



HAL
open science

La mousse *Physcomitrella patens*, un modèle pour explorer l'évolution et l'ingénierie du métabolisme phénolique

Lucie Kriegshauser

► **To cite this version:**

Lucie Kriegshauser. La mousse *Physcomitrella patens*, un modèle pour explorer l'évolution et l'ingénierie du métabolisme phénolique. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ064 . tel-02918090

HAL Id: tel-02918090

<https://theses.hal.science/tel-02918090>

Submitted on 20 Aug 2020

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 des Sciences de la Vie et de la Santé (ED 414)
Institut de biologie moléculaire des plantes, UPR2357 CNRS

THÈSE présentée par :
Lucie KRIEGSHAUSER

soutenue le : 27 Septembre 2018

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

**La mousse *Physcomitrella patens*,
un modèle pour explorer l'évolution et
l'ingénierie du métabolisme phénolique**

THÈSE dirigée par :

Mme WERCK Danièle

Directrice de Recherche, IBMP UPR2357, CNRS Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BAKAN Bénédicte

Mr SIBOUT Richard

Chargée de Recherche, UR1268 BIA, INRA Nantes

Chargé de Recherche, UR1268 BIA, INRA Nantes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme CHONG Julie

Mr GAQUEREL Emmanuel

Mr RENAULT Hugues

Professeure, EA3991 LVBE, Université de Haute-Alsace Colmar

Professeur, COS, Université d'Heidelberg, Allemagne

Chargé de Recherche, IBMP UPR2357, CNRS Strasbourg

Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé en trois années et a été financé par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

Il s'est déroulé au sein de l'équipe « Cytochromes P450 et métabolismes associés », dirigée par Dr. Danièle WERCK, à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), une unité propre de recherche du CNRS, à Strasbourg.

Ces travaux de recherche ont été encadrés par Dr. Danièle WERCK, directrice de Recherche, et Dr. Hugues RENAULT, chargé de Recherche.

Remerciements

Aux membres du Jury : Bénédicte BAKAN, Richard SIBOUT, Julie CHONG et Emmanuel GAQUEREL d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'apporter leur expertise.

A tous les collaborateurs :

- Laurence Herrgott qui a produit toutes les protéines solubles recombinantes que j'ai utilisées. Je te remercie pour ton efficacité et la qualité de ton travail, y compris tes prises d'initiative pour t'assurer que j'avais toujours assez de matériel pour travailler,
- Trevor Yeats et Jocelyn Rose qui ont effectué les analyses de cutine,
- Julie Zumsteg qui m'a aidée dans le développement de méthodes en spectrométrie de masse,
- Loya Schoeffel et Arthur Muller, mes deux stagiaires de Master. Je vous remercie pour le travail de qualité que vous avez fourni. Vous m'avez beaucoup aidée, surtout sur la fin,
- Agnès Lesot qui m'a énormément aidée pour la récolte des graines d'*Arabidopsis*,
- Mathieu Erhardt qui a effectué les analyses de microscopie,
- Desirée Gütle, ainsi que le professeur Ralf Reski et toute son équipe du laboratoire de l'Université de Freiburg qui m'ont transmis leur savoir-faire de la culture de la mousse *Physcomitrella patens* et qui ont hébergé une grande partie de mes cultures,
- les membres des plateformes de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Sandrine Koechler et Malek Alioua, Nicolas Baumberger et les membres de la plateforme de production végétale.

A mes deux encadrants : Danièle WERCK et Hugues RENAULT

Je vous remercie pour la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordées. Elles m'ont permis de prendre confiance en moi et de m'épanouir. Vous n'étiez jamais loin, si j'avais besoin d'aide ou de conseils. Vous m'avez énormément appris et je vous en suis reconnaissante. Dany, je vous remercie particulièrement pour vos encouragements et vos conseils tout au long de ma thèse, qui m'ont toujours motivée. Hugues, je te remercie de m'avoir transmis ton savoir-faire, ta rigueur scientifique et de m'avoir toujours encouragée. J'ai eu de la chance d'avoir des encadrants comme vous.

A mes formidables collègues de l'équipe :

Je vous remercie pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble et pour la super ambiance. Grâce à vous, je venais tous les jours au labo avec le sourire (sauf peut-être quand les manips ne marchaient pas). Pascaline, merci pour votre douceur et les nombreux ravitaillements en bonbons. Franck, merci pour toutes tes blagues et les fous rires. Agnès, merci pour ton écoute et ton aide. Etienne, Nicolas, Hugues et Julien, merci pour les « afterworks ».

A mes amis de l'IBMP:

Chloé, Lucie, Manu, Valentin, Audrey, Adrien, Laetitia et Cédric : merci pour tous les moments passés en dehors du travail, les activités, les soirées, les confidences, les fous rires. Vous me manquerez.

Aux collègues de l'IBMP

A mes proches :

- Sabrina, Pierre et Marion, mes meilleurs amis de longue date
- ma mère, mon père, mes frères et ma sœur, mes grands-parents,
- Chris et Roger
- mon compagnon Kevin

d'avoir contribué chacun à leur manière, à un soutien financier et/ou moral pour me permettre d'accomplir huit années d'études dans la plus grande sérénité possible.

A ma mamie Éliane, qui m'a transmis son goût pour la nature et sa curiosité pour le monde qui nous entoure.

Abréviations

A. thaliana ou *At*: *Arabidopsis thaliana*

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ADNg: ADN génomique

ADN-T: ADN de transfert

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

Asn: asparagine

ATP: adénosine triphosphate

4CL: 4-CoA-ligase

BAHD: fait référence aux acyl transférases : BEAT, AHCT, HCBT, DAT

BEH (colonne C18): Ethylene Bridged Hybrid

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn: BLAST utilisant une séquence nucléotidique comme référence

