 biological samples.

729 **Figure 7: Involvement of members of CYP94 family in post-wounding production of**
730 **12COH-JA-Ile.**

731 Leaves were wounded with forceps, harvested at different time post-wounding and analyzed
732 for 12OH-JA-Ile, 12COH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile content by LC-MS/MS analysis.
733 Panel A, 12OH-JA-Ile levels; panel B, 12COH-JA-Ile levels; panel C, 12COOH-JA-Ile
734 levels. Data are mean \pm S.E. from three biological samples.

735 **Figure 8: Effect of *Botrytis cinerea* infection on JA-Phe accumulation in leaves.**

736 Droplets of 5 μ l containing *Botrytis cinerea* spores were deposited on *Arabidopsis* leaves
737 which were harvested 2 and 3 days post-inoculation. Non inoculated leaves (0 dpi) were
738 used as control. Jasmonates of leaves were then extracted and analyzed for JA-Phe content
739 by LC-MS/MS analysis.

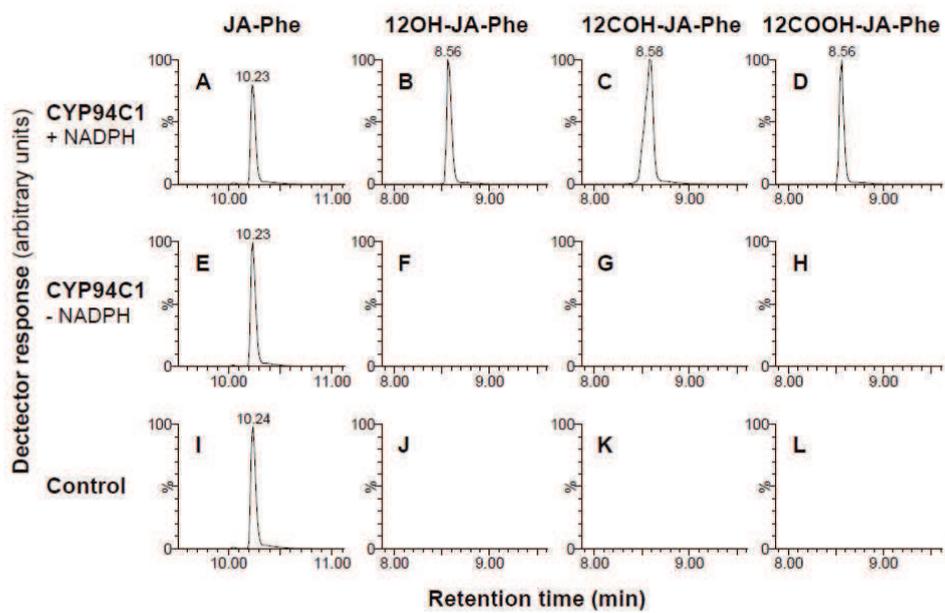


Figure 1

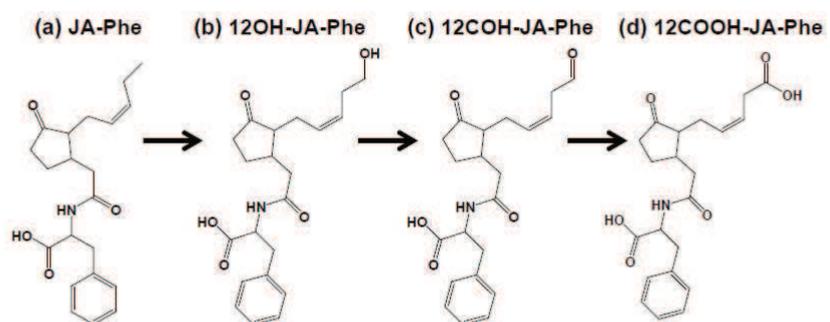


Figure 2

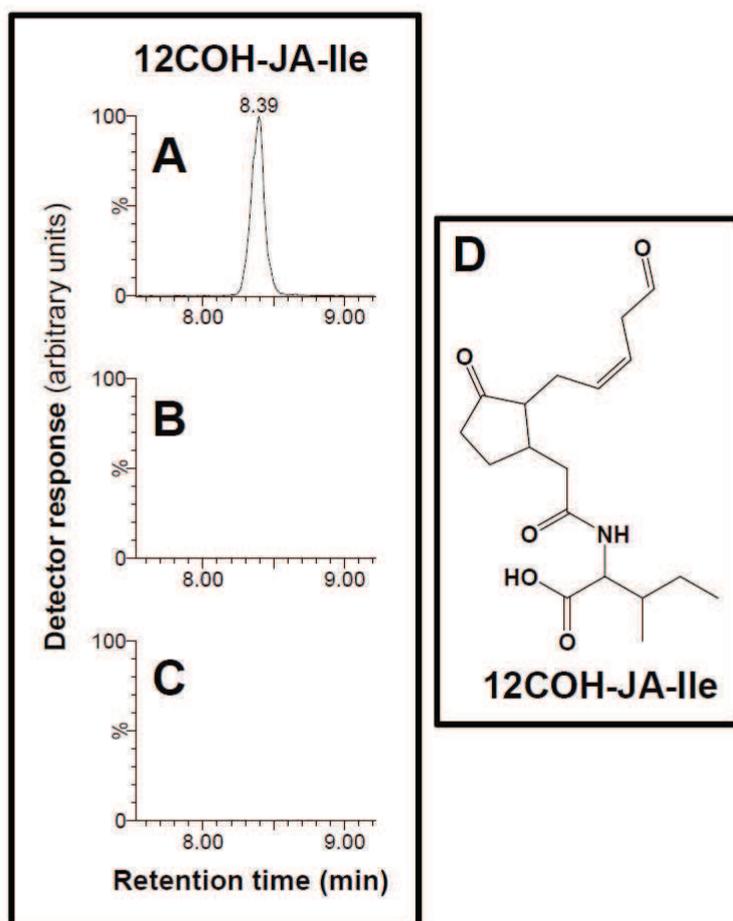


Figure 3

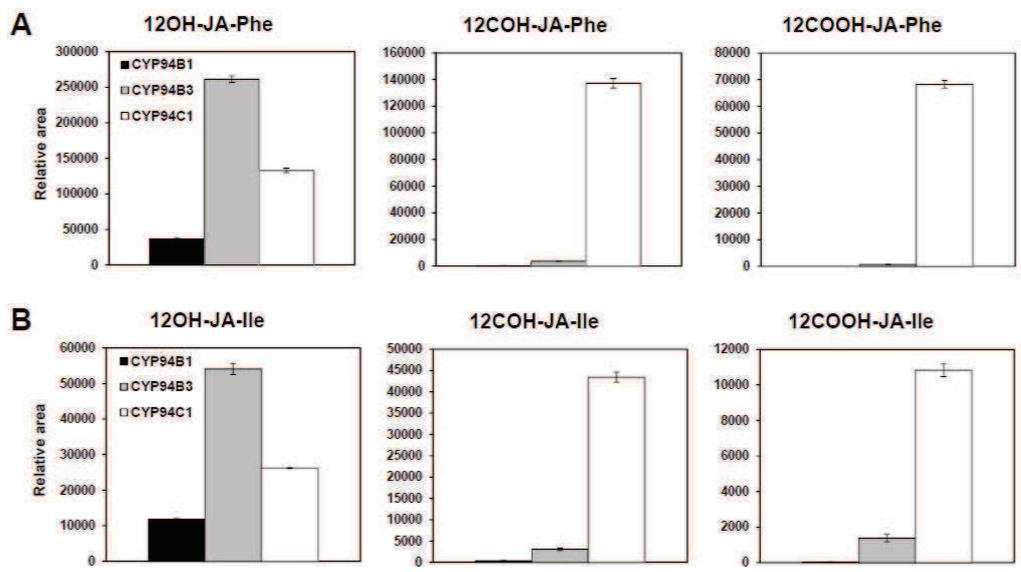


Figure 4

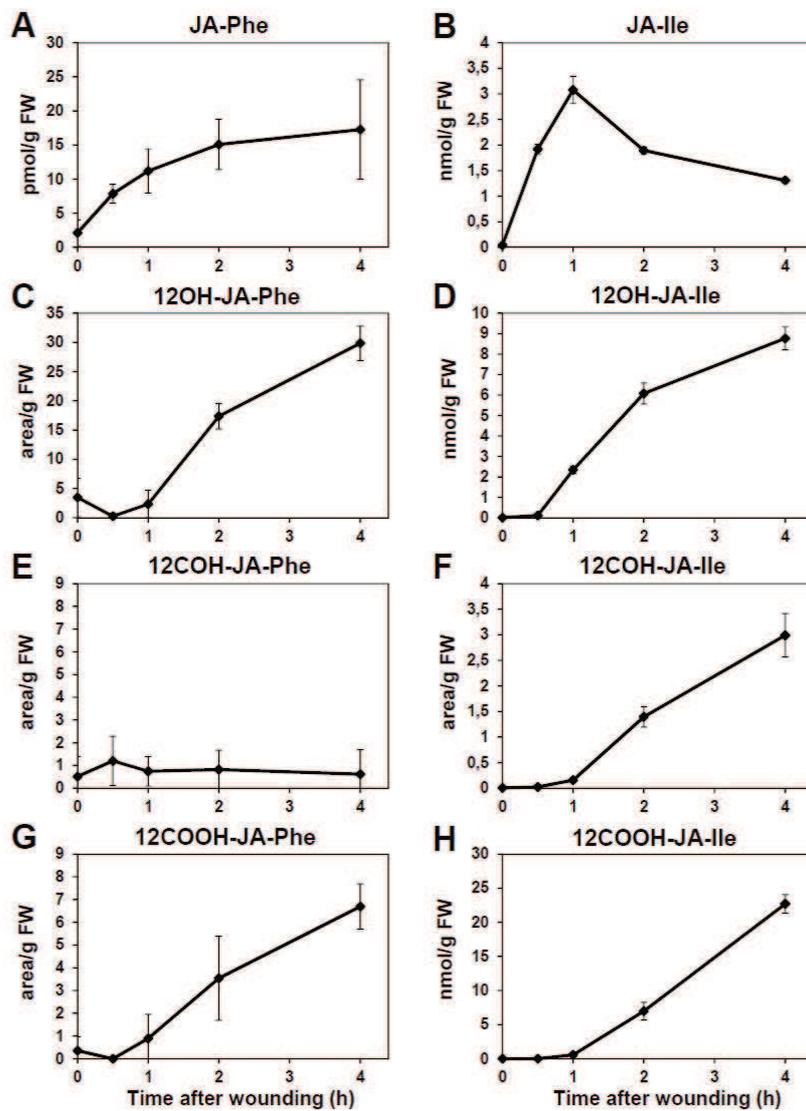


Figure 5

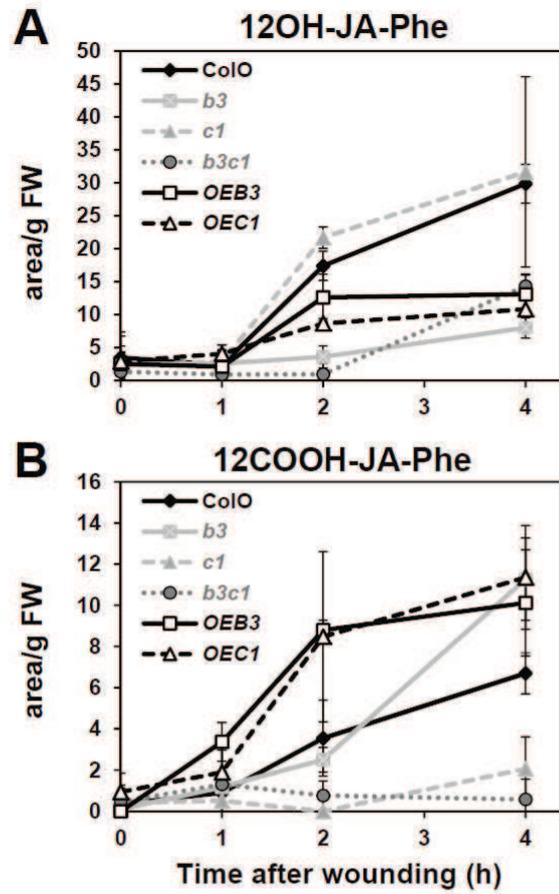


Figure 6

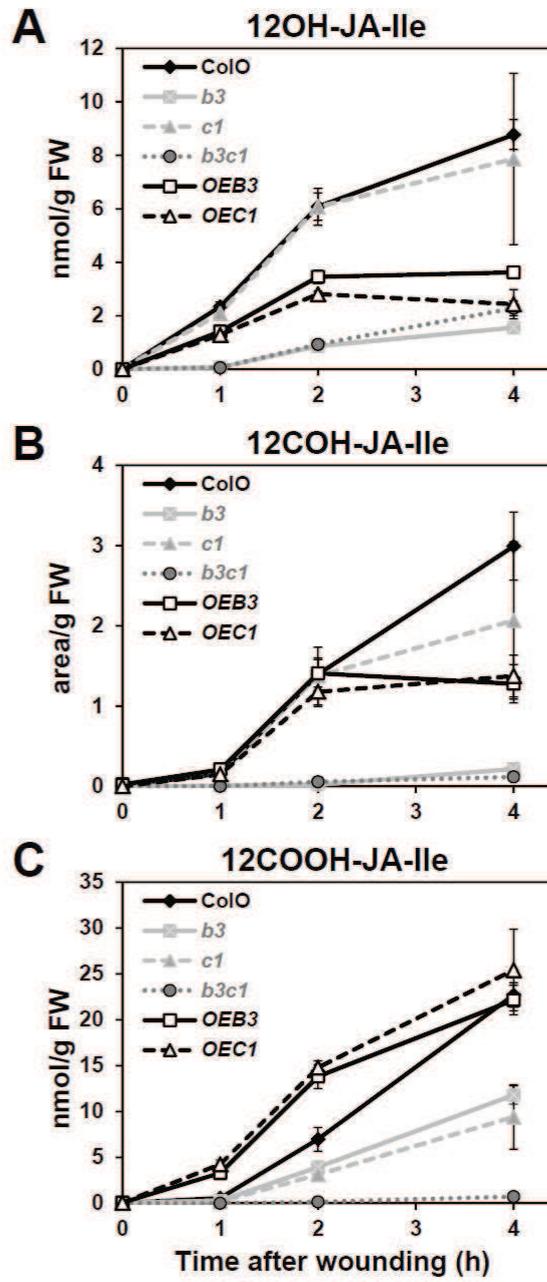


Figure 7

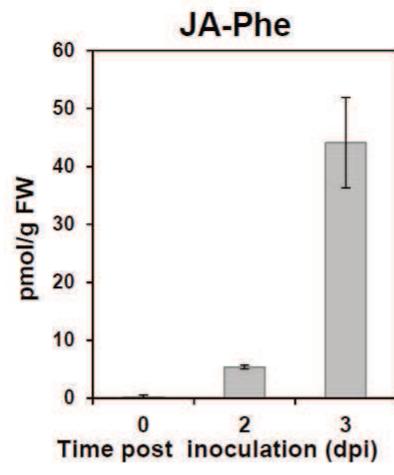


Figure 8

DISCUSSION

8 DISCUSSION

8.1 La co-régulation transcriptionnelle comme outil prédictif de l'analyse du métabolisme des jasmonates

Le choix des différents gènes étudiés au cours de ce travail de thèse repose grandement sur les outils de co-régulation transcriptionnelle. Ces outils ont été développés dans la dernière décennie sur la base de centaines d'expériences de microarrays examinant l'expression du génome d'*Arabidopsis thaliana* dans de nombreuses situations physiologiques (Toufighi et al., 2005; Ehling et al., 2008).

En effet, la voie JA est inductible, allumée selon des conditions de stress ou de développement particulières. Ainsi, l'expression de gènes impliqués dans cette voie est contrôlée de manière dynamique. Ces gènes sont caractérisés par une forte amplitude d'expression pendant une courte durée et définissent donc une signature transcriptionnelle typique.

Un gène inconnu étant fortement co-régulé avec des gènes connus pour être impliqués dans la voie des jasmonates (signalisation ou biosynthèse) est donc un bon candidat pour être également impliqué dans cette même voie hormonale.

Ces outils de co-régulation transcriptionnelle ont été utiles pour cibler d'abord les CYP94s puis les amido-hydrolases comme acteurs potentiels dans le métabolisme des JAs.