BLASTp: BLAST utilisant une séquence protéique comme référence

BSTFA: N, Obis (triméthylsilyl)trifluoroacétamide

C: carbone

C4H: cinnamate-4-hydroxylase

CHI: chalcone isomerase

CHS: chalcone synthase

CL: cuticular layer = couche cuticulaire

Col-0: *A. thaliana* écotype Columbia

CoA: Coenzyme A

CP: cuticle proper = cuticule proprement dite

CQ: caféoyl-quinat

CS: caféoyl-shikimate

CSE: caféoyl-shikimate esterase

C2T: caféoyl-2-thréonate

C4T: caféoyl-4-thréonate

CYP: Cytochrome P450

Cys: cystéine

DCF: Deficient in Cutin Ferulate

DEPC: pyrocarbonate d'éthyle

DHK: dihydrokaempferol

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EI: electronic impact

ESI: electrospray ionization

EtOH: ethanol

F3H: flavanone-3-hydroxylase

F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase

F3'5'H: flavonoid 3',5'-hydroxylase

FA: fatty acid
FACT: Fatty Alcohol: Caffeoyl-CoA caffeoyl Transferase
FHT: Fatty acid/Hydroxycinnamoyl-CoA Transferase
FNS: flavone synthase
GC: gas chromatography = chromatographie en phase gazeuse
GUS: beta glucuronidase
HCT: hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase
HHT: hydroxycinnamoyl-CoA: ω -hydroxyacid O-hydroxycinnamoyltransferase
His: histidine
HQT: hydroxycinnamoyl-CoA:quininate hydroxycinnamoyl transferase
HPLC: chromatographie liquide à haute performance
HR: homologous recombination = recombinaison homologue
IR: illegitimate recombination = recombinaison illégitime
K1: kaempféritrine = kaempférol 3-O-rhamnoside-7-O-rhamnoside
Kcat: constante catalytique
Km: constante de Michaelis
Knock-in: intégration de gène
Knock-out: délétion de gène
KNOP: milieu de culture *in vitro* de *P. patens* composé de potassium (K), azote (N), oxygène (O) et phosphore (P)
LCFA: long chain fatty acid
MAG: monoacyl glycérol
M. polymorpha ou *Mp*: *Marchantia polymorpha*
MeOH: Methanol
MRM: Multiple Reaction Monitoring
MS: mass spectrometry = spectrométrie de masse
MS/MS: spectrométrie de masse en tandem
MUSCLE: Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation
NaOAc: acétate de sodium
NHEJ: non-homologous end joining = jonction d'extrémités non homologues
NNI algorithm: Nearest Neighbor Interchange
NPTII: gène de résistance codant pour la Néomycine phosphotransférase
Ns: non significatif
ODD: 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
P: paroi cellulaire
PDA: détecteur à barrettes de diodes
P. patens ou *Pp*: *Physcomitrella patens*
PAL: Phénylalanine Ammonia Lyase
pb: paires de bases
pCQ: *p*-coumaroyl-quininate
pCS: *p*-coumaroyl-shikimate
pC2T: *p*-coumaroyl-2-thréonate
pC4T: *p*-coumaroyl-4-thréonate
PCR: polymerase chain reaction

Phe: phénylalanine

qPCR: PCR quantitative à partir d'ADNg

qRT-PCR: PCR quantitative à partir d'ARN rétrotranscrits

ROS: "reactive oxygen species"= espèces réactives de l'oxygène

RT-PCR: PCR effectuée à partir d'ARN rétrotranscrits

SRM: Selected Reaction Monitoring

TAE: solution tamponnée contenant du Tris base, de l'acide acétique et de l'EDTA

Tm: primer melting temperature = température d'hybridation des amorces

tt: transparent testa

UPLC: chromatographie liquide à très haute performance

UV: ultraviolets

VLCFA: very long chain fatty acid = acide gras à très longue chaîne

WT: wild type

XyG: xyloglucanes

Symboles :

Δ gène: délétion du gène par recombinaison homologue

λ : longueur d'onde

ω : oméga-hydroxylation = hydroxylation en bout de chaîne de l'acide gras

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
Origine des plantes terrestres.....	3
La voie des phénylpropanoïdes	9
Les flavonoïdes	10
Les précurseurs de biopolymères structuraux.....	10
<i>La lignine</i>	11
<i>La cutine et la subérine</i>	13
<i>La sporopollénine</i>	13
Les autres composés phénoliques	13
L'émergence du métabolisme phénolique.....	15
<i>Physcomitrella patens</i> , un modèle de choix.....	17
Le cycle de vie de <i>P. patens</i>	17
Le ciblage de gènes chez <i>P. patens</i>	18
L'utilisation de <i>P. patens</i> en biotechnologie	20
Etude du métabolisme phénolique chez <i>P. patens</i>	21
Objectifs de ma thèse	23
REFERENCES	25
Chapitre I: PpHCT is a BAHD acyltransferase required for caffeate biosynthesis and cuticle formation in the moss Physcomitrella patens	33
SUMMARY	33
INTRODUCTION.....	35
RESULTS.....	37
A phylogenetic approach to identify a candidate PpHCT.....	37
Recombinant PpHCT generates p-coumaroyl-threonate esters.....	38
PpHCT catalyzes the deconjugation of caffeoyl-quinic acid into quinic acid and caffeoyl-CoA	39
Threonate is a substrate of HCTs from Bryophytes.....	40
<i>In vitro</i> substrate preferences of PpHCT	41
Threonate accumulates at high concentration in <i>P. patens</i> gametophore	43

PpHCT is required for the formation of caffeoyl-threonate	44
PpHCT is required for moss cuticle formation	45
$\Delta PpHCT$ cuticle has deeply altered phenolic and lipidic compositions	46
PpHCT is expressed at the apex of the gametophore.....	47
DISCUSSION	48
Threonate is the most likely physiological substrate of PpHCT	48
PpHCT mutants reveal independent formation and function of <i>p</i> -coumaroyl and caffeoyl units in moss cuticle	49
Physiological roles of PpHCT	50
MATERIALS AND METHODS	51
Phylogenetic analysis	51
Plant material and growing conditions.....	51
Generation of transgenic lines	51
Molecular characterization of transgenic lines.....	52
<i>PCR-based validation of genomic integration</i>	52
<i>Transcript analysis by semi-quantitative RT-PCR</i>	52
<i>Evaluation of transgene number by qPCR</i>	53
Determination of gene expression by qRT-PCR	54
Recombinant protein production	54
<i>In vitro</i> enzymatic assays	54
Metabolic profiling of <i>Physcomitrella patens</i>	55
<i>Tissue collection and processing</i>	55
<i>Metabolite extraction</i>	55
<i>HPLC-UV chromatography</i>	55
<i>UPLC-MS/MS analysis</i>	56
<i>GC-MS analysis</i>	56
Cuticle composition analysis	57
GUS staining.....	57
Permeability assay	57
REFERENCES	58
SUPPLEMENTAL FIGURES	63
SUPPLEMENTAL TABLES	69
SUPPLEMENTAL REFERENCES	72

Chapitre 2: Emergence of a new BAHD clade in land plants bridging aliphatic and phenolic precursors of cuticle.....77

INTRODUCTION 79

Les polymères pariétaux..... 79

Rôle de la cuticule 81

Imperméabiliser les organes et limiter les pertes d'eau..... 81

Empêcher la fusion d'organes au cours du développement 81

Composition chimique de la cuticule 84

Voie de biosynthèse de la cuticule..... 85

Implication des composés phénoliques dans la biosynthèse de cutine et de subérine..... 88

At3g48720 = AtDCF 88

At5g41040 = AtHHTI 88

AT5g63560 = AtFACT..... 90

OBJECTIFS 91

RESULTATS..... 93

Une analyse phylogénétique met en évidence la présence d'homologues FHT chez les bryophytes 93

Les protéines FHT de bryophytes catalysent *in vitro* la synthèse d'un ester phénolique d'acide gras 94

Incubation in vitro de PpFHT: identification du produit..... 94

Optimisation des conditions d'incubation..... 95

Activités in vitro de MpFHT et PpFHT recombinantes 96

Les lignées *Ppfht* de *P. patens* présentent une altération de la cuticule 100

DISCUSSION 105

MATERIELS ET METHODES 108

Analyses phylogénétiques..... 108

Matériel végétal et conditions de cultures..... 109

Isolation et transformation des protoplastes de *P. patens* 109

Production de mutants déficients *Ppfht* par CRISPR/Cas9 110

Caractérisation moléculaire des lignées CRISPR..... 112

Production de protéines recombinantes dans *Escherichia coli*..... 114

Analyse *in vitro* de l'activité enzymatique FHT 114

Techniques de microscopie électronique	115
Test de perméabilité au bleu de toluidine	116
REFERENCES	117
Chapitre 3: Exploration et ingénierie de la voie des flavonoïdes chez <i>Physcomitrella patens</i>	125
Sous chapitre I: Etude de la voie des flavonoïdes chez <i>P. patens</i>	127
INTRODUCTION	127
Les rôles physiologiques des flavonoïdes chez les plantes.....	127
La voie de biosynthèse des flavonoïdes	129
Les flavonoïdes chez les plantes terrestres basales.....	131
Objectifs.....	132
RESULTATS	133
Recherche de flavonoïdes par UPLC-MS/MS dans les extraits de <i>P. patens</i>	133
Identification de gènes homologues de la voie des flavonoïdes chez <i>P. patens</i>	133
<i>A. thaliana</i> , un excellent modèle pour étudier la voie des flavonoïdes	136
Analyse des mutants tt transformés.....	139
Complémentation du mutant <i>tt4 chs</i>	139
Complémentation du mutant <i>tt5 chi</i>	141
Complémentation du mutant <i>tt6 (f3h)</i>	141
Complémentation du mutant <i>tt7 (f3'h)</i>	142
Sous-chapitre 2 : Ingénierie de la voie des flavonoïdes chez <i>P. patens</i>	147
DISCUSSION	151
MATERIELS ET METHODES	155
Matériel végétal et conditions de culture	155
<i>Arabidopsis thaliana</i>	155
Complémentation génétique des mutants <i>transparent testa</i>	155
<i>Mutants transparent testa</i>	155
<i>Production des constructions génétiques</i>	156
<i>Transformation d'Agrobacterium tumefaciens</i>	156
<i>Transformation d'Arabidopsis thaliana</i>	156
<i>Sélection des transformants</i>	157

Analyse des flavonoïdes.....	157
Ingénierie métabolique de <i>Physcomitrella patens</i>	158
REFERENCES	159
DISCUSSION GENERALE	167
Le modèle <i>Physcomitrella patens</i>	169
Le métabolisme phénolique ancestral.....	171
L'étude des composés phénoliques la cuticule	174
Perspectives	174
Conclusion.....	175
REFERENCES.....	176
PROTOCOLES ET METHODOLOGIES GENERALES	179
Amplification d'ADN pour clonage.....	181
I. Conception des amorces.....	181
a. <i>Amorces simples</i>	181
b. <i>Amorces avec extension</i>	181
2. Amplification par PCR.....	182
3. Purification	182
Les clonages.....	182
I. Clonage Gateway	182
2. Clonage GIBSON.....	183
3. Clonage bouts francs (Blunt-end)	184
Production de plasmides.....	184
I. Transformations bactériennes	184
2. Vérification du clonage et séquençage du plasmide	184
a. <i>PCR sur colonies</i>	184
b. <i>Purification de plasmides</i>	185
c. <i>Séquençage du plasmide</i>	185
Analyses métaboliques.....	185
I. Préparation des échantillons.....	185
a. <i>Echantillons de P. patens</i>	185
b. <i>Echantillons d'A. thaliana</i>	185
2. Extraction des métabolites.....	186

3. Transestérification	186
4. Analyses chromatographiques	186
<i>a. Chromatographie liquide HPLC-UV</i>	186
<i>b. Chromatographie liquide UPLC-MS/MS</i>	187
5. Développement des méthodes de détection en spectrométrie de masse (MS/MS)	188
Analyse de l'expression génique	189
1. Extraction des ARN.....	189
2. Traitement à la DNase	190
3. Rétrotranscription des ARN en ADNc	190
ANNEXE 1 : SOLUTIONS DE LABORATOIRE	193
<i>Milieux de culture</i>	193
<i>Milieux nécessaires à la transfection de protoplastes de P. patens</i>	193
<i>Milieux nécessaires à l'extraction d'ADN génomique</i>	193
ANNEXE 2 : VECTEURS	195
ANNEXE 3 : AMORCES	199
Clonages.....	199
<i>Gateway</i>	199
<i>Gibson</i>	199
Séquençage de vecteurs	199
<i>pDONR-zeocine</i>	199
<i>pHGWA</i>	199
Chapitre 2	200
<i>Amplification des séquences codantes pour clonage Gateway</i>	200
<i>Génotypage des lignées modifiées par CRISPR-cas9</i>	200
Chapitre 3	200
<i>Complémentation des mutants tt d'A. thaliana par les gènes de P. patens</i>	200
<i>Ingénierie métabolique</i>	200
ANNEXE 4 : PROGRAMMES PCR	203
ANNEXE 5 : SELECTION	205
ANNEXE 6 : METHODES DE DETECTION MS/MS	207

INTRODUCTION GENERALE

Origine des plantes terrestres

L'apparition et l'évolution des premières plantes terrestres a profondément impacté l'écosystème terrestre, créant des conditions favorables à l'évolution du règne animal (Beerling et Berner, 2005 ; Lenton et al, 2016). Les plantes terrestres actuelles sont des embryophytes pluricellulaires photoautotrophes regroupant les bryophytes, non vasculaires, les lycophytes (sélaginelles et prêles), les ptéridophytes (fougères) et les spermatophytes, comprenant les Gymnospermes et les Angiospermes (Gensel, 2008) (**Figure 1**).