Les outils de co-régulation ainsi que les outils métaboliques, enzymatiques et génétiques nous ont permis d'établir le rôle de nouveaux acteurs de la voie JA.

8.2 Les voies cataboliques de l'hormone JA-Ile

La combinaison des approches biochimiques, génétiques et métabolomiques nous a permis d'élargir la palette de jasmonates identifiés et de découvrir de nouveaux acteurs intervenant dans la synthèse, la conversion et le catabolisme de dérivés jasmonates. Nous avons étudié différentes conditions physiologiques faisant intervenir la voie des jasmonates, des conditions de stress (blessure mécanique ou infection par un pathogène nécrotrophe) ou un contexte développemental (fleur).

- Plus particulièrement, nous avons mis en évidence le rôle majeur des cytochromes P450 CYP94B3 et CYP94C1 dans l'oxydation des conjugués JA-Ile et JA-Phe, CYP94B1 métabolisant également ces composés *in vitro* et ne jouant qu'un rôle mineur dans leur turnover dans les feuilles blessées.
- Nous avons pu réaliser la première détection *in vivo* de 12CO-JA-Ile, un jasmonate portant une fonction aldéhyde sur la chaîne latérale.
- Nous avons établi que les niveaux de JA-Ile sont également régulés via les oxydations de CYP94B3 et CYP94C1 dans deux autres conditions impliquant la signalisation des jasmonates, lors de l'infection foliaire par *Botrytis cinerea* et au cours du développement floral.
- Par ailleurs, nous avons caractérisé le rôle des amido-hydrolases IAR3 et ILL6 dans une seconde voie d'inactivation de l'hormone JA-Ile. En outre, une voie indirecte de production de 12OH-JA à partir de JA a été mise en évidence, consistant en 3 étapes successives : conjugaison par JAR1, hydroxylation par les CYP94s puis hydrolyse du conjugué 12OH-JA-Ile par les amido-hydrolases IAR3 et ILL6. Le 12OH-JA ainsi formé peut ensuite être sulfaté ou glucosylé (figure 8-1).

Les travaux de thèse ont contribué à la caractérisation de 6 étapes enzymatiques catalysées par 3 CYP94s et de 2 étapes enzymatiques catalysées par 2 amido-hydrolases (figure 8-1). La synthèse de composés synthétiques standards par nos collègues chimistes a été déterminante pour mettre en évidence ces différentes voies métaboliques, tant pour des tests biochimiques *in vitro* utilisant ces composés comme substrat, que pour la recherche et la quantification des composés *in vivo*.

Nous avons déterminé que le mécanisme enzymatique d'oxydation de JA-Ile fonctionne dans le modèle développemental des fleurs et fait appel aux mêmes acteurs, les CYP94s, que dans la réponse des feuilles à un stress biotique.

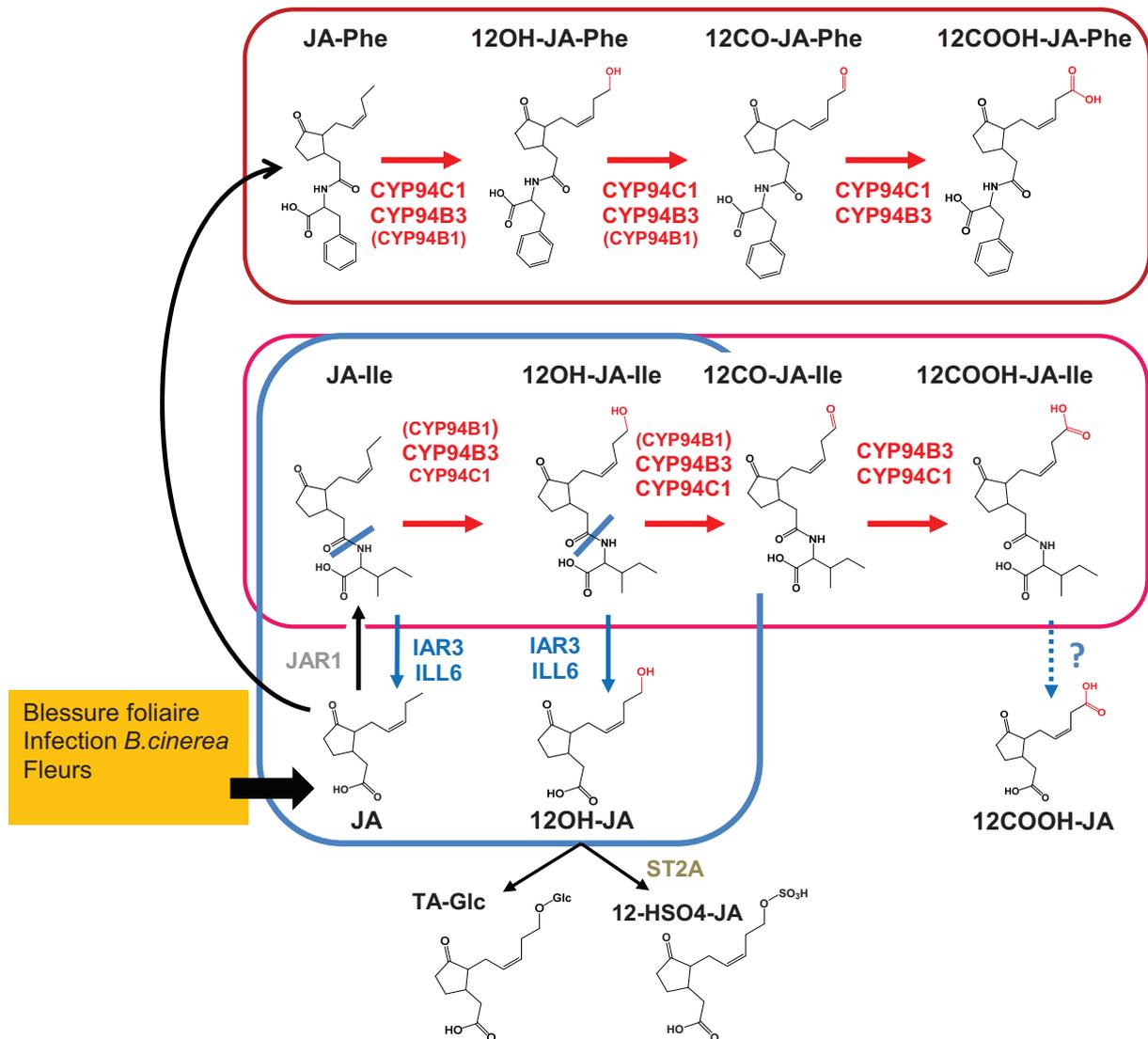


Figure 8-1 : Métabolisme des jasmonates conjugués JA-Ile et JA-Phe ainsi que de leurs dérivés. Deux routes d'inactivation de l'hormone JA-Ile ont été découvertes lors de ce travail, l'une correspondant à son oxydation par des cytochromes P450 de la famille CYP94 (en rouge), l'autre étant basée sur l'hydrolyse de ce conjugué par les amido-hydrolases IAR3 et ILL6 (en bleu). CYP94B3, CYP94C1 et CYP94B1 oxydent à la fois JA-Ile et JA-Phe, dont les produits hydroxylés et carboxylés s'accumulent *in vivo*. La carboxylation de ces conjugués passe par un intermédiaire aldéhyde que nous avons caractérisé *in vitro*, le 12CO-JA-Ile pouvant être accumulé également *in vivo*. Une voie indirecte de la production de 12OH-JA à partir de JA a été mise en évidence, impliquant ces CYP94s et ces amido-hydrolases. Les conjugués oxydés 12OH-JA-Phe, 12CO-JA-Phe, 12COOH-JA-Phe et 12CO-JA-Ile, ainsi que le composé 12COOH-JA ont été décrits au cours de ce travail.

Après blessure, le turnover du conjugué hormonal JA-Ile est assuré par des P450s de la famille CYP94. CYP94B1, CYP94B3 et CYP94C1 catalysent l'oxydation de JA-Ile, tandis que dans les fleurs, CYP94B1 semble ne pas participer à l'oxydation de l'hormone et CYP94B3 joue un rôle mineur dans la formation de 12OH-JA-Ile. Il y a donc également une spécificité dans les réactions catalysées selon le contexte biologique. Au cours de nos travaux, deux autres groupes ont caractérisé partiellement CYP94B3 comme une JA-Ile hydroxylase (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011).

Récemment, l'accumulation de faibles quantités d'une forme glucosylée de 12OH-JA-Ile (12-O- β -glucopyranyl-jasmonoyl-L-isoleucine, 12-O-Glc-JA-Ile) a été décrite dans les feuilles blessées d'*Arabidopsis thaliana* (Kitaoka et al., 2014). Bien que l'enzyme catalysant la formation de 12-O-Glc-JA-Ile ne soit pas connue, il est fort probable que ce composé soit formé à partir de 12OH-JA-Ile.

Le 12OH-JA-Ile est une molécule clé au carrefour de plusieurs voies métaboliques, puisque les P450s CYP94B3 et CYP94C1, les amido-hydrolases IAR3 et ILL6, et probablement une glucosyltransférase le métabolisent. Il semble donc que la forme hormonale oxydée 12OH-JA-Ile doive être inactivée, mais que ce métabolite serve également de précurseur pour la formation de dérivés jasmonates (12OH-JA, 12-O-Glc-JA-Ile) pouvant eux-mêmes être nécessaires pour la synthèse d'autres jasmonates (12-O-glucosyl-JA et 12-HSO₄-JA). Les fonctions biologiques de ces nombreux dérivés de JA-Ile restent à élucider.

Les voies oxydative et hydrolytique assurent le turnover de JA-Ile de manière concomitante. Nous avons montré que lors de blessure, la mutation d'hydrolase peut induire la surexpression de *CYP94s* et inversement, la surexpression de *CYP94C1* dans les fleurs peut provoquer une réduction de l'expression d'*IAR3* et *ILL6*. Ces résultats indiquent que les deux voies métaboliques sont régulées de manière à promouvoir une compensation par la deuxième voie lorsque la première est affectée. Ainsi, ces mécanismes de compensation permettent de tamponner tout déséquilibre qui provoquerait une gestion aberrante des niveaux de JA-Ile.

Le blocage simultané de CYP94B3 et CYP94C1 a aboli le caractère transitoire de l'accumulation de JA-Ile après blessure, avec des niveaux élevés et persistants. Nous avons espéré que les plantes mutantes pour ces gènes seraient par conséquent plus résistantes aux stress. Les réactions de défense n'ont pas augmenté en proportion, ce qui contrarie l'espoir d'obtenir des plantes plus résistantes en réduisant le catabolisme hormonal.

Une amido-hydrolase hydrolysant JA-Ile a été récemment caractérisée chez *Nicotiana attenuata* et l'importance de cette enzyme a été démontrée pour la défense contre les herbivores (Woldemariam et al., 2012). Il est donc probable que le mécanisme de gestion des niveaux de JA-Ile par hydrolyse soit répandu dans le règne végétal. Les mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en hydrolases métabolisant JA-Ile pourraient être testés pour leur résistance à des insectes herbivores.

8.3 Des profils particuliers de jasmonates sont formés dans différentes situations physiologiques

L'étude du métabolisme de JA-Ile et de ses dérivés dans les feuilles stressées par une blessure mécanique ou par une infection par *Botrytis cinerea*, ainsi que dans les fleurs, a permis de mettre en évidence des profils très différents en jasmonates selon le contexte biologique (figure 8-2 et 8-3).

Les quantités de JA-Ile mesurées dans les fleurs fermées d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage sont plus élevées que celles de JA-Phe, de 21 fois dans les fleurs fermées et de 3,5 fois dans les fleurs ouvertes (figure 8-2). Les proportions de ces deux conjugués varient donc au cours du développement floral, illustrant la dynamique particulière des jasmonates dans ce contexte développemental.

Les niveaux de JA-Ile accumulés après blessure sont de l'ordre de la nmol/g de poids frais après blessure, alors qu'en réponse à *Botrytis cinerea* et dans les fleurs ils sont de l'ordre de la centaine de pmol/g de poids frais (figure 8-2). La forte différence de quantité de JA-Ile dans les feuilles selon le stress appliqué pourrait en partie provenir du mode de stimulation et de notre méthode de récolte car nous récoltons la totalité du limbe. En effet, lors de la blessure, les zones écrasées par la pince représentent au moins un tiers de l'aire foliaire, tandis que lors de l'infection, le champignon est en contact avec des cellules vivantes essentiellement en périphérie de la lésion, donc les stimuli sont appliqués seulement sur une petite zone du limbe. Par ailleurs, la blessure est une stimulation synchrone unique et JA-Ile est accumulé transitoirement. Au contraire, pendant l'infection, la stimulation est continue (asynchrone) tandis que le front d'infection progresse et que la lésion s'agrandit : le nombre de cellules accumulant JA-Ile en périphérie de la lésion est fonction de la circonférence de la lésion. Les différences de quantités de JA-Ile mesurées dans la totalité du limbe pourraient donc partiellement provenir du fait que la proportion de cellules touchées directement par le stimulus à un temps donné est différente selon le stress appliqué.

	Quantité de jasmonates chez des plantes Col0 de type sauvage				
	Feuille 1 h après blessure	Feuille 4 h après blessure	Infection <i>Botrytis cinerea</i> 3 jours après inoculation	Fleur fermée	Fleur ouverte
JA	12 nmol/g ± 1	7 nmol/g ± 0,6	5 nmol/g ± 1	512 pmol/g ± 53	372 pmol/g ± 24
12OH-JA	0,5 nmol/g ± 0,1	7 nmol/g ± 0,8	4 nmol/g ± 1	491 pmol/g ± 100	579 pmol/g ± 228
12COOH-JA	0,2 nmol/g ± 0,05	10 nmol/g ± 2	2 nmol/g ± 0,1		
JA-Ile	3 nmol/g ± 0,3	1,3 nmol/g ± 0,05	97 pmol/g ± 24	131 pmol/g ± 18	25 pmol/g ± 4
12OH-JA-Ile	2 nmol/g ± 0,2	9 nmol/g ± 0,6	39 pmol/g ± 5	57 pmol/g ± 14	65 pmol/g ± 22
12CO-JA-Ile	0,16 aire/g ± 0,03	3 aire/g ± 0,4	nd		
12COOH-JA-Ile	0,6 nmol/g ± 0,2	23 nmol/g ± 1,3	524 pmol/g ± 128	398 pmol/g ± 63	1927 pmol/g ± 373
JA-Phe	11,2 pmol/g ± 3	17 pmol/g ± 7	44 pmol/g ± 8	6 pmol/g ± 4	7 pmol/g ± 3,5
12OH-JA-Phe	nd	30 aire/g ± 3	249 aire/g ± 138	nd	nd
12CO-JA-Phe	nd	nd	nd	nd	nd
12COOH-JA-Phe	nd	7 aire/g ± 1	485 aire/g ± 113	43 aire/g ± 25	208 aire/g ± 7

nd : indétectable
les aires/g ne sont pas comparables entre composés ni entre blessure/ infection /fleur

Figure 8-2 : Profils de jasmonates dans les échantillons de feuilles stressées (blessées ou infectées) et de fleurs de plantes de type sauvage. Les niveaux mesurés de JA, JA-Ile, JA-Phe, et leurs dérivés oxydés sont indiqués en valeur absolue ou relative (aire), par rapport à la masse fraîche (g).