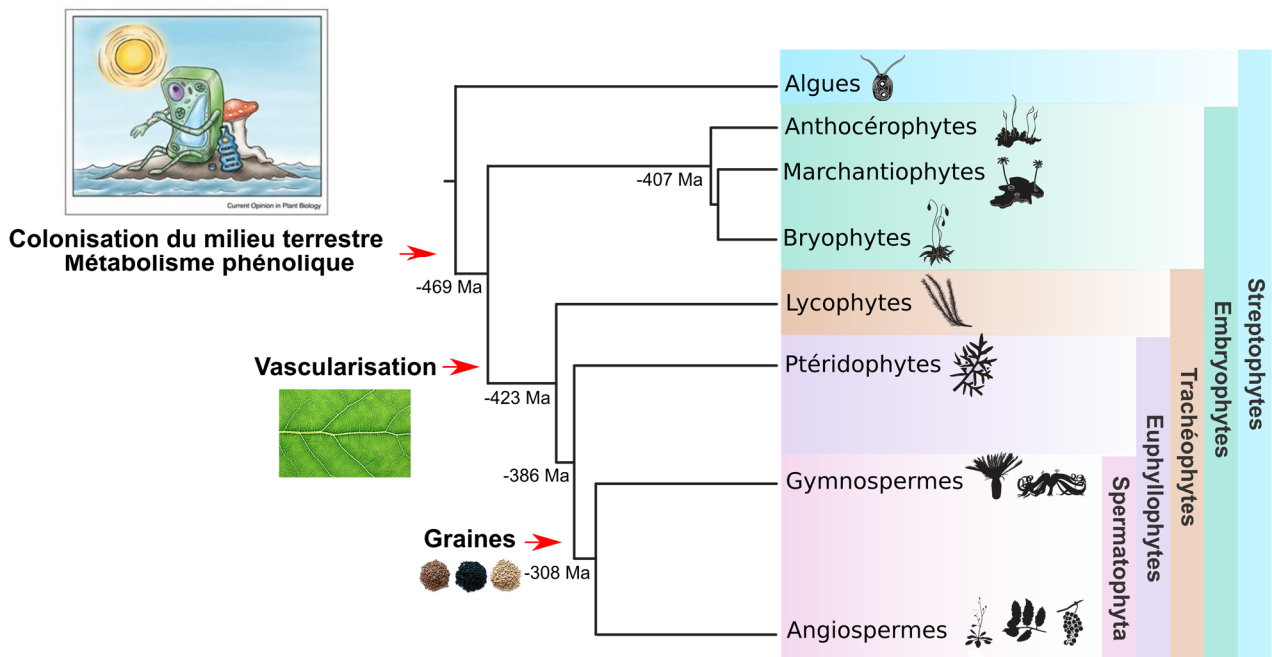


Figure 1 : Phylogénie de la lignée verte, à partir de la topologie décrite par Puttick et al, 2018.

Les bryophytes définissent un groupe monophylétique comprenant les anthocérophytes, les marchantiophytes et les mousses (« bryophytes vraies »). Les dates de divergence des différents clades ont été établies à partir de datations fossiles (Puttick et al, 2018, données supplémentaires). Plusieurs innovations majeures sont apparues et sont décrites dans Rensing, 2018; Prigge et Bezanilla, 2010.

Les données paléontologiques montrent que les premières plantes terrestres sont apparues il y a à environ 460 à 480 millions d'années. Les plantes terrestres actuelles ont divergé à partir d'algues vertes, et de récentes études phylogénétiques montrent que le clade le plus proche des embryophytes serait celui des Zygnematophyceae, des algues vertes filamenteuses présentes dans les milieux aquatiques et terrestres (**Figure 2**) (de Vries et Archibald, 2018 ; Wickett et al, 2014). Ces organismes étaient d'ailleurs prédisposés à former des symbioses bénéfiques avec des champignons, puisqu'ils possèdent les gènes nécessaires, homologues à ceux des plantes terrestres (Delaux et al, 2015).

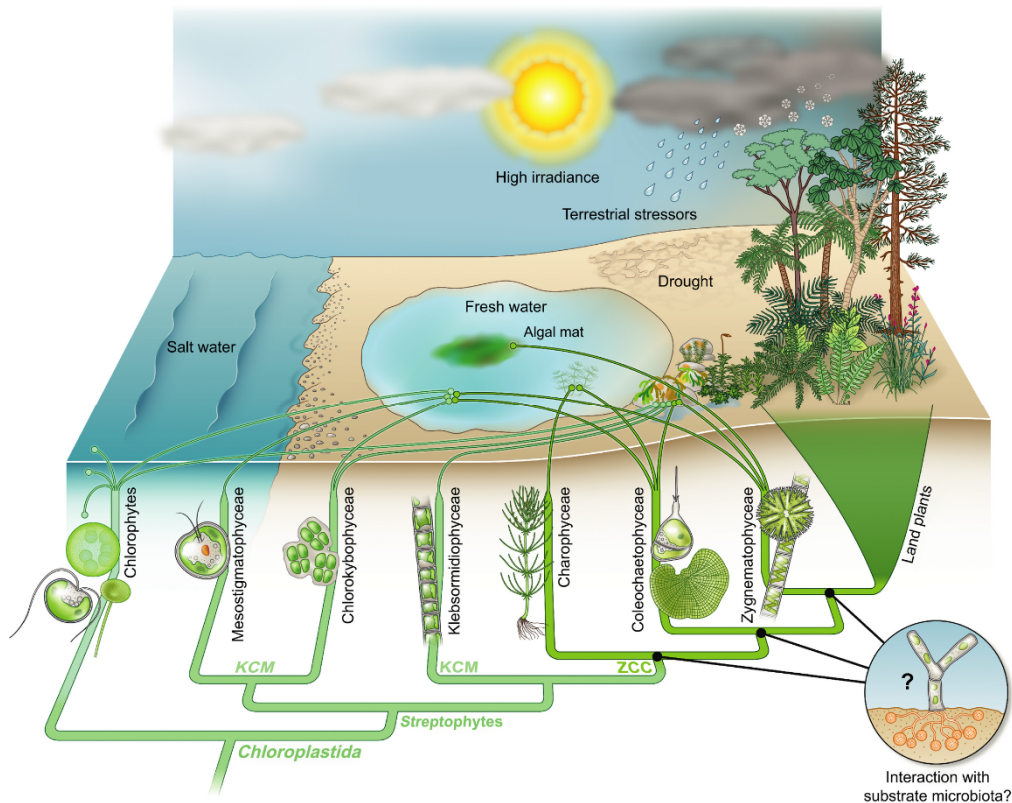


Figure 2 : Evolution de la lignée verte vers la vie terrestre (de Vries et Archibald, 2018).

Les Zygnematochyceae constituent le groupe phylogénétique le plus proche des plantes terrestres.

La biologie de ces algues permet de comprendre quels sont les attributs ayant permis de faire face aux nombreux stress environnementaux terrestres, tels que la sécheresse, les changements rapides de température, ou la forte luminosité, notamment les rayonnements UV qui ne sont plus filtrés par l'eau (de Vries et Archibald, 2018 ; Maberly, 2014).

Les UV-B sont particulièrement dangereux car ils créent, entre autres, des lésions irréversibles de l'ADN. De plus, ils induisent l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), très toxiques pour les cellules car ils endommagent les lipides membranaires. En réponse à ce stress, certaines algues comme *Klebsormidium dissectum* s'associent et s'entourent d'une « croûte » formée de molécules inorganiques pour se protéger des rayons UV. Elles synthétisent des écrans UV-B polyphénoliques appelés acides aminés mycosporines-like (MAAs), dérivés de la voie du shikimate et absorbant entre 310 et 360 nm (Karsten et Holzinger, 2014 ; Bhatia et al, 2011). D'autres algues comme *Zygonium ericetorum* ne produisent pas de MAA, mais contiennent d'autres molécules polyphénoliques, dont des tannins de couleur violette (Aigner et al, 2013).

La déshydratation est également un stress majeur auquel les premières plantes terrestres ont été confrontées. Le manque d'eau prolongé mène d'une part, à une agrégation irréversible des macromolécules constituant les membranes, d'autre part, empêche la majorité des activités biologiques. Certaines algues présentent une très grande tolérance à la déshydratation appelée résurrection, comme par exemple *Klebsormidium crenulatum* (Karsten et Holzinger, 2014). Certaines chlorophytes du désert peuvent rester en « dormance », inhibant leur photosynthèse durant 4 semaines de déshydratation, et récupérer des fonctions physiologiques et une morphologie normale après 1 heure de réhydratation (Gray et al, 2007). D'autres, comme *Zygnema circumcarinatum*, produisent des protéines « Late Embryogenesis Abundant » (LEA) qui protègent les autres protéines contre l'agrégation provoquée par la déshydratation (Rippin et al, 2017) comme c'est le cas chez les plantes terrestres *A. thaliana*, *O. sativa* ou *P. patens*.

Au cours de l'évolution des plantes terrestres, plusieurs innovations morphologiques majeures ont fait leur apparition (**Figure 1**), telles que :

- la cuticule, une couche hydrophobe recouvrant les parties aériennes des plantes, conférant une imperméabilité, limitant les pertes d'eau et filtrant les rayons UV,
- les stomates, qui permettent les échanges gazeux avec l'extérieur, présents chez toutes les plantes terrestres, sauf chez certaines mousses et anthocérophytes, et absents chez les marchantiophytes (Rensing, 2018b),
- les spores entourées de sporopollénine, favorisant une dispersion de l'espèce, surtout chez les bryophytes (Wallace et al, 2011),
- le développement de vaisseaux conducteurs lignifiés chez les trachéophytes, permettant également un port érigé de la plante,
- de véritables racines, à partir des lycophytes,
- les mégaphylles (chez les euphyllophytes) permettant une plus grande activité photosynthétique,
- les graines chez les spermatophytes, protégeant l'embryon,
- les fleurs et les fruits chez les Angiospermes, qui protègent les organes reproducteurs et la graine après fécondation.

Un des moteurs majeurs de l'évolution des plantes a été la teneur en CO₂ atmosphérique qui a induit plusieurs changements morphologiques chez les végétaux, selon une rétroaction positive (Figure 3, Beerling et Berner, 2005).

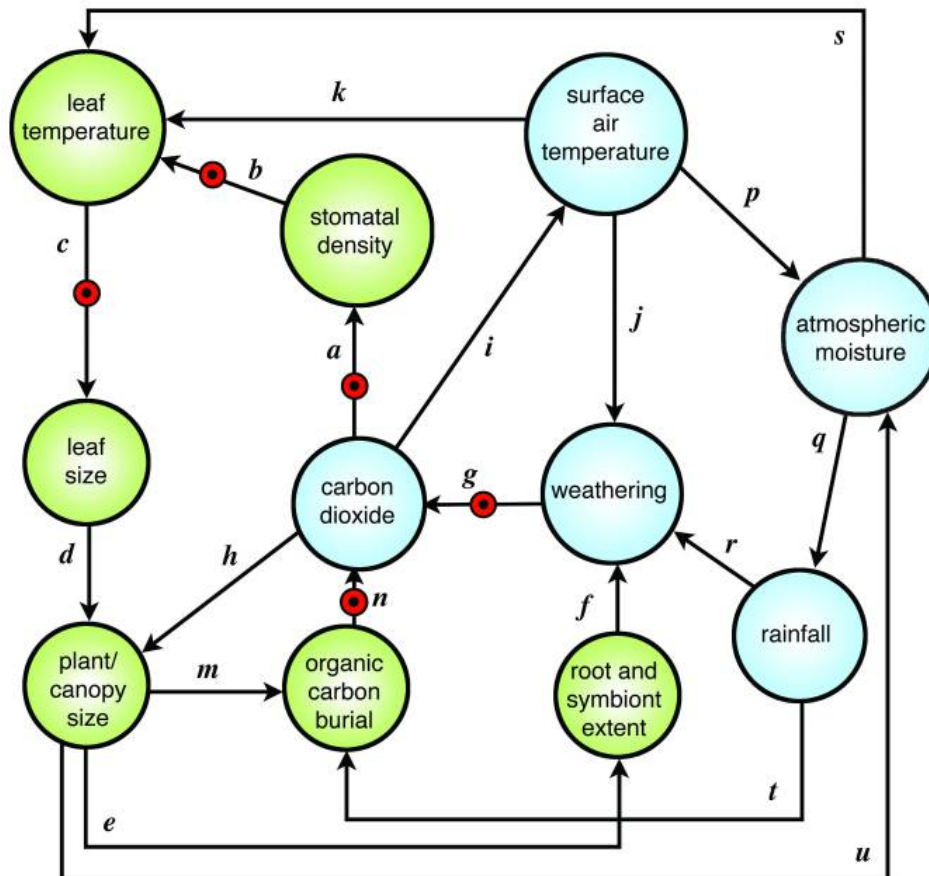


Figure 3 : Coévolution des plantes et du CO₂ atmosphérique lors de la colonisation terrestre (Beerling et Berner, 2005).

Les flèches représentent des liens de cause à effet. Les cercles rouges représentent des réponses inverses (exemple : la diminution du CO₂ atmosphérique entraîne une augmentation de la densité en stomates). Les cercles verts concernent l'évolution des plantes et les cercles bleus l'évolution des conditions environnementales.

Selon ce diagramme de cause à effet, le développement de la végétation a entraîné une diminution du CO₂ atmosphérique et une érosion du sol. Cette diminution de CO₂ atmosphérique a elle-même entraîné une augmentation de la densité des stomates, augmentant ainsi les échanges gazeux entre les plantes et l'atmosphère. Un nombre important de stomates permet une meilleure évapotranspiration et une meilleure régulation de la température foliaire : la taille des feuilles peut ainsi être augmentée sans risquer une hyperthermie létale (Beerling et Berner, 2004). L'apparition des mégaphylles coïncide avec la diminution du CO₂ atmosphérique entre -340 et -380 Ma (Osborne et al, 2004).

Ces innovations morphologiques ont été accompagnées, et parfois permises, par le développement de métabolismes spécialisés incluant les terpénoïdes, les alcaloïdes et les phénylpropanoïdes, impliqués dans des adaptations aux stress biotiques et abiotiques (Akula et Ravishankar, 2011).

Le métabolisme des phénylpropanoïdes, menant à la biosynthèse de molécules phénoliques, précurseurs de polymères structuraux et de molécules antioxydantes, a joué un rôle majeur dans l'adaptation des plantes au milieu terrestre (Vogt, 2010 ; Weng et Chapple, 2010).