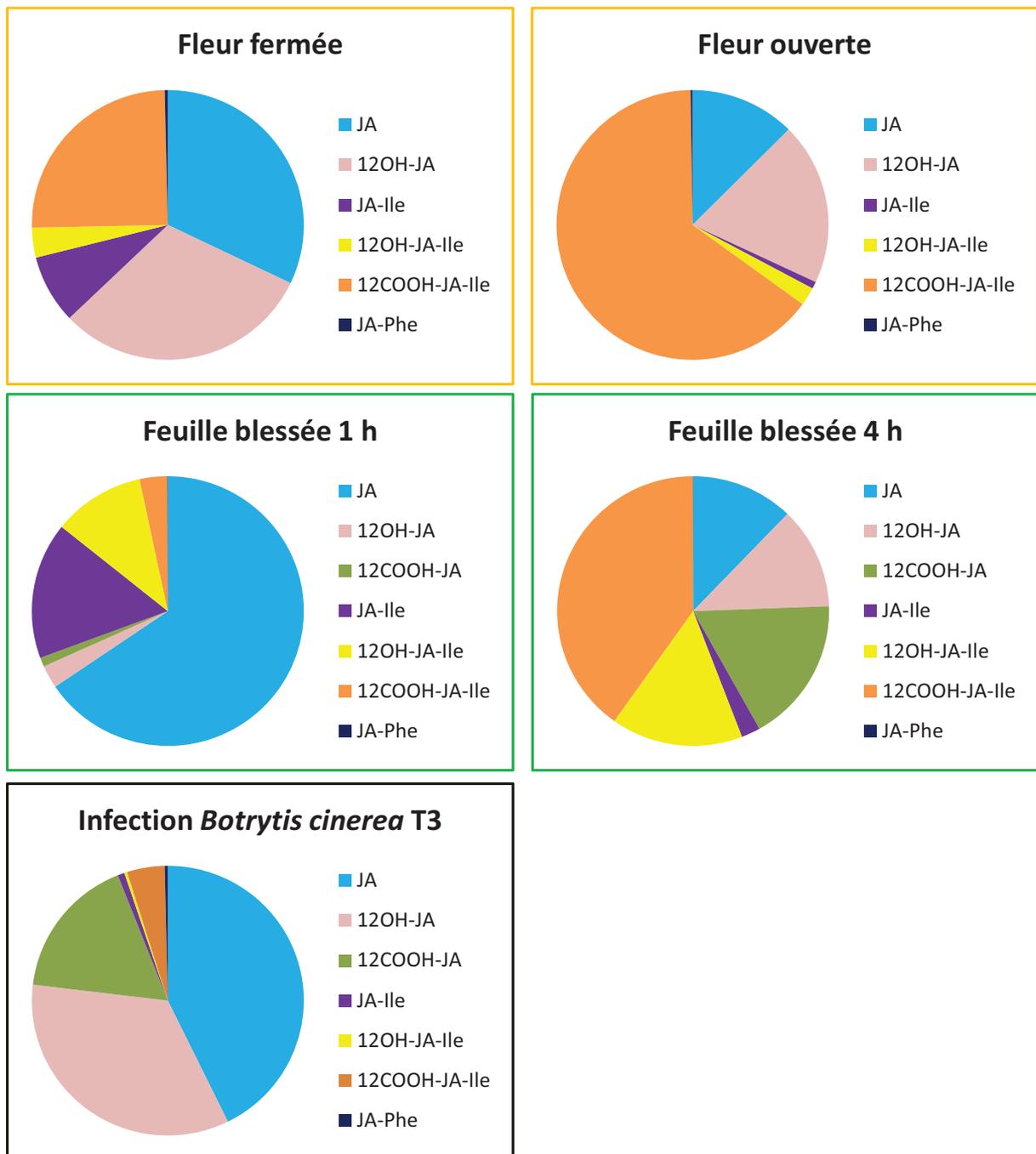


Figure 8-3 : Proportion des jasmonates mesurés dans la fleur (fermée ou ouverte) et dans les feuilles blessées (1 h et 4 h après blessure) ou infectées (3 jours après inoculation). Les profils en jasmonates sont spécifiques et dépendent du contexte physiologique. Les valeurs mesurées de JA, JA-Phe, JA-Ile et leurs dérivés oxydés, utilisées pour constituer ces diagrammes, sont présentées dans la figure 8-2.

Les proportions relatives de jasmonates que nous avons quantifiés dans les fleurs et dans les feuilles blessées ou infectées sont présentées dans la figure 8-3 (valeurs numériques présentées en figure 8-2). Le JA présente des niveaux plus abondants que les conjugués JA-Ile et JA-Phe, quel que soit le tissu étudié (figure 8-2 et 8-3). JA, 12OH-JA et 12COOH-JA-Ile sont les jasmonates les plus abondants que nous avons mesurés dans les fleurs. Il est intéressant de noter que le dérivé carboxylé de JA-Ile, le 12COOH-JA-Ile, est le dérivé de JA majoritaire mesuré dans les fleurs ouvertes et 4 h après blessure, c'est-à-dire en fin de signalisation. Le 12COOH-JA-Ile s'accumule dans des quantités plus élevées que celles de JA-Ile, dans les 3 conditions physiologiques étudiées (figure 8-3). 12COOH-JA-Ile est donc moins métabolisé que JA-Ile puisqu'il a le temps de s'accumuler davantage. JA-Ile et 12OH-JA-Ile sont des plaques tournantes (« hub ») du métabolisme des JAs, à l'origine de plusieurs autres composés : ils sont à la fois substrats ou produits de plusieurs enzymes et sont soumis à un flux métabolique important. Plus particulièrement, JA-Ile s'accumule moins que 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile, même si l'accumulation de ces composés oxydés provient de JA-Ile. La conversion de JA-Ile est certainement plus rapide que celle de ses formes oxydées qui s'accumulent donc davantage. Des profils de jasmonate différents signifient que les niveaux d'activité des enzymes de ces voies métaboliques sont différents dans les diverses situations étudiées : l'étape enzymatique limitante peut varier selon le cas. Les proportions en jasmonates sont donc très variables selon la condition biologique. La notion de « oxylipin signature », introduite en 1997 par H. Weber et E. Farmer (Weber et al., 1997) prend ici tout son sens. Comme un peintre peut obtenir des tableaux très différents en utilisant les mêmes couleurs dans des proportions variables, la plante contrôle les quantités de chaque jasmonate pour aboutir à des réponses physiologiques distinctes. Ces profils sont largement dus à l'action simultanée des CYP94s et des amido-hydrolases.

8.4 Diversité de l'oxydation de conjugués JA-acide aminé par les CYP94s

Nous avons déterminé que JA-Ile n'est pas le seul conjugué jasmonate à être métabolisé par les CYP94s, mais que ces enzymes catalysent également la carboxylation de JA-Phe.

L'idée que d'autres molécules que JA-Ile pourraient gouverner la signalisation jasmonates lors de la blessure est soutenue par des observations faites chez le mutant *jar1* qui ne produit presque plus de JA-Ile. Chez *jar1*, l'expression de gènes induits par la blessure de manière JA-dépendante n'est pas affectée (*LOX2*, *PDF1.2*, *WRKY33*, *TAT3* et *COR13*) ou seulement légèrement retardée (*VSP2*) (Suza et Staswick, 2008). Dans le même sens, Chung et al. (2008) ont montré que chez ces plantes, l'induction de l'expression de gènes induits par la blessure (*MYC2*, *JAZ5*, *JAZ7*, *AOS*, et *OPR3*) est aussi forte que dans les plantes de type sauvage, démontrant que ces réponses ne dépendent pas ou peu de l'accumulation maximale de JA-Ile. En revanche, ces réponses transcriptionnelles sont perdues chez *coil*, démontrant que la F-box COI1 est nécessaire à la signalisation conduisant à l'induction de ces gènes (Chung et al., 2008). Il est donc possible que d'autres conjugués JA-acide aminés, formés indépendamment de JAR1, soient requis pour une signalisation COI1-dépendante. Nous avons démontré parallèlement à d'autres groupes, que les conjugués JA-Ile et JA-Phe peuvent être oxydés par CYP94B1, CYP94B3 et CYP94C1 (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012; Kitaoka et al., 2014). Il est donc possible que ces enzymes contrôlent également simultanément les niveaux d'autres conjugués JA-acide aminés. En effet, il a été décrit que CYP94B3 hydroxyle également JA-Val et JA-Leu (Kitaoka et al., 2014). Les CYP94s pourraient donc être des régulateurs de différents acteurs de signalisation de la voie des jasmonates déclenchant les réponses de défense ou de développement. Ces acteurs ainsi que leur mode de régulation restent à caractériser.

Botryodiplodia theobromae est un ascomycète pathogène provoquant le dépérissement de plantes. Une amido-hydrolase de ce microorganisme hydrolyse *in vitro* les conjugués JA-acide aminé (-)-JA-(S)-Phe, (-)-JA-(S)-Ile, (-)-JA-(S)-Val, (-)-JA-(S)-Trp, (-)-JA-(S)-Leu avec une activité enzymatique spécifique maximale pour (-)-JA-(S)-Phe et un peu moindre pour (-)-JA-(S)-Ile (Hertel et al., 1997). Nous avons observé que JA-Phe et JA-Ile sont accumulés chez *Arabidopsis thaliana* lors de l'infection par *Botrytis cinerea*. L'existence de l'amido-

hydrolase de *Botryodiplodia theobromae* suggère que ce pathogène pourrait hydrolyser les molécules de JA-Phe et de JA-Ile éventuellement produites par la plante lors de l'infection, afin de supprimer un signal de système de défense majeur de l'hôte. Cette idée renforce l'hypothèse d'une signalisation contrôlée par JA-Phe dans les plantes.

8.5 Impact de l'oxydation sur la signalisation et la régulation de la voie JA

Les protéines JAZs sont des répresseurs de la signalisation des jasmonates (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007). Chez les mutants affectés dans l'expression des *CYP94s*, la défense baisse beaucoup chez OEC1, ce qui est probablement dû à la baisse de JA-Ile, alors que la défense augmente peu chez *cyp94b3*, *cyp94c1*, *cyp94b3c1*. Nous avons émis l'hypothèse que la limitation de l'augmentation des réponses de défense chez ces mutants pourrait être due à une induction des répresseurs *JAZs*. Nous avons ainsi recherché l'impact de l'oxydation des *CYP94s* sur ces répresseurs.

Nous avons mesuré l'expression des 12 *JAZs* dans les bourgeons floraux et les fleurs ouvertes, ainsi que dans les feuilles au cours de l'infection par *Botrytis cinerea*. L'expression des 12 *JAZs* après blessure a été décrite par Chung et al. (2009). Une description de l'expression de ces gènes lors d'une infection par *Pseudomonas syringae* a également été décrite (Demianski et al., 2012). La figure 8-4, basée sur ces données, compare l'expression des 12 *JAZs* dans les feuilles blessées, infectées par *Botrytis cinerea* ou *Pseudomonas syringae* et dans les fleurs chez *Arabidopsis thaliana*. Il apparaît que le pattern d'expression des 12 *JAZs* est spécifique à chaque modèle. Certaines *JAZs* ne sont pas exprimés, d'autres sont induites au cours du développement floral ou de l'infection. Parmi celles qui sont induites, seulement certaines d'entre elles sont dérégulées chez les mutants d'expression des *CYP94s*.

	JAZ1	JAZ2	JAZ3	JAZ4	JAZ5	JAZ6	JAZ7	JAZ8	JAZ9	JAZ10	JAZ11	JAZ12
Blessure	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Infection <i>Pseudomonas syringae</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Infection <i>Botrytis cinerea</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Fleurs <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+

+	induction de l'expression
-	pas d'induction de l'expression
+	exprimé
-	expression indétectable

	expression modifiée chez OEC1
	expression modifiée chez les mutants <i>cyp94s</i>
	expression inchangée chez les mutants d'expression des gènes <i>CYP94s</i>

Figure 8-4 : Expression des répresseurs JAZs de la voie jasmonate chez *Arabidopsis thaliana*. L'induction de l'expression de certains gènes JAZs en réponse à la blessure d'après Chung et al. (2009), à une infection par *Pseudomonas syringae* d'après Demianski et al. (2012) ou par *Botrytis cinerea*, et l'expression des JAZs dans les fleurs sont indiqués (+ ou -). La modification de l'expression des gènes *CYP94B3* ou *CYP94C1* peut avoir un impact sur l'expression de certains gènes JAZs (cases colorées).

Des différences d'expression ont été observées dans deux conditions pour *JAZ1*, 5, 8 et 9 chez les mutants d'expression *CYP94s*. Les *JAZ1*, 2, 5, 6, 7 et 9 sont exprimés dans les 4 conditions, suggérant que ces JAZs pourraient réguler des éléments communs aux réponses jasmonates dans ces différentes situations. Par ailleurs, ces mêmes JAZs ont une expression affectée chez les mutants, suggérant que ces gènes pourraient être sensibles à l'oxydation de JA-Ile dans ces conditions. Il est possible que l'oxydation de JA-Ile soit associée à des JAZs contrôlant des signalisations communes à chaque situation impliquant la voie JA. Les autres JAZs pourraient contrôler des réponses spécifiques au contexte biologique. Par exemple, *JAZ11* est exprimée dans les fleurs mais n'est pas induite dans les feuilles, tandis que *JAZ8* est induite en réponse aux différents stress foliaires mais n'est pas exprimée dans les fleurs. Nous avons observé que le système de signalisation JA est très contrôlé : lorsqu'il y a un excès de JA-Ile, une transcription plus élevée de JAZs permet d'exercer un rétro-contrôle négatif plus intense.

Pour certaines hormones, telles qu'ABA ou BR, une simple hydroxylation est suffisante pour inactiver l'hormone (Turk et al., 2005; Millar et al., 2006). Le fait que JA-Ile subisse 3 oxydations successives et que chaque produit formé s'accumule après blessure suggère que les formes oxydées de JA-Ile pourraient ne pas correspondre uniquement à des produits d'inactivation mais pourraient avoir elles-mêmes un rôle biologique ou être utilisées comme précurseur d'autres molécules ayant des propriétés nouvelles. Nos expériences préliminaires de traitement de plantules avec la forme hydroxylée de JA-Ile indiquent que l'expression de gènes inductibles par JA-Ile est très peu induite par le 12OH-JA-Ile. Koo et al. (2011) ont également montré par des expériences de pull-down que les protéines répresseurs JAZ3.1 et JAZ10.1 interagissent moins bien avec COI1 en présence de 12OH-JA-Ile qu'en présence d'hormone non oxydée. Nous avons obtenus des résultats similaires avec JAZ9 (non publié dans (Heitz et al., 2012)). Cependant, une interaction était encore détectable. Bien que les tests de pull-down ne reflètent pas tout le fonctionnement du co-récepteur, il est donc possible que l'hydroxylation n'abolisse pas totalement la formation du complexe COI1-JAZ. Il semble donc que l'hydroxylation de JA-Ile ne soit qu'une inactivation partielle de l'hormone, ayant un effet partiellement inhibiteur sur l'assemblage du co-récepteur COI1/JAZ (Koo et al., 2011) et sur la transcription de gènes de réponse de la voie JA (partie 2 des résultats figure 5-12) Il se peut que le 12OH-JA-Ile puisse contrôler d'autres réponses que JA-Ile, par exemple en promouvant l'interaction entre des composants de signalisation.

Nos expériences préliminaires de traitement de plantules avec la forme carboxylée de JA-Ile indiquent que l'expression de gènes inductibles par JA-Ile n'est pas induite par le 12COOH-JA-Ile. Cela suggère que la carboxylation de JA-Ile pourrait être un mécanisme d'inactivation totale de JA-Ile.

Chez les plantes sur-exprimant *CYP94C1* ayant un excès de 12COOH-JA-Ile, l'expression de certains gènes de défense est très réduite, comme nous l'avons observé dans la fleur (*TGG1* et *TGG2*) et lors de l'infection par *Botrytis cinerea* (*PDF1.2*). Les niveaux de JA-Ile n'étant pourtant pas très différents de ceux des plantes de type sauvage, il est possible que l'excès de 12COOH-JA-Ile exerce un effet inhibiteur sur l'expression de ces gènes de défense. Outre l'inactivation de JA-Ile, la carboxylation pourrait donc contribuer à une extinction de la signalisation de la voie des jasmonates, soit en empêchant JA-Ile d'exercer ses effets par compétition, soit par des rôles propres à la molécule de 12COOH-JA-Ile, par exemple en favorisant le recrutement d'autres protéines répresseurs transcriptionnels.

8.6 Perspectives

Ce travail a permis des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes cataboliques de l'hormone JA-Ile, pour lesquels très peu d'éléments étaient connus. Il s'agit du seul exemple à ce jour d'inactivation d'hormone agissant par oxydation ou clivage d'un conjugué à un acide aminé. Les résultats montrent également une nouvelle complexité du métabolisme des JAs.

8.6.1 Rôles des amido-hydrolases ?

La production de dérivés oxydés de JA-Ile et de JA-Phe par les CYP94s dans les trois conditions biologiques étudiées suggère que l'oxydation est un mécanisme général assurant le turnover de ces conjugués jasmonates, tant en réponse à un stress que dans un cadre développemental. Bien que nous n'ayons pas analysé les profils métaboliques des feuilles infectées ou des fleurs des mutants d'hydrolases, il est fort probable, au vu de l'expression de ces hydrolases (en réponse à l'infection, figure 6-14, et lignées d'expression GUS (Rampey et al., 2004)) et des profils de produits d'hydrolyse potentiels 12OH-JA et de 12COOH-JA, que la voie hydrolytique soit active dans ces situations et contribue significativement à l'homéostasie des JAs dans ces tissus. Le double mutant *iar3ill6* serait un outil complémentaire important pour ces études, notamment pour évaluer la redondance fonctionnelle d'IAR3 et ILL6.