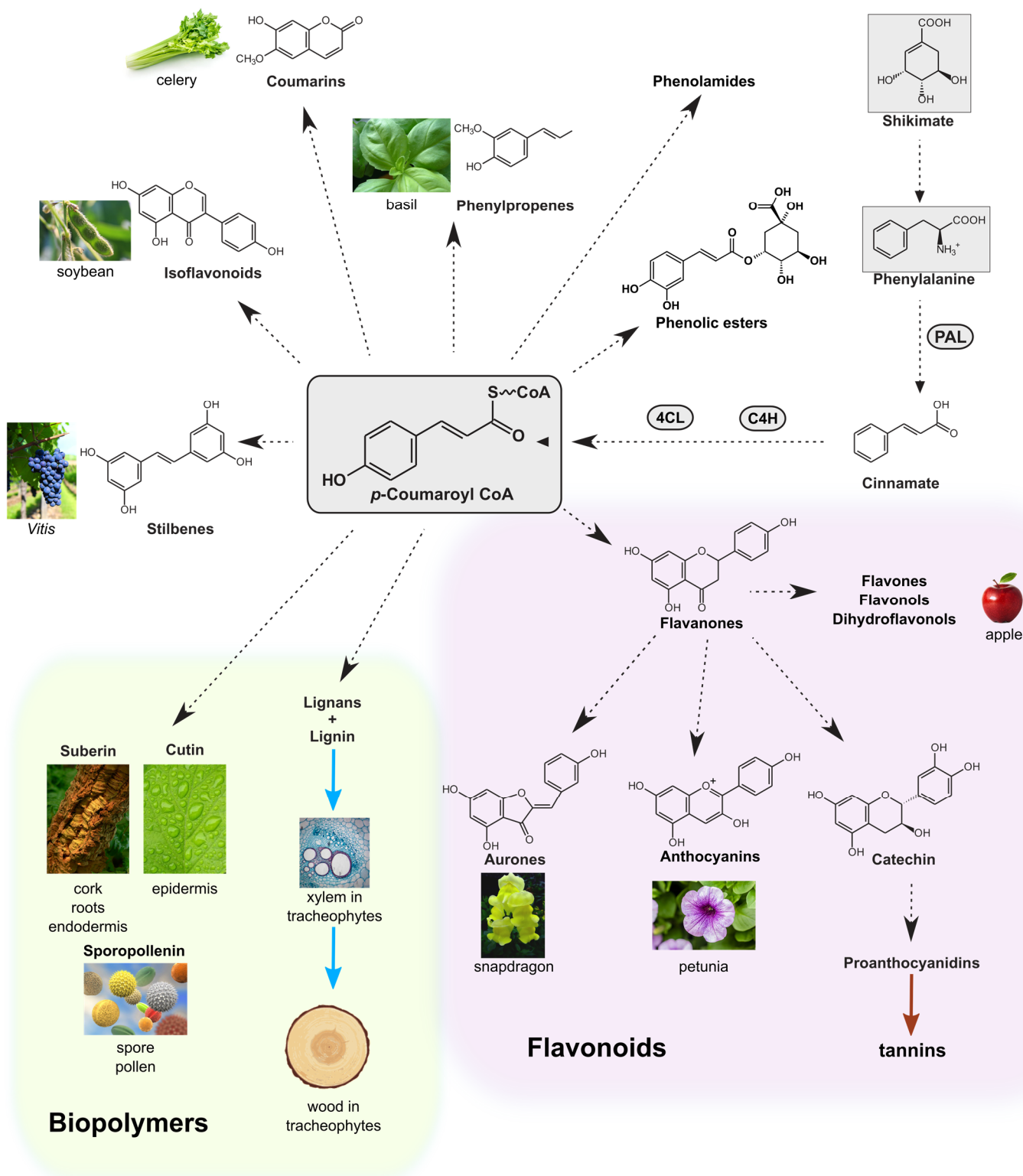


Figure 4 : Voie des phénylpropanoïdes inspirée de Vogt et al, 2010.

Ils dérivent de la phénylalanine et comprennent plusieurs classes de molécules, notamment les précurseurs de biopolymères structuraux (lignine, cutine, subérine) et les flavonoïdes. Les enzymes PAL: phénylalanine ammonia lyase; C4H: cinnamate-4-hydroxylase; 4CL: 4-CoA-ligase mènent à la synthèse du *p*-coumaroyl-CoA, précurseur commun à tous les phénylpropanoïdes. Les images sont libres de droit et issues du site <https://fr.freeimages.com/>.

La voie des phénylpropanoïdes

Le métabolisme des phénylpropanoïdes dérive généralement d'un acide aminé, la phénylalanine, et parfois de la tyrosine. Il implique la formation d'un précurseur commun, le *p*-coumaroyl-CoA, dont la métabolisation par différentes enzymes mène à la synthèse d'un nombre très varié de molécules phénoliques (**Figure 4** ; Vogt, 2010 ; Fraser and Chapple, 2011). L'enzyme clé de ce métabolisme est la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) qui convertit la phénylalanine en *trans*-cinnamate, hydroxylé ensuite par l'enzyme Cinnamate-4-Hydroxylase (C4H) pour former du *p*-coumarate. Ce dernier est par la suite conjugué avec le Coenzyme A par la 4-CoA-ligase (4CL) pour former du *p*-coumaroyl-CoA.

Plusieurs gènes de PAL ont été caractérisés chez les plantes, dont *Arabidopsis thaliana*, *Ginkgo biloba* et *Oryza sativa* (Wanner et al, 1995 ; Xu et al, 2008 ; Minami et al, 1989). Les PAL de certaines plantes, en particulier les monocotylédones, présentent également une activité Tyrosine Ammonia Lyase (TAL), responsable de la synthèse de *p*-coumarate, directement à partir de tyrosine (Emiliani et al, 2009). *Brachypodium distachyon* par exemple, produit près de la moitié du *p*-coumaroyl-CoA directement depuis la tyrosine grâce à une ammonia lyase bifonctionnelle appelée PTAL (Barros et al, 2016). Bien que la voie des phénylpropanoïdes semble restreinte aux plantes, on trouve certains homologues de PAL chez les Ascomycètes et les Basidiomycètes (Emiliani et al, 2009 ; Wu et al, 2014). L'utilisation de phénylalanine marquée au ¹⁴C a démontré que certains champignons sont capables de dégrader la phénylalanine par une voie impliquant une désamination initiale en acide cinnamique, comme c'est le cas chez les plantes (Hyun et al, 2011 ; Moore et al, 1967). Chez les procaryotes et les animaux, on trouve des Histidine Ammonia Lyase (HAL) qui sont impliquées dans la voie de dégradation de l'histidine (Suchi et al, 1995 ; Schwede et al, 1999).

Les phénylpropanoïdes comprennent un nombre très varié de molécules phénoliques, comme les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les coumarines, les stillbènes, les esters et amides phénoliques ou les précurseurs de polymères structuraux tels que la lignine, la cutine, la subérine et la sporopollénine. La plupart des phénylpropanoïdes solubles jouent le rôle d'écrans UV, impliqués également dans la détoxification des ROS, et/ou constituent des composés de défense contre les stress biotiques (**Figure 4**).

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues, avec plus de 4000 molécules identifiées à ce jour (Heim et al, 2002). Ils sont dérivés d'un noyau commun en C3-C6-C3, tricyclique (**Figure 5**) (Cook et Samman, 1996), et sont largement distribués chez les plantes sous formes de six classes majeures : flavanones, dihydroflavonols, flavones, flavonols, anthocyanidines et proanthocyanidines (Flacone Ferreyra et al, 2012) (**Figure 4**).

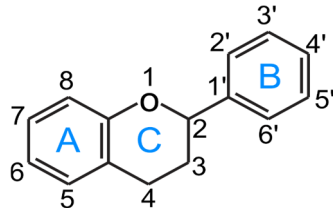


Figure 5 : Noyau de base en C3-C6-C3 constituant les flavonoïdes (Cook et Samman, 1996).

Ce sont de puissants écrans UV, également capables de piéger les ROS (Carletti et al, 2014). Les flavonoïdes sont répandus chez la majorité des plantes vasculaires, riches en flavanones et flavones (Iwashina, 2000 ; Gattuso et al, 2006). Les anthocyanes sont responsables de la couleur des pétales de fleurs dans la gamme rose-magenta-bleu et sont stockées sous forme glycosylée dans les vacuoles des cellules. La couleur jaune-orangée des pétales peut également être due à d'autres pigments, tels que les caroténoïdes ou les xanthophylles, qui ne sont pas dérivés de la voie des phénylpropanoïdes et qui sont stockés dans des chromoplastes. Les aurones, composés particuliers dérivés de flavanones, confèrent l'intense couleur jaune de certains pétales de fleurs ornementales telles que le muflier (Ono et al, 2006).

Les tanins condensés sont des polymères de flavanols, nommés procyanidols, et présents en quantités importantes dans les fruits et les noix, notamment chez *Vitis vinifera* (Gu et al, 2004).

Les isoflavonoïdes sont des flavonoïdes particuliers des légumineuses telles que le soja, chez lequel ils ont un rôle de molécule de défense ou de signal permettant la formation de nodules (Subramanian et al, 2006).

Les précurseurs de biopolymères structuraux

La voie des esters d'acides hydroxycinnamiques (i.e *p*-coumarate, caféate, férulate) est une branche importante du métabolisme des phénylpropanoïdes menant à la synthèse de précurseurs de biopolymères structuraux. La lignine, subérine et sporopollénine sont impliquées dans le renforcement de la paroi cellulaire, et la cutine est un composant majeur de la cuticule, une

barrière protectrice hydrophobe qui recouvre l'épiderme des organes aériens des plantes (Wang et al, 2013 ; Beisson et al, 2012 ; Kim and Douglas, 2013 ; Fich et al, 2016).

La lignine

La lignine est le biopolymère le plus abondant après la cellulose. Elle permet le renforcement des parois des cellules du xylème (tissu conducteur) et du sclérenchyme (tissu de soutien) (Barros et al, 2015). Chez les végétaux à croissance secondaire (certains Angiospermes dicotylédones et les Gymnospermes), le xylème secondaire est le principal constituant du bois. Les cellules lignifiées sont mortes, mais résistantes à la pression, ce qui permet aux trachéophytes, non seulement de conduire la sève brute sur plusieurs mètres sans que les parois des vaisseaux ne collapent, mais aussi de s'ériger. Les bryophytes sont quant à elles dépourvues de lignine.

La lignine est un hétéropolymère synthétisé à partir de monolignols : alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique, précurseurs respectifs des unités de lignine H, G et S (Vanholme et al, 2010) (**Figure 6**). La première enzyme de la voie qui conduit aux unités de lignine G et S est l'hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT) de la famille des BAHD (D'Auria, 2006), qui catalyse le transfert du résidu hydroxycinnamoyle du *p*-coumaroyl-CoA sur le shikimate, pour former le *p*-coumaroyl-shikimate (**Figure 6**) (Hoffman et al, 2003 ; Hoffman et al, 2004). L'étape suivante fait intervenir un cytochrome P450, la *p*-coumaroyl-shikimate 3'-hydroxylase (C3'H ou CYP98), générant du caféoyl-shikimate (Schoch et al, 2001 ; Franke et al, 2002). Enfin, l'HCT catalyse le transfert du résidu caféoyle ainsi formé sur le coenzyme A pour générer du caféoyl-CoA (Hoffman et al, 2003 ; Wang et al, 2014). Le caféoyl-CoA peut aussi résulter de la libération de caféate du caféoyl-shikimate par une caféoyl shikimate estérase (CSE), le caféate étant ensuite conjugué avec le CoA par une 4-CL (Vanholme et al, 2013 ; Saleme et al, 2017). Le caféoyl-CoA résultant est ensuite métabolisé par plusieurs enzymes, dont la cinnamoyl-CoA réductase (CCR) et la cinnamyl alcohol hydrogenase (CAD), pour générer l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. L'alcool *p*-coumarylique est quant à lui généré directement par l'action successive de CCR et CAD à partir du *p*-coumaroyl-CoA (Vanholme et al, 2010). Les laccases et peroxydases sont des enzymes capables de réaliser une radicalisation oxydative des monolignols, qui sont ensuite polymérisés par couplage radicalaire au niveau de l'apoplasme (Boerjan et al, 2003 ; Wang et al, 2013 ; Barros et al, 2015). La présence de véritable lignine serait restreinte aux trachéophytes (**Figure 1** ; Martone et al, 2009 ; Weng et Chapple, 2010), même si certaines espèces d'algues semblent présenter des structures ressemblant à de la lignine (Delwiche et al, 1989 ; Martone et al, 2009).