La fonction de l'oxydation de JA-Ile et la formation de 12COOH-JA-Ile dans les fleurs reste une question ouverte. On peut supposer que 12COOH-JA-Ile est une forme inactive de JA-Ile mais aussi un précurseur pour la formation de 12COOH-JA après hydrolyse, qui pourrait avoir une activité biologique ou bien être à son tour précurseur d'une molécule ayant un rôle physiologique. La synthèse récente de 12COOH-JA par nos collègues chimistes nous a permis de rechercher ce composé dans les feuilles blessées. Nos résultats préliminaires indiquent que 12COOH-JA est accumulé lors de la blessure, dans une cinétique similaire à celle du conjugué 12COOH-JA-Ile, suggérant que 12COOH-JA pourrait être un produit de clivage de 12COOH-JA-Ile. Il serait intéressant de rechercher cette molécule également dans les fleurs ouvertes, où les quantités de 12COOH-JA-Ile sont élevées par rapport à celles de JA et 12OH-JA. L'analyse de mutants d'amido-hydrolases permettrait sans doute de déterminer si 12COOH-JA est formé par hydrolyse. Le double mutant *iar3ill6* sera

un outil complémentaire important pour savoir si d'autres enzymes interviennent pour le clivage.

Des amido-hydrolases pourraient également jouer un rôle dans le métabolisme d'autres conjugués jasmonates. En effet, l'amido-hydrolase ILR1 a été décrite comme une amido-hydrolase de conjugués d'auxine et son substrat préféré est l'IAA-Phénylalanine (Bitto et al., 2009). Comme la spécificité des amido-hydrolases d'auxine repose en partie sur l'acide aminé conjugué à l'auxine (Ludwig-Muller, 2011), il se pourrait qu'ILR1 métabolise également le conjugué JA-Phe.

8.6.2 Rôles des formes oxydées formées par les CYP94s ?

La carboxylation de JA-Ile rend l'hormone inefficace pour promouvoir l'induction de gènes de réponse aux jasmonates, ce qui pourrait être lié à un changement d'interaction de JA-Ile avec le co-récepteur COI1-JAZ. Dans une première étude, le positionnement de JA-Ile à la surface de COI1 a été modélisé (Yan et al., 2009) et prévoit que la chaîne latérale de JA interagirait avec la poche hydrophobe P2 (cf. introduction figure 1-11). Une deuxième étude plus poussée car basée sur la cristallisation de COI1 avec un peptide JAZ et avec JA-Ile montre que JA-Ile se place à l'interface COI1-JAZ (Sheard et al., 2010). Il est donc concevable que JA-Ile oxydé, où le méthyle terminal est devenu plus hydrophile, ne puisse plus interagir convenablement avec COI1 et JAZ. Une modélisation structurale du positionnement des 12OH-JA-Ile et 12COOH-JA-Ile au sein du co-récepteur pourrait nous éclairer.

CYP94C1 et CYP94B3 sont responsables de l'inactivation totale de JA-Ile mais également de la formation de molécules intermédiaires, 12OH-JA-Ile et 12CO-JA-Ile dont les activités biologiques restent à explorer. Il est intéressant de remarquer que le 12OH-JA-Ile ayant encore de faibles propriétés biologiques (partie 2 des résultats figure 5-12) est formé par CYP94B3 et CYP94C1, puis inactivé par ces mêmes P450s. Il existe des protéines modifiées par l'IAA, par exemple chez le haricot (Walz et al., 2002). On pourrait imaginer qu'il existe également des protéines modifiées par des conjugués de JA. Les fonctions oxydées formées par CYP94B3 et CYP94C1 pourraient permettre le couplage de conjugués de JA avec des acides aminés de protéines, pour éventuellement modifier leur propriétés et contribuer aux réponses contrôlées par les jasmonates.

8.6.3 Vers un modèle de signalisation des jasmonates incluant divers complexes JAZ/JA-acide aminé/COI1 pour assurer des réponses spécifiques

Pour de nombreuses hormones, plusieurs formes actives ont été décrites, notamment pour l'auxine (l'IAA, l'aide indole-3-butyrique (IBA), le 4-Cl-IAA, l'acide indole-3-propionique (IPA)) (Ludwig-Muller, 2011) et les gibbérellines (Piotrowska et Bajguz, 2011). Il serait étonnant qu'une seule forme de jasmonate soit bioactive. Dans ce sens, l'OPDA a été décrit pour avoir des fonctions spécifiques et le rôle de JA-Trp dans le contrôle de la croissance racinaire a été rapporté récemment (Staswick, 2009b). Certains processus dépendent de l'OPDA, de manière JA/COI1 indépendante, indiquant l'existence d'une signalisation spécifique à l'OPDA (Wasternack et al., 2012). Une signalisation OPDA-dépendante et COI1-indépendante a notamment été mise en évidence pour l'inhibition de la germination de la graine chez *Arabidopsis thaliana* (Dave et al., 2011).

La formation d'un co-récepteur COI1-JAZ en présence des conjugués JA-Leu, JA-Val et JA-Ala a été décrite (par des tests *in vitro* avec des protéines de tomate), avec des efficacités variables selon le composé et la protéine JAZ (Katsir et al., 2008b). Ces conjugués sont plus efficaces pour promouvoir l'assemblage du complexe en présence de la protéine JAZ3 qu'en présence de la protéine JAZ1 de tomate, et JA-Val a les mêmes capacités à promouvoir l'assemblage du corécepteur COI1-JAZ3 que JA-Ile (Katsir et al., 2008b). Un co-récepteur COI1-JAZ1 (tests *in vitro* avec des protéines d'*Arabidopsis thaliana*) est également formé en présence de JA-Leu, bien que moins efficacement qu'en présence de JA-Ile (Thines et al., 2007). Ces découvertes indiquent que différents conjugués JA-acide aminés pourraient être des jasmonates bioactifs (Katsir et al., 2008b). Ces résultats soutiennent l'idée que plusieurs signalisations incluant la protéine F-box COI1 pourraient être déclenchées, avec des spécificités dépendant du couple JAZ / acide aminé.

Nous avons déterminé que les expressions des 12 *JAZs* d'*Arabidopsis thaliana* sont différentes dans les feuilles infectées par le champignon *Botrytis cinerea* et dans les fleurs, et il a été rapporté qu'elles sont différemment induites lors d'une infection par la bactérie *Pseudomonas syringae* (Demianski et al., 2012). Des proportions variables de chaque protéine JAZ dans la cellule pourraient donc contribuer à la diversité des réponses de la voie JA. Nous avons observé que selon l'organe et la condition physiologique, les quantités de jasmonates sont différentes, notamment les rapports de quantité JA-Ile et JA-Phe. Les spécificités de signalisation de la voie jasmonate selon le contexte biologique dépendent

probablement également de la proportion de chacun des conjugués JA-acide aminé dans le pool de jasmonates présents. Par ailleurs, la signalisation de la voie JA est inductible, ce qui en fait un système dynamique, impliquant différents évènements (figure 8-5) :

- La production de différents composés jasmonates, leur métabolisation et leur inactivation
- La dégradation, la transcription et la synthèse *de novo* de répresseurs JAZs
- La dé-répression de facteurs de transcription et leur synthèse *de novo*
- L'interaction avec des facteurs de transcription ou des répresseurs d'autres voies hormonales

Ainsi, des acteurs spécifiques présents en quantités contrôlées dans un contexte biologique donné orchestrent la variété des réponses de la voie des jasmonates de manière dynamique.

Puisque 20 conjugués JA-acide aminés pourraient exister, il serait intéressant de rechercher systématiquement les 20 conjugués dans les extraits de plante pour déterminer quels conjugués JA-acide aminés sont accumulés dans les différentes situations impliquant la signalisation jasmonates. Ainsi, la liste des acteurs potentiels JA-acide aminés pourrait être dressée. La capacité de ces différents conjugués à promouvoir des interactions COI-JAZ pourrait ensuite être testée pour les 12 JAZs. *In vivo*, il est probable que la combinaison de complexes COI1/JA-aminé/JAZ spécifiques permette la dégradation de JAZs particulières qui répriment l'expression de gènes impliqués dans des réponses physiologiques spécifiques, ce qui permettrait à la voie JA d'assurer des réponses adaptées selon le contexte biologique et métabolique.

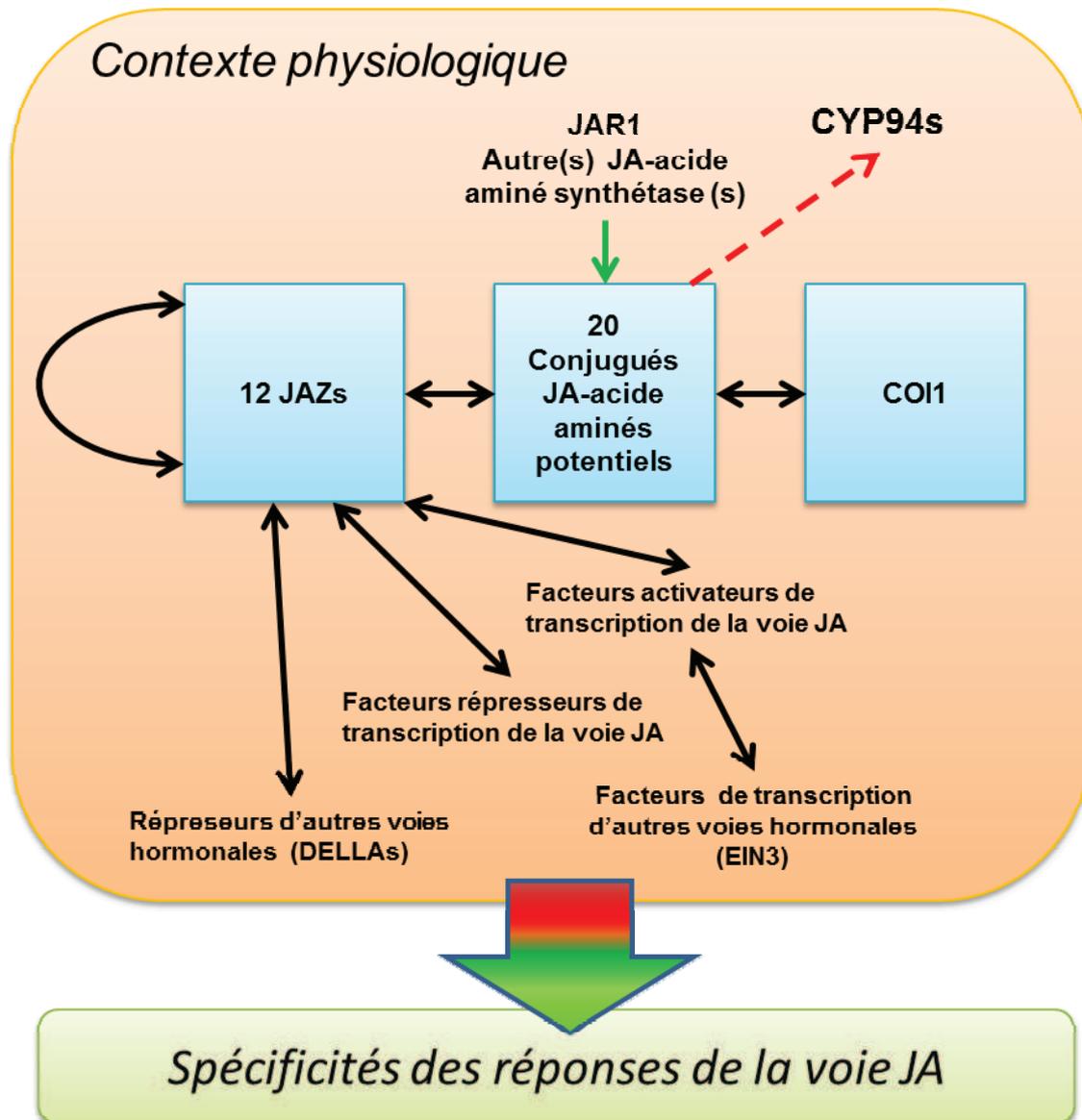


Figure 8-5 : La spécificité des réponses aux jasmonates dépend de nombreux acteurs protéiques et métaboliques présents selon le contexte physiologique. Leurs diverses interactions établissent des réseaux de régulation dynamiques engendrant des réponses inductibles et spécifiques attribuées à la voie JA.

8.6.4 Les CYP94s, enzymes clés pour la régulation d'un large panel de conjugués JA-acide aminés impliqués dans des réponses spécifiques ?

Des conjugués d'acides aminés avec des hormones ou des dérivés lipidiques sont aussi présents chez les bactéries (Roberto et al., 1990), les champignons (Castillo et al., 2014) et les animaux (Salmon et Higgs, 1987). Chez ces derniers, ils sont principalement représentés par les leucotriènes qui sont des médiateurs de l'inflammation, résultant de la conjugaison entre un dérivé de l'acide arachidonique et différents acides aminés (ex : cystéine, glycine, acide glutamique). Les P450s jouent également un rôle dans l'inactivation des leucotriènes (Sehgal et al., 2011). Il est intéressant de noter que l'acide arachidonique est le précurseur des prostaglandines qui équivalent les jasmonates chez les plantes.

Les réactions d'oxydation sont irréversibles et thermodynamiquement défavorables (Schlichting et al., 2000). Pour contourner ce problème, les plantes ont élaboré des P450s caractérisés par une forte spécificité de substrat, le substrat devant être étroitement fixé au site actif pour positionner l'atome cible du substrat à proximité de l'oxygène activé au niveau de l'hème (groupe Fe⁴⁺-oxo). Cette spécificité de substrat est bien illustrée pour les P450s impliqués dans le métabolisme des brassinostéroïdes (Nomura et Bishop, 2006; Mizutani et Ohta, 2010). En effet, 10 P450s distincts catalysent des réactions sur des substrats presque identiques. Les résultats concernant la caractérisation de CYP94C1 métabolisant des acides gras saturés ou insaturés et de longueur de chaîne variable (C12 à C18) (Kandel et al., 2007), JA-Ile (Heitz et al., 2012) et JA-Phe suggèrent que cette enzyme a une conformation inhabituellement relâchée.

Il est possible que les membres de la famille CYP94 d'*Arabidopsis thaliana* aient évolué avec une large spécificité de substrat inhabituelle afin d'être capables de métaboliser de nombreux dérivés avec un nombre limité de P450s. La figure 8-6 montre la phylogénie de *CYP94s*. Nous avons caractérisé 3 des 6 CYP94s d'*Arabidopsis thaliana*. Nous avons déterminé que CYP94B2 est capable de métaboliser JA-Ile *in vitro*, cependant son activité *in vivo* reste à établir car nous n'avons pas encore trouvé de conditions physiologiques dans lesquelles son gène soit clairement exprimé. CYP94D1 et CYP94D2 n'apparaissent pas liés à la voie jasmonate dans les outils de co-régulation et ne métabolisent pas JA-Ile dans nos conditions expérimentales. Les CYP94s du clade D métabolisent donc probablement d'autres types de substrats qui sont actuellement totalement inconnus.

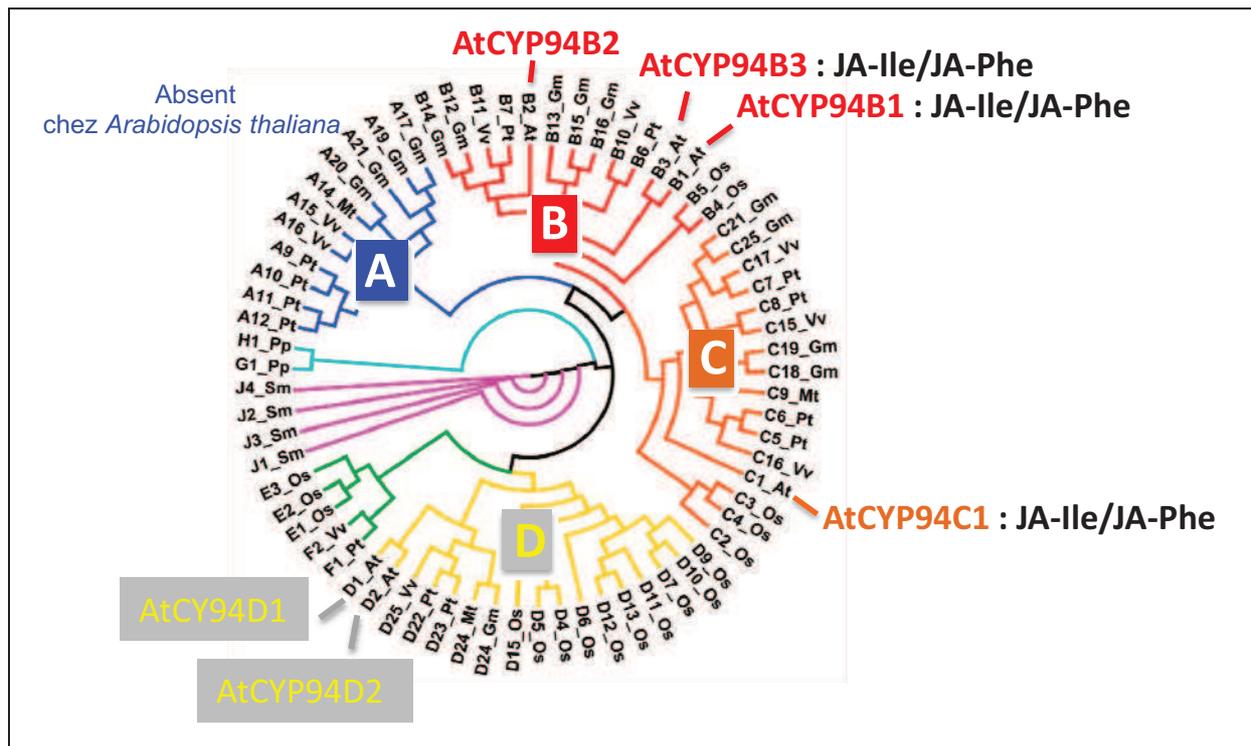
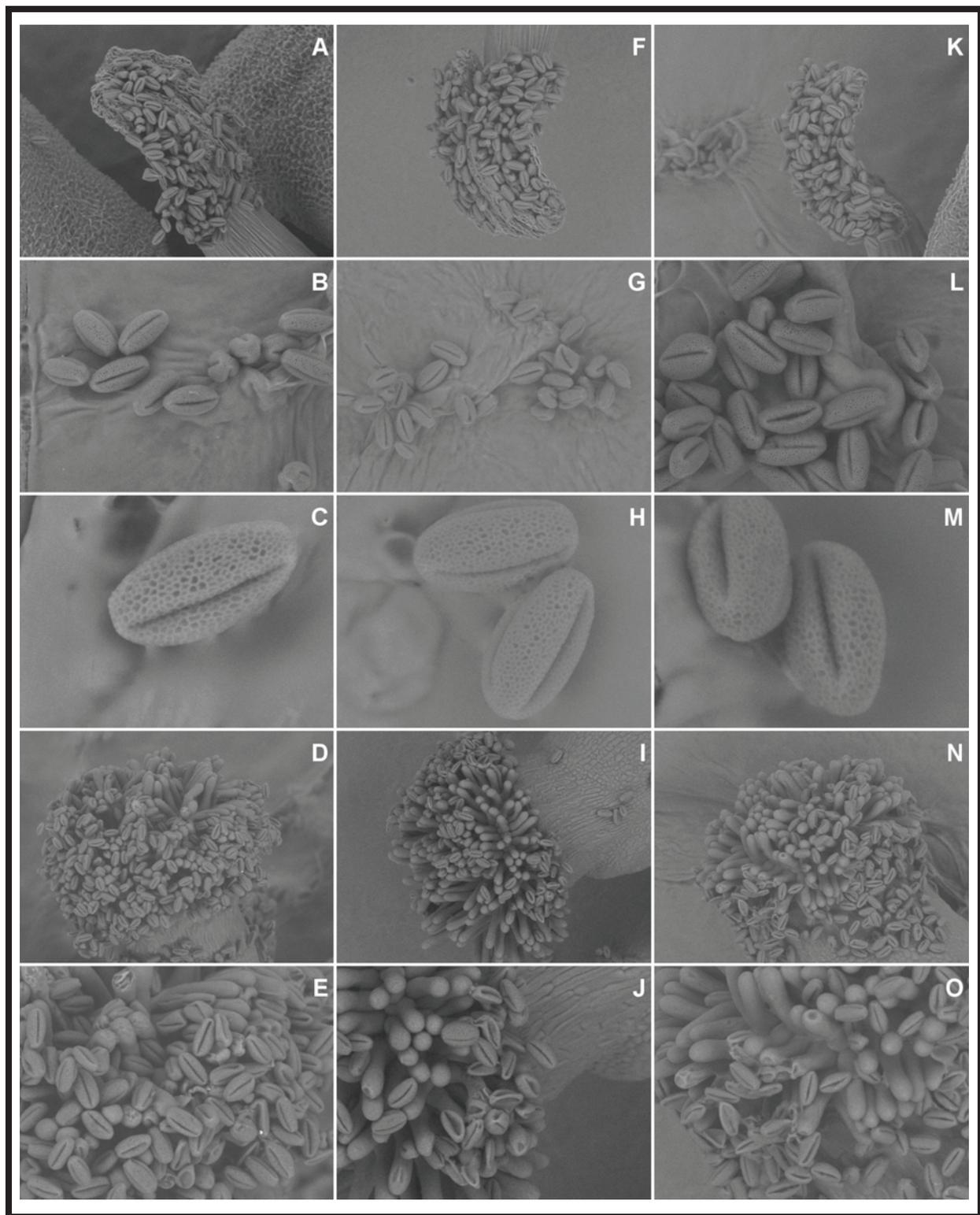


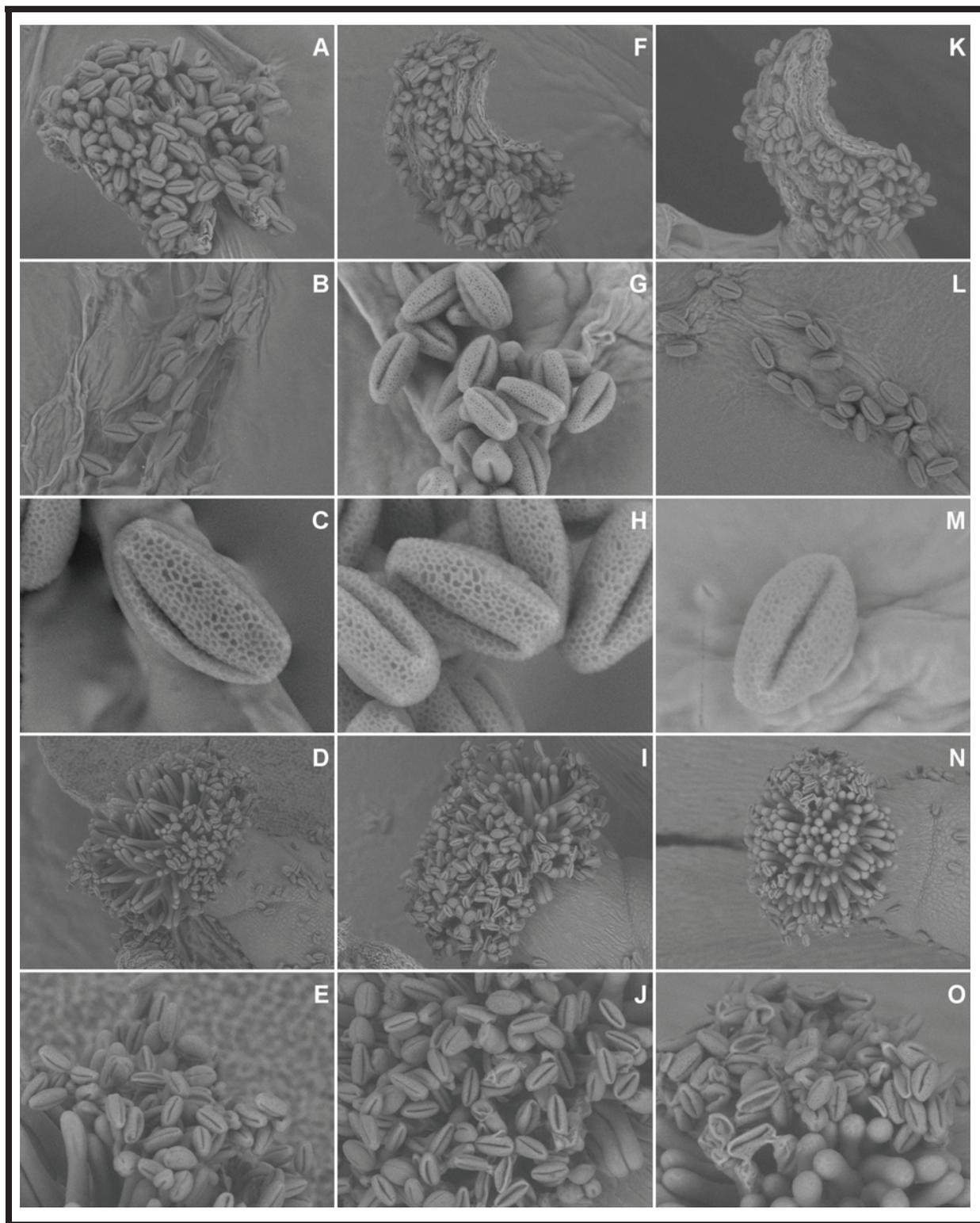
Figure 8-6 : Phylogénie des CYP94s. Les clades B, C et D sont représentés chez *Arabidopsis thaliana*. CYP94B1, CYP94B3 et CYP94C1 métabolisent les conjugués de jasmonate JA-Ile et JA-Phe. Les substrats de CYP94B2 et des 2 membres du clade D restent à établir. D'après (Koo et Howe, 2012).

Le métabolisme des différents JA-acide aminés pourrait être testé à l'avenir. Les outils biochimiques, moléculaires et génétiques sont disponibles pour continuer à déterminer la signification physiologique de ces molécules signales et leur métabolisation par les P450s dans les plantes.

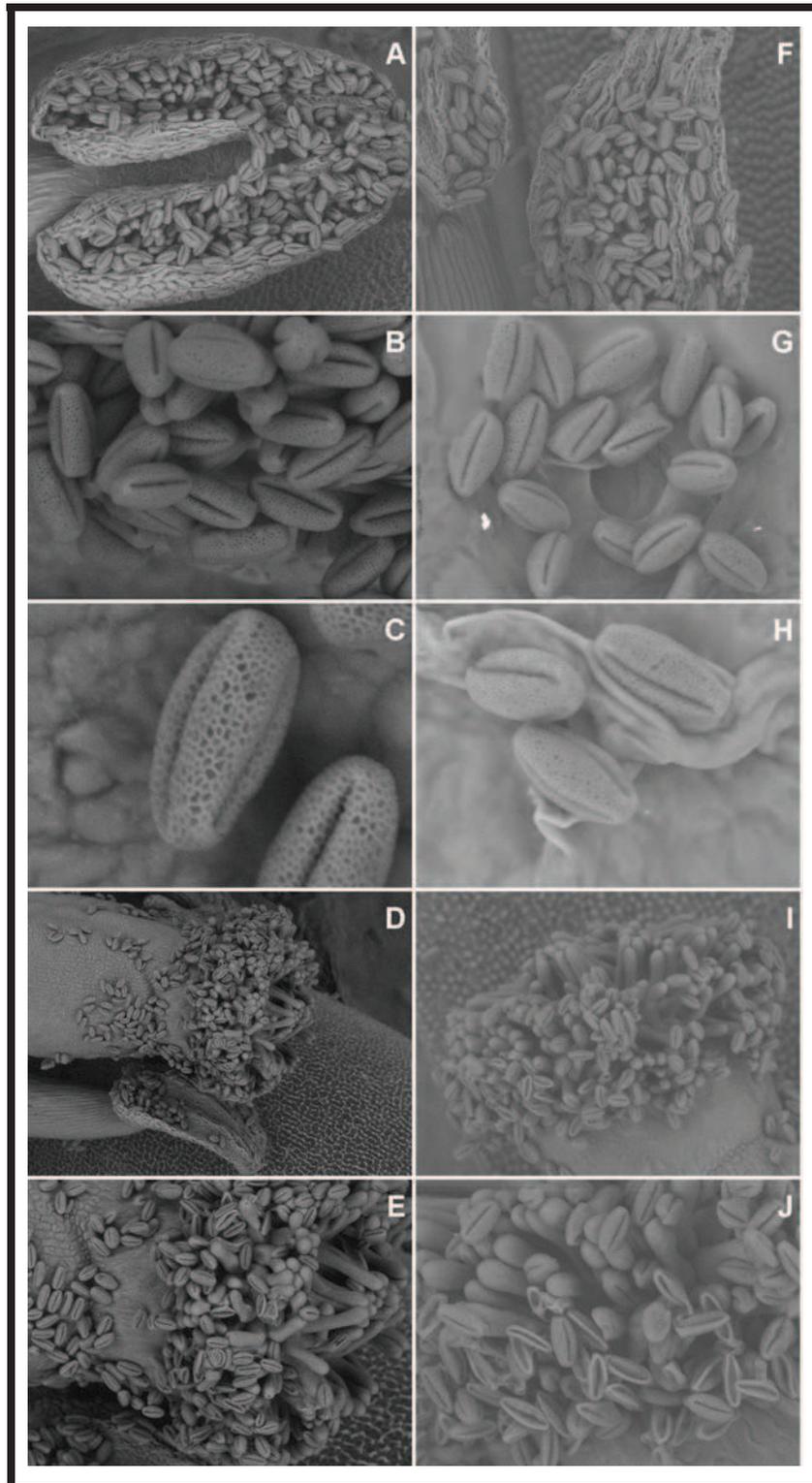
Annexes



Annexe 1 : Photographies d'observations d'anthere (A, F et K), de grains de pollen isolés (B, C, G, H, L et M) et de papilles stigmatiques (D, E, I, J, N et O) de plantes de type sauvage Col0 (A à E), *cyp94b1* (F à J) et *cyp94b3* (K à O) réalisées avec un miniMEB.



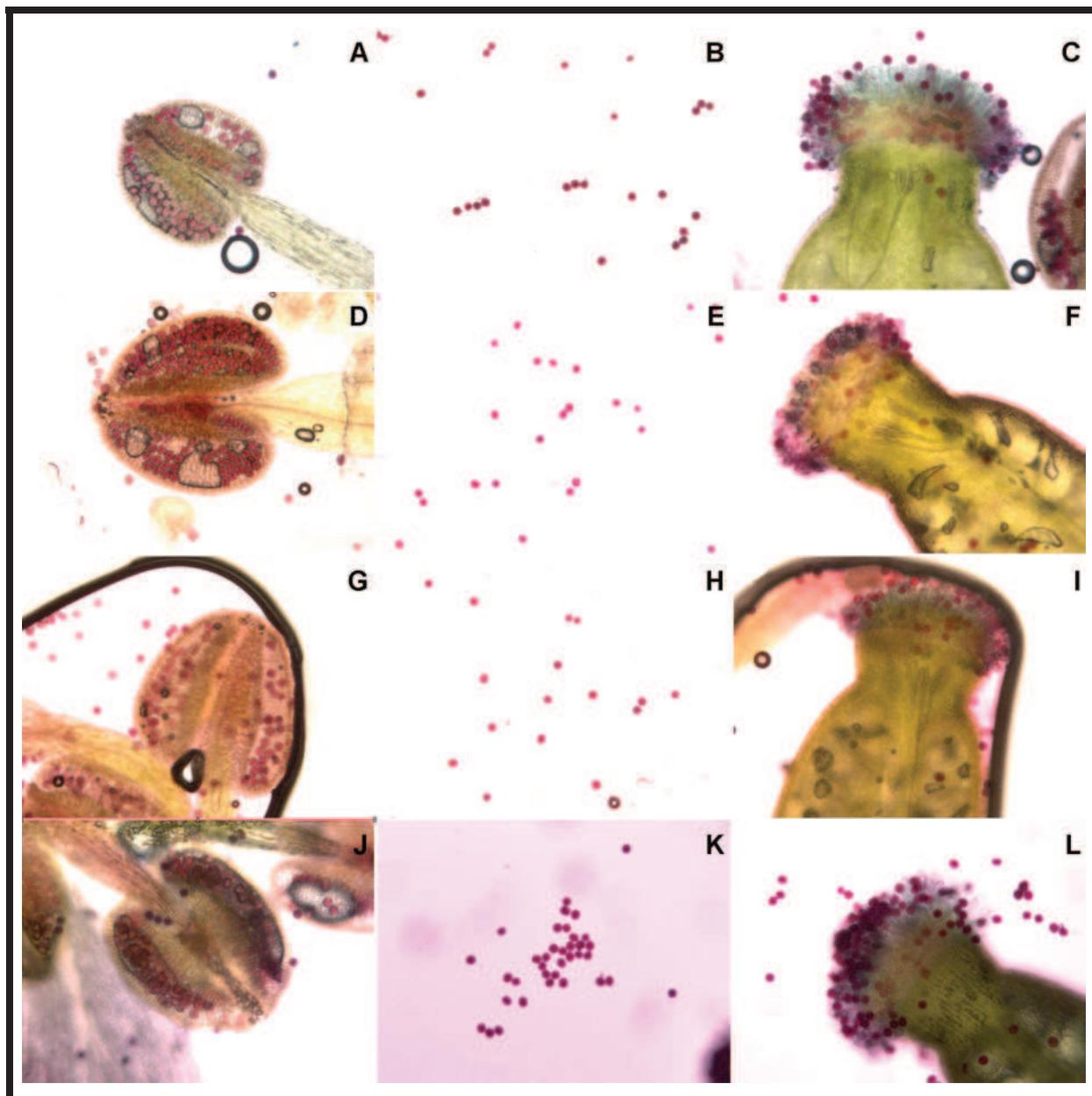
Annexe 2 : Photographies d'observations d'anthere (A, F et K), de grains de pollen isolés (B, C, G, H, L et M) et de papilles stigmatiques (D, E, I, J, N et O) de plantes *cyp94c1* (A à E), *OECYP94C1* (F à J) et *OECYP94B3* (K à O) réalisées avec un miniMEB.



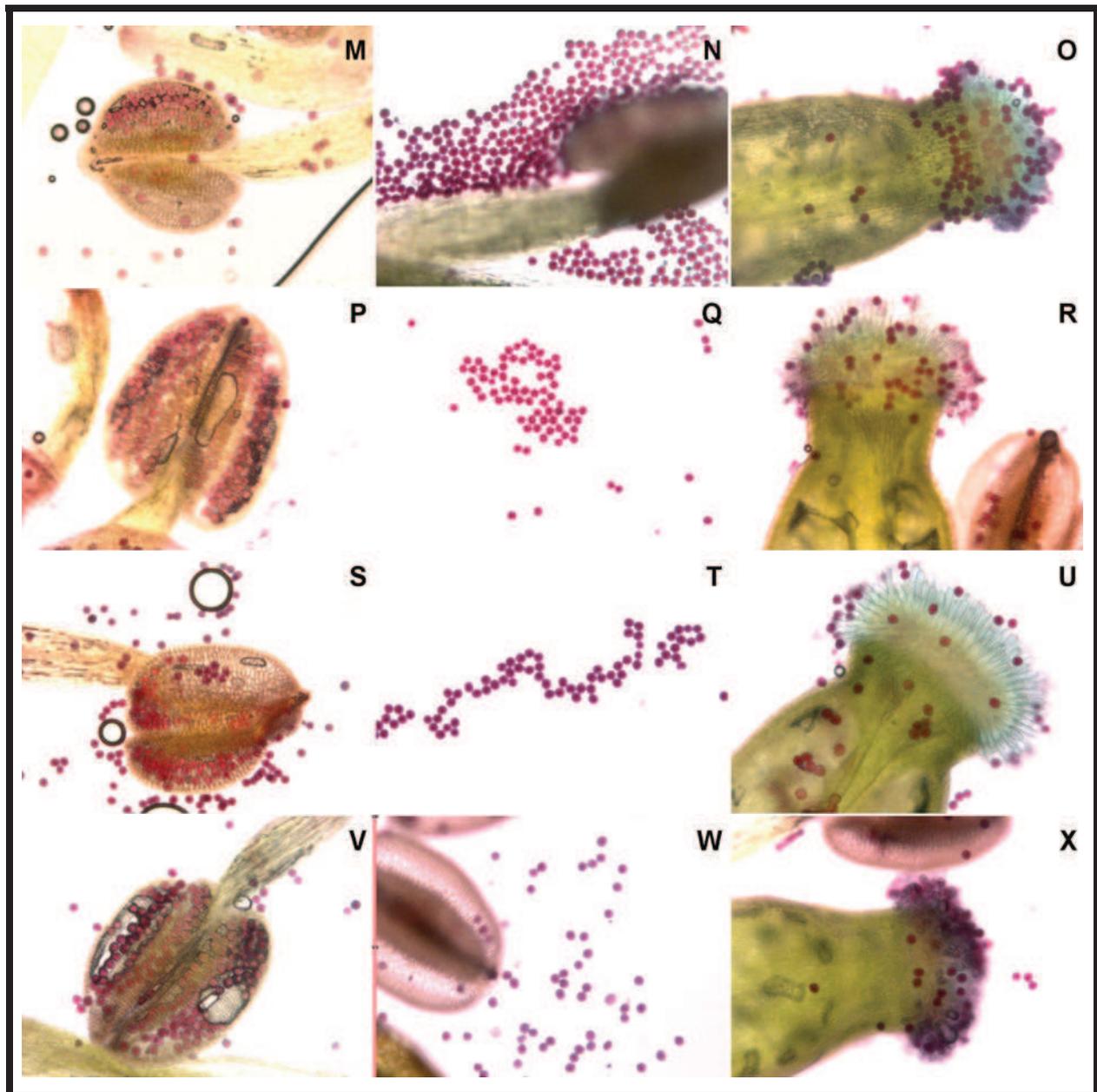
Annexe 3 : Photographies d'observations d'anthere (A, F et K), de grains de pollen isolés (B, C, G, H, L et M) et de papilles stigmatiques (D, E, I, J, N et O) de plantes *cyp94b3c1* (A à E) et *cyp94b1b3c1* (F à J) réalisées avec un miniMEB.



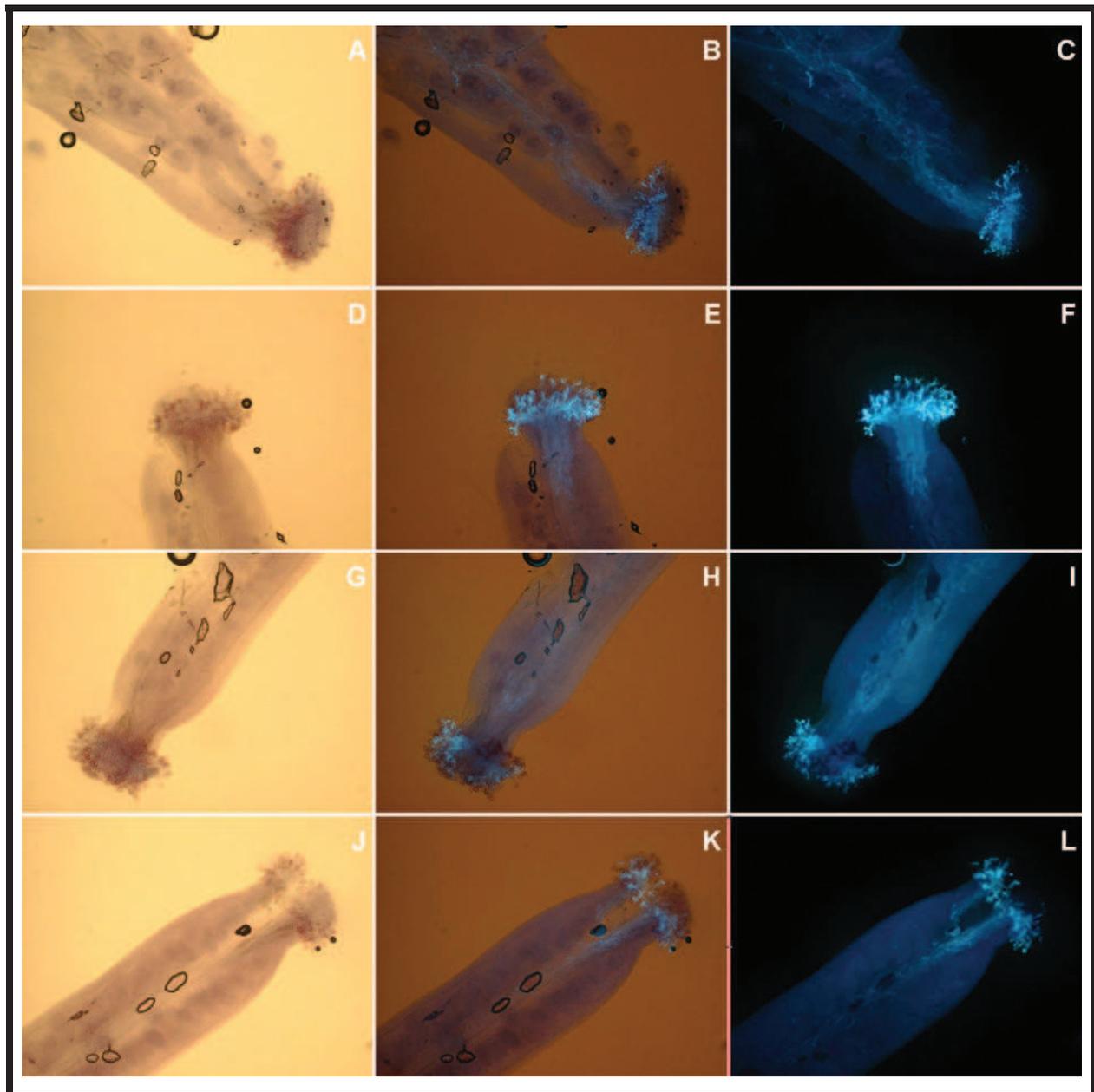
Annexe 4 : Observations au miniMEB de fleurs de type sauvage Col0 (A à J) ou sur-exprimant CYP94C1 (K à R). Les photos A à J présentent des fleurs différentes, hormis la photo H qui est un zoom de la fleur de la photo C. Les photos K à O montrent des fleurs différentes. Les observations P, Q et R sont respectivement des zooms des fleurs présentées en L, M et O.



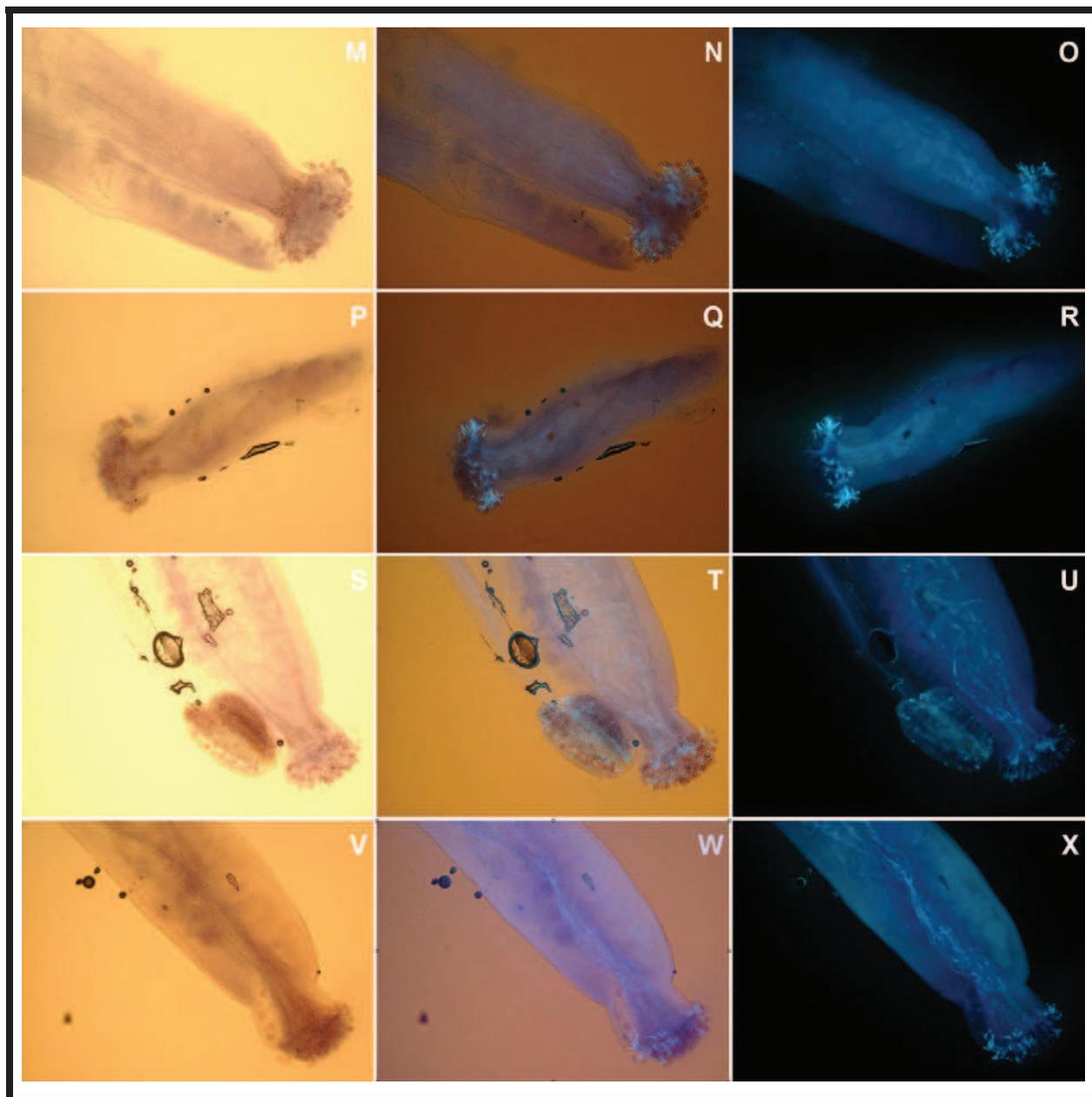
Annexe 5 : Photographies de grains de pollen traités avec la solution d'Alexander : dans l'anthere (colonne de gauche), isolés (colonne centrale) et au niveau des papilles stigmatiques du pistil (colonne de droite) de Col0 (A à C), *cyp94b1* (D à F) et *cyp94b3* (G à I) et *cyp94c1* (J à L).



Annexe 6 : Photographies de grains de pollen traités avec la solution d'Alexander : dans l'anthere (colonne de gauche), isolés (colonne centrale) et au niveau des papilles stigmatiques du pistil (colonne de droite) de *cyp94b3c1* (M à O), *cyp94b1b3c1* (P à R) *OECYP94B3* (S à U) et *OECYP94C1* (V à X).



Annexe 7 : Observations de tubes polliniques sous lumière UV après coloration au bleu d'aniline. Observations sous lumière blanche (colonne de gauche), lumière blanche et UV (colonne centrale), ou UV (colonne de droite) de Col0 (A à C), *cyp94b1* (DEF), *cyp94b3* (GHI) et *cyp94c1* (JKL).



Annexe 8 : Observations de tubes polliniques sous lumière UV après coloration au bleu d'aniline. Observations sous lumière blanche (colonne de gauche), lumière blanche et UV (colonne centrale), ou UV (colonne de droite) de *cyp94b3c1* (M à O), *cyp94b1b3c1* (P à R), *OECYP94B3* (S à U) et *OECYP94C1* (V à X).

Bibliographie

Bibliographie

- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., and Harberd, N.P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* **131**, 3357-3365.
- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., and Harberd, N.P. (2007). The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6484-6489.
- Acosta, I.F., and Farmer, E.E. (2010). Jasmonates. *Arabidopsis Book* **8**, e0129.
- Alexander, M.P. (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* **44**, 117-122.
- Allen, R.S., Li, J., Stahle, M.I., Dubroue, A., Gubler, F., and Millar, A.A. (2007). Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16371-16376.
- Alvarez-Buylla, E.R., Benitez, M., Corvera-Poire, A., Chaos Cador, A., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., Garcia-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Perez-Ruiz, R.V., Pineyro-Nelson, A., and Sanchez-Corrales, Y.E. (2010). Flower development. *Arabidopsis Book* **8**, e0127.
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Hofer, R., Paquette, S., and Werck-Reichhart, D. (2011). Cytochromes p450. *Arabidopsis Book* **9**, e0144.
- Barrow, J.R. (1983). Comparisons among pollen viability Measurement methods in cotton. *Crop Science* **23**, 734-736.
- Bartel, B., and Fink, G.R. (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* **268**, 1745-1748.
- Benveniste, I., Tijet, N., Adas, F., Philipps, G., Salaun, J.P., and Durst, F. (1998). CYP86A1 from Arabidopsis thaliana encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 688-693.
- Benveniste, I., Bronner, R., Wang, Y., Compagnon, V., Michler, P., Schreiber, L., Salaun, J.P., Durst, F., and Pinot, F. (2005). CYP94A1, a plant cytochrome P450-catalyzing fatty acid omega-hydroxylase, is selectively induced by chemical stress in Vicia sativa seedlings. *Planta* **221**, 881-890.
- Bitto, E., Bingman, C.A., Bittova, L., Houston, N.L., Boston, R.S., Fox, B.G., and Phillips, G.N., Jr. (2009). X-ray structure of ILL2, an auxin-conjugate amidohydrolase from Arabidopsis thaliana. *Proteins* **74**, 61-71.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.Q., and Zenk, M.H. (1995). The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4099-4105.
- Boughton, A.J., Hoover, K., and Felton, G.W. (2005). Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, Lycopersicon esculentum. *J Chem Ecol* **31**, 2211-2216.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 183-205.
- Browse, J., and Howe, G.A. (2008). New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol* **146**, 832-838.
- Brückner, C., Kramell, R., Schneider, G., Schmidt, J., Preiss, A., Sembdner, G., and Schreiber, K. (1988). N-[(-)-Jasmonoyl]-s-tryptophan and a related tryptophan conjugate from *Vicia faba*. *Phytochemistry* **27**, 275-276.
- Burg, S.P., and Burg, E.A. (1962). Role of Ethylene in Fruit Ripening. *Plant Physiol* **37**, 179-189.
- Campanella, J.J., Larko, D., and Smalley, J. (2003). A molecular phylogenomic analysis of the ILR1-like family of IAA amidohydrolase genes. *Comp Funct Genomics* **4**, 584-600.
- Capella, A.N., Menossi, M., Arruda, P., and Benedetti, C.E. (2001). COI1 affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in Arabidopsis. *Planta* **213**, 691-699.
- Castillo, G., Torrecillas, A., Nogueiras, C., Michelena, G., Sanchez-Bravo, J., and Acosta, M. (2014). Simultaneous quantification of phytohormones in fermentation extracts of Botryodiplodia theobromae by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *World J Microbiol Biotechnol*.
- Cecchetti, V., Altamura, M.M., Falasca, G., Costantino, P., and Cardarelli, M. (2008). Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* **20**, 1760-1774.
- Chen, M., Maodzeka, A., Zhou, L., Ali, E., Wang, Z., and Jiang, L. (2014). Removal of DELLA repression promotes leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Sci* **219-220**, 26-34.
- Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H.M., Cheng, Z., Xie, D., and Peng, J. (2009). Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in Arabidopsis. *PLoS Genet* **5**, e1000440.

- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J.** (2004). Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**, 1055-1064.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y.** (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**, 1790-1799.
- Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y., and Xie, D.** (2011). The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in Arabidopsis. *Mol Plant* **4**, 279-288.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-671.
- Chua, L., Shan, X., Wang, J., Peng, W., Zhang, G., and Xie, D.** (2010). Proteomics study of COI1-regulated proteins in Arabidopsis flower. *J Integr Plant Biol* **52**, 410-419.
- Chung, H.S., and Howe, G.A.** (2009). A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 131-145.
- Chung, H.S., Niu, Y., Browse, J., and Howe, G.A.** (2009). Top hits in contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling. *Phytochemistry* **70**, 1547-1559.
- Chung, H.S., Koo, A.J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D., and Howe, G.A.** (2008). Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* **146**, 952-964.
- 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.
- Coon, M.J.** (2005). Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 1-25.
- Dave, A., Hernandez, M.L., He, Z., Andriotis, V.M., Vaistij, F.E., Larson, T.R., and Graham, I.A.** (2011). 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 583-599.
- Davies, R.T., Goetz, D.H., Lasswell, J., Anderson, M.N., and Bartel, B.** (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 365-376.
- Demianski, A.J., Chung, K.M., and Kunkel, B.N.** (2012). Analysis of Arabidopsis JAZ gene expression during Pseudomonas syringae pathogenesis. *Mol Plant Pathol* **13**, 46-57.
- Denance, N., Sanchez-Vallet, A., Goffner, D., and Molina, A.** (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front Plant Sci* **4**, 155.
- Depuydt, S., and Hardtke, C.S.** (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol* **21**, R365-373.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T., and Turner, J.G.** (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* **58**, 497-513.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J* **32**, 457-466.
- Di Donna, L., Taverna, D., Mazzotti, F., Benabdelkamel, H., Attya, M., Napoli, A., and Sindona, G.** (2013). Comprehensive assay of flavanones in citrus juices and beverages by UHPLC-ESI-MS/MS and derivatization chemistry. *Food Chem* **141**, 2328-2333.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 185-209.
- Durst, F., and O'Keefe, D.P.** (1995). Plant cytochromes P450: an overview. *Drug Metabol Drug Interact* **12**, 171-187.
- Ehrling, 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 Biol* **8**, 47.
- Erb, M., and Glauser, G.** (2010). Family business: multiple members of major phytohormone classes orchestrate plant stress responses. *Chemistry* **16**, 10280-10289.
- Erb, M., Meldau, S., and Howe, G.A.** (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci* **17**, 250-259.
- Farmer, E.E.** (2001). Surface-to-air signals. *Nature* **411**, 854-856.
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A.** (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7713-7716.
- Farmer, E.E., and Dubugnon, L.** (2009). Detritivorous crustaceans become herbivores on jasmonate-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 935-940.

- Farmer, E.E., Almeras, E., and Krishnamurthy, V.** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 372-378.
- Fernandez-Calvo, P., Chini, A., Fernandez-Barbero, G., Chico, J.M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M.I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G., and Solano, R.** (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**, 701-715.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G.** (1994). Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**, 751-759.
- Fonseca, S., Chico, J.M., and Solano, R.** (2009a). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 539-547.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamburger, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., and Solano, R.** (2009b). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**, 344-350.
- Fujita, S., Ohnishi, T., Watanabe, B., Yokota, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Sakata, K., and Mizutani, M.** (2006). Arabidopsis CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. *Plant J* **45**, 765-774.
- Furstenberg-Hagg, J., Zagrobelny, M., and Bak, S.** (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *Int J Mol Sci* **14**, 10242-10297.
- Ge, X., Chang, F., and Ma, H.** (2010). Signaling and transcriptional control of reproductive development in Arabidopsis. *Curr Biol* **20**, R988-997.
- Gidda, S.K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., and Varin, L.** (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **278**, 17895-17900.
- Gimenez-Ibanez, S., and Solano, R.** (2013). Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Front Plant Sci* **4**, 72.
- Glaser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E.E., and Wolfender, J.L.** (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in Arabidopsis in response to wounding. *J Biol Chem* **283**, 16400-16407.
- Glawischnig, E.** (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in the biosynthesis of camalexin. *Biochem Soc Trans* **34**, 1206-1208.
- Goetz, S., Hellwege, A., Stenzel, I., Kutter, C., Hauptmann, V., Forner, S., McCaig, B., Hause, G., Miersch, O., Wasternack, C., and Hause, B.** (2012). Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiol* **158**, 1715-1727.
- Gonzales-Vigil, E., Bianchetti, C.M., Phillips, G.N., Jr., and Howe, G.A.** (2011). Adaptive evolution of threonine deaminase in plant defense against insect herbivores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5897-5902.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., and Thomas, S.G.** (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 3399-3414.
- Guranowski, A., Miersch, O., Staswick, P.E., Suza, W., and Wasternack, C.** (2007). Substrate specificity and products of side-reactions catalyzed by jasmonate:amino acid synthetase (JAR1). *FEBS Lett* **581**, 815-820.
- Hause, B., Mrosk, C., Isayenkov, S., and Strack, D.** (2007). Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* **68**, 101-110.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J., and Wasternack, C.** (2000). Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J* **24**, 113-126.
- Hedden, P., and Thomas, S.G.** (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* **444**, 11-25.
- Heitz, T., Bergey, D.R., and Ryan, C.A.** (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **114**, 1085-1093.
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Desaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., Werck-Reichhart, D., and Pinot, F.** (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.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., and Peacock, W.J.** (2001). The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2065-2070.

- Helliwell, C.A., Sheldon, C.C., Olive, M.R., Walker, A.R., Zeevaert, J.A., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1998). Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9019-9024.
- Hertel, S.C., Knofel, H.D., Kramell, R., and Miersch, O. (1997). Partial purification and characterization of a jasmonic acid conjugate cleaving amidohydrolase from the fungus *Botryodiplodia theobromae*. *FEBS Lett* **407**, 105-110.
- Holopainen, J.K., and Blande, J.D. (2012). Molecular plant volatile communication. *Adv Exp Med Biol* **739**, 17-31.
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J., and Ryan, C.A. (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**, 2067-2077.
- Hu, J., Mitchum, M.G., Barnaby, N., Ayele, B.T., Ogawa, M., Nam, E., Lai, W.C., Hanada, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Swain, S.M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2008). Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 320-336.
- Hu, P., Zhou, W., Cheng, Z., Fan, M., Wang, L., and Xie, D. (2013). JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense. *Mol Cell* **50**, 504-515.
- Irmisch, S., McCormick, A.C., Boeckler, G.A., Schmidt, A., Reichelt, M., Schneider, B., Block, K., Schnitzler, J.P., Gershenzon, J., Unsicker, S.B., and Kollner, T.G. (2013). Two herbivore-induced cytochrome P450 enzymes CYP79D6 and CYP79D7 catalyze the formation of volatile aldoximes involved in poplar defense. *Plant Cell* **25**, 4737-4754.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 2191-2209.
- Ito, T., Ng, K.H., Lim, T.S., Yu, H., and Meyerowitz, E.M. (2007). The homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 3516-3529.
- Jakubowska, A., and Kowalczyk, S. (2005). A specific enzyme hydrolyzing 6-O(4-O)-indole-3-ylacetyl-beta-D-glucose in immature kernels of *Zea mays*. *J Plant Physiol* **162**, 207-213.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**, 3901-3907.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kandel, S., Sauveplane, V., Compagnon, V., Franke, R., Millet, Y., Schreiber, L., Werck-Reichhart, D., and 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.
- Kaspera, R., and Croteau, R. (2006). Cytochrome P450 oxygenases of Taxol biosynthesis. *Phytochem Rev* **5**, 433-444.
- Kastner, P.E., Le Calvé, S., Diss, L., Sauveplane, V., Franke, R., Schreiber, L., and Pinot, F. (2011). Specific accumulation of CYP94A1 transcripts after exposure to gaseous benzaldehyde: induction of lauric acid omega-hydroxylase activity in *Vicia sativa* exposed to atmospheric pollutants. *Environ Res* **111**, 37-44.
- Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J., and 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., and Howe, G.A. (2008b). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7100-7105.
- Kazan, K., and Manners, J.M. (2012). JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**, 22-31.
- Kinoshita-Tsujimura, K., and Kakimoto, T. (2011). Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* **6**, 66-71.
- Kinoshita, N., Wang, H., Kasahara, H., Liu, J., Macpherson, C., Machida, Y., Kamiya, Y., Hannah, M.A., and Chua, N.H. (2012). IAA-Ala Resistant3, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates Arabidopsis root architecture changes during high osmotic stress. *Plant Cell* **24**, 3590-3602.
- Kitaoka, N., Kawaide, H., Amano, N., Matsubara, T., Nabeta, K., Takahashi, K., and Matsuura, H. (2014). CYP94B3 activity against jasmonic acid amino acid conjugates and the elucidation of 12-O-beta-glucopyranosyl-jasmonoyl-L-isoleucine as an additional metabolite. *Phytochemistry* **99**, 6-13.
- Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., Matsui, H., Nabeta, K., and 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.
- Kolattukudy, P.E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* **208**, 990-1000.

- Koo, A.J., and Howe, G.A.** (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**, 1571-1580.
- Koo, A.J., Cooke, T.F., and 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., Chung, H.S., Kobayashi, Y., and Howe, G.A.** (2006). Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **281**, 33511-33520.
- Koo, A.J., Gao, X., Jones, A.D., and 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., and Howe, G.A.** (2012). Catabolism and Deactivation of the Lipid-Derived Hormone Jasmonoyl-Isoleucine. *Front Plant Sci* **3**.
- Kowalczyk, M., and Sandberg, G.** (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**, 1845-1853.
- Kramell, R., Schmidt, J., Herrmann, G., and Schliemann, W.** (2005). N-(jasmonoyl)tyrosine-derived compounds from flowers of broad beans (*Vicia faba*). *J Nat Prod* **68**, 1345-1349.
- Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B., and Wasternack, C.** (1997). Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Lett* **414**, 197-202.
- Kubigsteltig, I., Laudert, D., and Weiler, E.W.** (1999). Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* **208**, 463-471.
- La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., and Heitz, T.** (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev* **198**, 267-284.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Hollander-Czytko, H., and Weiler, E.W.** (1996). Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol* **31**, 323-335.
- Łaźniewska, J., Macioszek, V., Lawrence, C., and Kononowicz, A.** (2010). Fight to the death: *Arabidopsis thaliana* defense response to fungal necrotrophic pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* **32**, 1-10.
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R.A., Matsuda, S.P., and Bartel, B.** (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 20446-20452.
- Leon, J., Rojo, E., Titarenko, E., and Sanchez-Serrano, J.J.** (1998). Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **258**, 412-419.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., and Howe, G.A.** (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* **16**, 126-143.
- Ljung, K.** (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**, 943-950.
- Ludwig-Muller, J.** (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* **62**, 1757-1773.
- Mafli, A., Goudet, J., and Farmer, E.E.** (2012). Plants and tortoises: mutations in the *Arabidopsis* jasmonate pathway increase feeding in a vertebrate herbivore. *Mol Ecol* **21**, 2534-2541.
- Mandaokar, A., and Browse, J.** (2009). MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**, 851-862.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B.M., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., Choi, G., and Browse, J.** (2006). Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J* **46**, 984-1008.
- McConn, M., and Browse, J.** (1996). The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant. *Plant Cell* **8**, 403-416.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., and Browse, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5473-5477.
- Mengiste, T.** (2012). Plant immunity to necrotrophs. *Annu Rev Phytopathol* **50**, 267-294.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., and Wasternack, C.** (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* **177**, 114-127.
- Millar, A.A., and Gubler, F.** (2005). The *Arabidopsis* GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* **17**, 705-721.
- Millar, A.A., Jacobsen, J.V., Ross, J.J., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Scofield, G., Reid, J.B., and Gubler, F.** (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J* **45**, 942-954.

- Miquel, M., and Browse, J.** (1992). Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J Biol Chem* **267**, 1502-1509.
- Mithofer, A., and Boland, W.** (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 431-450.
- Mizutani, M., and Ohta, D.** (2010). Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 291-315.
- Morant, M., Jorgensen, K., Schaller, H., Pinot, F., Moller, 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.
- Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L.S., Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Alonso, J.M., Cohen, J.D., Farmer, E.E., Ecker, J.R., and Reed, J.W.** (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**, 4107-4118.
- Nakamura, Y., Mithofer, A., Kombrink, E., Boland, W., Hamamoto, S., Uozumi, N., Tohma, K., and Ueda, M.** (2011). 12-hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiol* **155**, 1226-1236.
- Nakata, M., and Ohme-Takagi, M.** (2013). Two bHLH-type transcription factors, JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE2 and JAM3, are transcriptional repressors and affect male fertility. *Plant Signal Behav* **8**, e26473.
- Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A.J., Moreno, J.E., Suzuki, K., Howe, G.A., and Ohme-Takagi, M.** (2013). A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 1641-1656.
- Nebert, D.W., Wikvall, K., and Miller, W.L.** (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**, 20120431.
- Nelson, D.** (2006). Plant cytochrome P450s from moss to poplar. *Phytochem Rev* **5**, 193-204.
- Nelson, D., and Werck-Reichhart, D.** (2011). A P450-centric view of plant evolution. *Plant J* **66**, 194-211.
- Nelson, D.R., Schuler, M.A., Paquette, S.M., Werck-Reichhart, D., and Bak, S.** (2004). Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol* **135**, 756-772.
- Nelson, M.R., Band, L.R., Dyson, R.J., Lessinnes, T., Wells, D.M., Yang, C., Everitt, N.M., Jensen, O.E., and Wilson, Z.A.** (2012). A biomechanical model of anther opening reveals the roles of dehydration and secondary thickening. *New Phytol* **196**, 1030-1037.
- Niu, Y., Figueroa, P., and Browse, J.** (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in Arabidopsis. *J Exp Bot* **62**, 2143-2154.
- Nomura, T., and Bishop, G.J.** (2006). Cytochrome P450s in plant steroid hormone synthesis and metabolism. *Phytochem Rev* **5**, 421.
- O'Connor, T.R., Dyreson, C., and Wyrick, J.J.** (2005). Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of Arabidopsis promoter sequences. *Bioinformatics* **21**, 4411-4413.
- Oh, Y., Baldwin, I.T., and Galis, I.** (2013). A jasmonate ZIM-domain protein NaJAZd regulates floral jasmonic acid levels and counteracts flower abscission in *Nicotiana attenuata* plants. *PLoS One* **8**, e57868.
- Omura, T., and Sato, R.** (1964). THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *J Biol Chem* **239**, 2370-2378.
- Östin, A., Kowalyczuk, M., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G.** (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiol* **118**, 285-296.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* **31**, 1-12.
- Pauwels, L., and Goossens, A.** (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**, 3089-3100.
- Pauwels, L., Inze, D., and Goossens, A.** (2009). Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci* **14**, 87-91.
- Pel, M.J., and Pieterse, C.M.** (2013). Microbial recognition and evasion of host immunity. *J Exp Bot* **64**, 1237-1248.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., and Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- Pinot, F., and Beisson, F.** (2011). Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS J* **278**, 195-205.

- Piotrowska, A., and Bajguz, A.** (2011). Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**, 2097-2112.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y., and Lopez-Molina, L.** (2008). The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* **20**, 2729-2745.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J.B.** (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* **13**, 236-246.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., and Urban, P.** (1996). Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol* **272**, 51-64.
- Preston, J., Wheeler, J., Heazlewood, J., Li, S.F., and Parish, R.W.** (2004). AtMYB32 is required for normal pollen development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **40**, 979-995.
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., and Baumeister, K.** (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**, 336-341.
- Qi, T., Huang, H., Wu, D., Yan, J., Qi, Y., Song, S., and Xie, D.** (2014). Arabidopsis DELLA and JAZ proteins bind the WD-repeat/bHLH/MYB complex to modulate gibberellin and jasmonate signaling synergy. *Plant Cell* **26**, 1118-1133.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., and Xie, D.** (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **23**, 1795-1814.
- Quilichini, T.D., Grienenberger, E., and Douglas, C.J.** (2014). The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry*.
- Rampey, R.A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G., and Bartel, B.** (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. *Plant Physiol* **135**, 978-988.
- Reeves, P.H., Ellis, C.M., Ploense, S.E., Wu, M.F., Yadav, V., Tholl, D., Chetelat, A., Haupt, I., Kennerley, B.J., Hodgens, C., Farmer, E.E., Nagpal, P., and Reed, J.W.** (2012). A regulatory network for coordinated flower maturation. *PLoS Genet* **8**, e1002506.
- Regan, S.M., and Moffatt, B.A.** (1990). Cytochemical Analysis of Pollen Development in Wild-Type Arabidopsis and a Male-Sterile Mutant. *Plant Cell* **2**, 877-889.
- Ren, C., Pan, J., Peng, W., Genschik, P., Hobbie, L., Hellmann, H., Estelle, M., Gao, B., Peng, J., Sun, C., and Xie, D.** (2005). Point mutations in Arabidopsis Cullin1 reveal its essential role in jasmonate response. *Plant J* **42**, 514-524.
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S.J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P.** (2008). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant J* **53**, 488-504.
- Roberto, F.F., Klee, H., White, F., Nordeen, R., and 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.
- Rowe, H.C., Walley, J.W., Corwin, J., Chan, E.K., Dehesh, K., and Kliebenstein, D.J.** (2010). Deficiencies in jasmonate-mediated plant defense reveal quantitative variation in *Botrytis cinerea* pathogenesis. *PLoS Pathog* **6**, e1000861.
- Ryan, C.A.** (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 112-121.
- Salmon, J.A., and Higgs, G.A.** (1987). Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br Med Bull* **43**, 285-296.
- Samach, A., Hareven, D., Gutfinger, T., Ken-Dror, S., and Lifschitz, E.** (1991). Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and upregulation in floral organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2678-2682.
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W., and Goldberg, R.B.** (2000). The arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* **12**, 1041-1061.
- Sanders, P.M., Bui, A.Q., K., W., K.N., M., Y.C., H., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P., and Goldberg, R.B.** (1999). Anther developmental defects in Arabidopsis thaliana male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod* **11**, 297-322.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

- Santner, A., and Estelle, M.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**, 1071-1078.
- Sasaki-Sekimoto, Y., Saito, H., Masuda, S., Shirasu, K., and Ohta, H.** (2014). Comprehensive analysis of protein interactions between JAZ proteins and bHLH transcription factors that negatively regulate jasmonate signaling. *Plant Signal Behav* **9**.
- Savchenko, T., and Dehesh, K.** (2014). Drought stress modulates oxylipin signature by eliciting 12-OPDA as a potent regulator of stomatal aperture. *Plant Signal Behav* **9**.
- Schaller, A., and Stintzi, A.** (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**, 1532-1538.
- Schaunstein, E., Esterbauer, H., and Zollner, H.** (1977). Saturated aldehydes. JR Lagando (ed) *Aldehydes in biological systems*, Methuen, New York, 1-24.
- Schillmiller, A.L., Koo, A.J., and Howe, G.A.** (2007). Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiol* **143**, 812-824.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S.A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A., and Sligar, S.G.** (2000). The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science* **287**, 1615-1622.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., and Lohmann, J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**, 501-506.
- Schweizer, F., Fernandez-Calvo, P., Zander, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., Lewsey, M.G., Ecker, J.R., Solano, R., and Reymond, P.** (2013). *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* **25**, 3117-3132.
- Sehgal, N., Agarwal, V., Valli, R.K., Joshi, S.D., Antonovic, L., Strobel, H.W., and Ravindranath, V.** (2011). Cytochrome P4504f, a potential therapeutic target limiting neuroinflammation. *Biochem Pharmacol* **82**, 53-64.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P., and De Bolle, M.F.** (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* **46**, 941-950.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4788-4793.
- Shan, X., Yan, J., and Xie, D.** (2012). Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 84-91.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A., and Zheng, N.** (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, 400-405.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H., and Yang, S.** (2012). Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 2578-2595.
- Shin, B., Choi, G., Yi, H., Yang, S., Cho, I., Kim, J., Lee, S., Paek, N.C., Kim, J.H., Song, P.S., and Choi, G.** (2002). AtMYB21, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant J* **30**, 23-32.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., and Xie, D.** (2013). Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin, and gibberellin in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **6**, 1065-1073.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., and Xie, D.** (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 1000-1013.
- Song, S., Huang, H., Gao, H., Wang, J., Wu, D., Liu, X., Yang, S., Zhai, Q., Li, C., Qi, T., and Xie, D.** (2014). Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 263-279.
- Staswick, P.** (2009a). Plant hormone conjugation: a signal decision. *Plant Signal Behav* **4**, 757-759.
- Staswick, P.E.** (2009b). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol* **150**, 1310-1321.
- Staswick, P.E., and Tiriyaki, I.** (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2117-2127.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6837-6840.

- Stenzel, I., Hause, B., Proels, R., Miersch, O., Oka, M., Roitsch, T., and Wasternack, C.** (2008). The AOC promoter of tomato is regulated by developmental and environmental stimuli. *Phytochemistry* **69**, 1859-1869.
- Stenzel, I., Otto, M., Delker, C., Kirmse, N., Schmidt, D., Miersch, O., Hause, B., and Wasternack, C.** (2012). ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization. *J Exp Bot* **63**, 6125-6138.
- Stintzi, A., and Browse, J.** (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10625-10630.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 447-456.
- Stumpe, M., and Feussner, I.** (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem Rev* **5**, 347-357.
- Sun, T.P., and Kamiya, Y.** (1994). The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509-1518.
- Suza, W.P., and Staswick, P.E.** (2008). The role of JAR1 in Jasmonoyl-L: -isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta* **227**, 1221-1232.
- Suza, W.P., Rowe, M.L., Hamberg, M., and Staswick, P.E.** (2010). A tomato enzyme synthesizes (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine in wounded leaves. *Planta* **231**, 717-728.
- Szerszen, J.B., Szczyglowski, K., and Bandurski, R.S.** (1994). *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* **265**, 1699-1701.
- Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C.E., Ueno, Y., Yamamoto, K.T., Machida, Y., Nakamura, K., and Ishiguro, S.** (2010). *Arabidopsis* auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant Cell Physiol* **51**, 164-175.
- Tam, Y.Y., Epstein, E., and Normanly, J.** (2000). Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol* **123**, 589-596.
- Tamogami, S., Rakwal, R., and 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.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E., and Yamamoto, K.T.** (2004). MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 379-393.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15107-15111.
- Tijet, N., Helvig, C., Pinot, F., Le Bouquin, R., Lesot, A., Durst, F., Salaun, J.P., and Benveniste, I.** (1998). Functional expression in yeast and characterization of a clofibrate-inducible plant cytochrome P-450 (CYP94A1) involved in cutin monomers synthesis. *Biochem J* **332**, 583-589.
- Titarenko, E., Rojo, E., Leon, J., and Sanchez-Serrano, J.J.** (1997). Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **115**, 817-826.
- Todoroki, Y., Narita, K., Muramatsu, T., Shimomura, H., Ohnishi, T., Mizutani, M., Ueno, K., and Hirai, N.** (2011). Synthesis and biological activity of amino acid conjugates of abscisic acid. *Bioorg Med Chem* **19**, 1743-1750.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N.J.** (2005). The Botany Array Resource: e-Northerns, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant J* **43**, 153-163.
- 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., and Neff, M.M.** (2005). BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant J* **42**, 23-34.
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M.C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Korbes, A.P., Memelink, J., Ritsema, T., Van Wees, S.C., and Pieterse, C.M.** (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOII-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* **25**, 744-761.

- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., and Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7209-7214.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F.** (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 177-206.
- Walz, A., Park, S., Slovin, J.P., Ludwig-Muller, J., Momonoki, Y.S., and Cohen, J.D.** (2002). A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1718-1723.
- Wang, L., Halitschke, R., Kang, J.H., Berg, A., Harnisch, F., and Baldwin, I.T.** (2007). Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine. *Planta* **226**, 159-167.
- Wang, Z., Dai, L., Jiang, Z., Peng, W., Zhang, L., Wang, G., and Xie, D.** (2005). GmCOI1, a soybean F-box protein gene, shows ability to mediate jasmonate-regulated plant defense and fertility in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1285-1295.
- Wasternack, C.** (2014). Perception, signaling and cross-talk of jasmonates and the seminal contributions of the Daoxin Xie's lab and the Chuanyou Li's lab. *Plant Cell Rep* **33**, 707-718.
- Wasternack, C., and 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., and 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.
- Wasternack, C., Forner, S., Strnad, M., and Hause, B.** (2013). Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie* **95**, 79-85.
- Wasternack, C., Goetz, S., Hellwege, A., Forner, S., Strnad, M., and Hause, B.** (2012). Another JA/COI1-independent role of OPDA detected in tomato embryo development. *Plant Signal Behav* **7**, 1349-1353.
- Weber, H., Vick, B.A., and Farmer, E.E.** (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10473-10478.
- Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R.** (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **1**, REVIEWS3003.
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., and Didierjean, L.** (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci* **5**, 116-123.
- White, S., Wimley, W., and Selsted, M.** (1995). Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 521-527.
- 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. *J Biol Chem* **288**, 31701-31714.
- Wild, M., Daviere, J.M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., and Achard, P.** (2012). The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* **24**, 3307-3319.
- Woldemariam, M.G., Onkokesung, N., Baldwin, I.T., and Galis, I.** (2012). Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *Plant J* **72**, 758-767.
- Wu, J., and Baldwin, I.T.** (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu Rev Genet* **44**, 1-24.
- Wu, M.F., Tian, Q., and Reed, J.W.** (2006). Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* **133**, 4211-4218.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G.** (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D.** (2002). The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 1919-1935.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D.** (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**, 2220-2236.
- Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., and Farmer, E.E.** (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**, 2470-2483.
- Ye, Q., Zhu, W., Li, L., Zhang, S., Yin, Y., Ma, H., and Wang, X.** (2010). Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in Arabidopsis anther and pollen development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 6100-6105.

- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J., and Okada, K.** (2009). Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in Arabidopsis. *Development* **136**, 1039-1048.
- Yoshihara, T., Omer, E.L.A., Koshino, H., Sakamura, S., Y., K., and Koda, Y.** (1989). 12-Hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiol* **155**, 1226-1236.
- Zhang, K., Halitschke, R., Yin, C., Liu, C.J., and Gan, S.S.** (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates Arabidopsis leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14807-14812.
- Zhao, Z., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, X., Liu, S., Yu, X., Ren, Y., Zheng, X., Zhou, K., Jiang, L., Guo, X., Gai, Y., Wu, C., Zhai, H., Wang, H., and Wan, J.** (2013). A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev Cell* **27**, 113-122.
- Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang, R., Li, P., Zhu, X., Mander, L.N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and He, Z.** (2006). ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18**, 442-456.
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., A, M., Jiang, Z., Kim, J.M., To, T.K., Li, W., Zhang, X., Yu, Q., Dong, Z., Chen, W.Q., Seki, M., Zhou, J.M., and Guo, H.** (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12539-12544.
- Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganai, M., and Wasternack, C.** (2000). Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J Biol Chem* **275**, 19132-19138.

Analyse fonctionnelle de cytochromes P450 de la famille CYP94 et des amido-hydrolases IAR3 et ILL6 dans le catabolisme hormonal des jasmonates chez *Arabidopsis thaliana*

Résumé

Les jasmonates jouent des rôles essentiels en réponse aux stress environnementaux et dans le développement des plantes. Jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), la forme hormonale active, est sous un contrôle métabolique strict.

Nos études biochimiques, génétiques et métaboliques ont montré que l'inactivation de JA-Ile est contrôlée par 2 voies, l'une oxydative par les cytochromes P450 CYP94 et l'autre hydrolytique par les amido-hydrolases IAR3 et ILL6. Ces enzymes définissent une grille métabolique vers de nombreux jasmonates. Ces conversions constituent un mécanisme général contrôlant le turnover de JA-Ile et les réponses induites, opérant après blessure, infection par le champignon *Botrytis cinerea* ou le développement floral. En outre, les CYP94s oxydent le conjugué Jasmonoyl-Phénylalanine (JA-Phe) accumulé dans les feuilles blessées. Les CYP94s catalysent la carboxylation de JA-Ile et de JA-Phe via un intermédiaire aldéhyde, le JA-Ile-aldéhyde étant accumulé *in vivo*.

Ces travaux élucident un nouveau catabolisme hormonal de plantes et son impact sur un réseau métabolique dynamique et complexe par l'action concertée de deux familles d'enzymes.

Mots clés : métabolisme des jasmonates, CYP94s, amido-hydrolases, *Arabidopsis thaliana*, blessure, *Botrytis cinerea*, fleur

Synopsis

Jasmonates are plant molecules playing essential roles in response to environmental stresses and in plant development. Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile) is an active hormonal form of jasmonates so it is crucial for the plant to control its levels.

Biochemical, genetic and metabolic studies showed that JA-Ile inactivation after wounding is controlled by two pathways, based on oxidations by cytochromes P450 of the CYP94 family and on cleavage by the amido-hydrolases IAR3 and ILL6. These enzymes also define a pathway for tuberonic acid (12OH-JA) production from JA. CYP94-catalyzed oxidations seem to be a general mechanism to control JA-Ile hormone turnover, jasmonate signaling and responses as it also occurs upon infection by the fungus *Botrytis cinerea* and in floral development. CYP94s oxidize also the Jasmonoyl-Phénylalanine (JA-Phe) conjugate accumulated in wounded leaves. CYP94s mediated JA-Ile and JA-Phe carboxylation includes an aldehyde intermediate, that of JA-Ile being accumulated *in vivo*.

This work highlights the dynamic metabolism of jasmonate derivatives in a complex branched network involving the concerted action of two enzyme families.

Key words: jasmonates metabolism, CYP94s, amido-hydrolases, *Arabidopsis thaliana*, wounding, *Botrytis cinerea*, flower