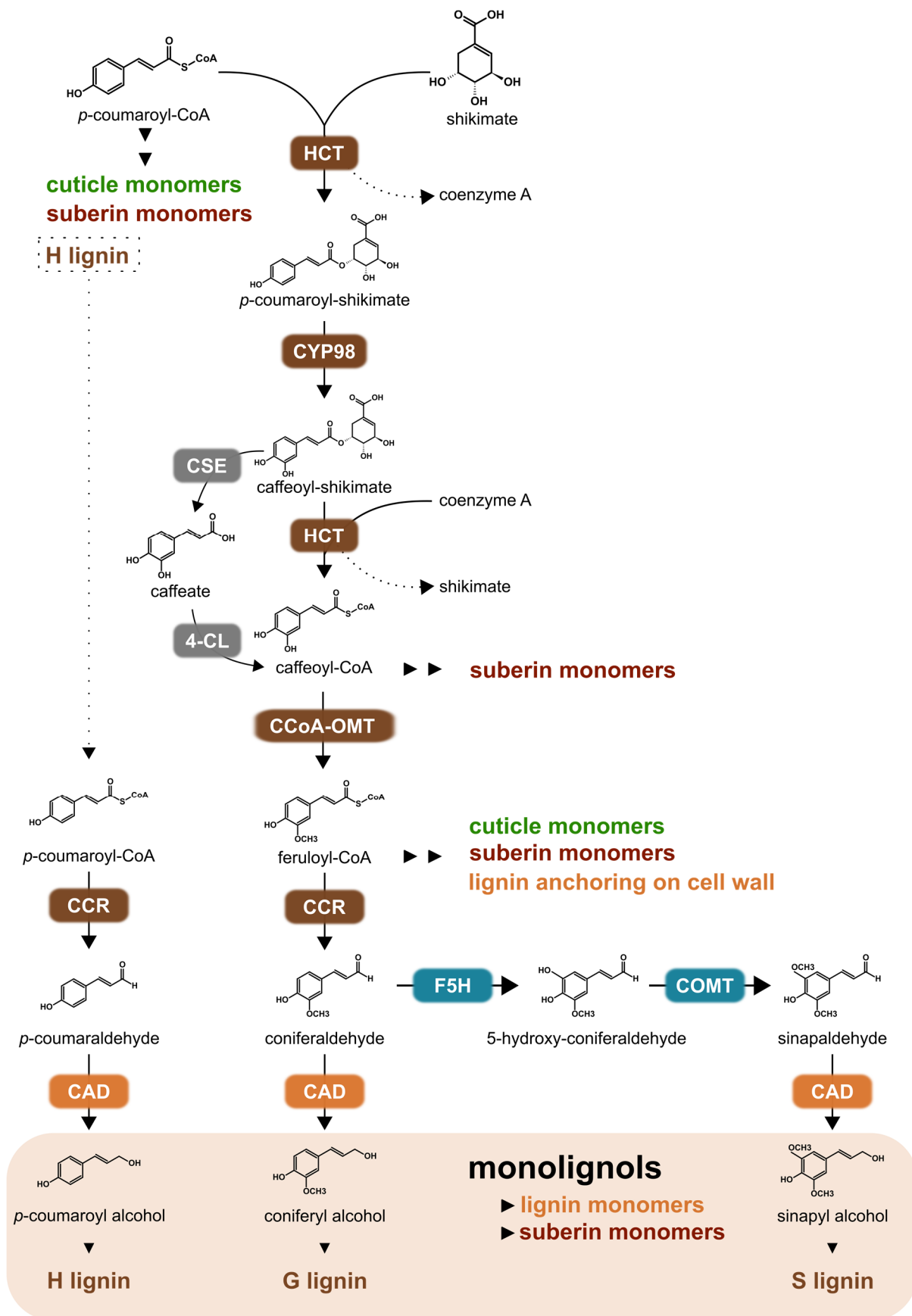


Figure 6: Biosynthèse des précurseurs de polymères structuraux.

Les monolignols (H, G et S) sont les principaux monomères qui vont former la lignine, tandis que les acides hydroxycinnamiques activés par le coenzyme A (*p*-coumaroyl-CoA, caféoyl-CoA ou féruloyl-CoA) sont conjugués à des acides gras, incorporés ensuite dans la cutine ou la subérine.

La cutine et la subérine

Les acides hydroxycinnamiques sont également incorporés dans la cutine et la subérine qui sont des polyesters d'acides gras. Peu de choses sont connues sur le rôle et le mode d'incorporation des molécules phénoliques dans ces biopolymères. L'enzyme Deficient in Cutin Ferulate (AtDCF) est une BAHD transférase décrite chez *A. thaliana* (Rautengarten et al, 2012). Elle conjugue le férulate à partir du féruloyl-CoA sur la fonction ω -hydroxyle d'un acide gras, produisant un ester incorporé ensuite à la cutine. La mutation *Atdcf* n'affecte pas le développement de la plante, mais résulte en un changement de composition en monomères d'acides gras dans la cutine. AtFACT et AtHHT1 sont d'autres BAHD transférase également impliquées dans l'incorporation de caféate et de férulate, respectivement, au niveau de la subérine (Kosma et al, 2012 ; Gou et al, 2009). Les mutants correspondants présentent une augmentation de la perméabilité tissulaire.

La sporopollénine

La sporopollénine est le constituant majeur de l'exine, la paroi externe du grain de pollen. C'est un biopolymère formé d'acides gras à longue chaîne et de composés phénoliques, même si sa structure exacte reste encore inconnue (Kim et Douglas, 2013). Il existe une très grande diversité de morphologie des grains de pollen selon les espèces, qui dépend en fait de la morphologie de l'exine (Blackmore et al, 2007). Le manteau du grain de pollen remplit les cavités de l'exine et est principalement composé de lipides, molécules phénoliques (flavonoïdes, phénolamides) et protéines (Jiang et al, 2013). Les phénolamides sont des esters de polyamines et d'acides hydroxycinnamiques (Bassard et al, 2010). Elles semblent jouer un rôle primordial dans le développement du grain de pollen puisque la mutation de l'enzyme spermidine hydroxycinnamoyl transferase (AtSHT) ainsi que des CYP98A8 et CYP98A9, agissant dans la voie de biosynthèse des phénolamides chez *A. thaliana* affecte la structure du grain de pollen (Grienenberger et al, 2009 ; Xu et al, 2014).

Les autres composés phénoliques

Les coumarines constituent une autre classe de phénylpropanoïdes impliqués, entre autres, dans la défense. Elles proviennent du féruloyl-CoA (Kai et al, 2008). Chez le tabac, la scopolétine aurait un rôle antiviral et antioxydant (Chong et al, 2002). Chez les Apiacées, les coumarines sont prénylées (ajout d'un 3-méthylbut-2-en-yl) et hydroxylées par des cytochromes P450 produisant des composés phototoxiques appelés furanocoumarines (Stanjek et al, 1999 ;

Bourgau et al, 2006 ; Larbat et al, 2007). Ces composés sont responsables des brûlures engendrées par la cueillette de certaines plantes, telles que le panais ou le céleri.

Les stilbènes sont des composés présents en grande quantité dans certaines plantes, notamment chez *Vitis vinifera* (Chong et al, 2009). Ce sont des phytoalexines, synthétisées de manière constitutive chez certaines espèces comme chez les conifères (Hart, 1981). Ces composés seraient également des substances allélochimiques capables d'inhiber le développement des plantes voisines (Chong et al, 2009).

Les phénylpropènes sont quant à eux des composés volatils, attirant les pollinisateurs ou ayant un rôle de défense contre les microorganismes, les insectes ou les prédateurs (Dudareva et al, 2004). Par exemple, le basilic synthétise l'eugénol, et le pétunia ou le girofle produisent l'isoeugénol, tous deux obtenus par la réduction enzymatique de l'alcool coniférylique (Koeduka et al, 2006).

Les esters de sinapate sont des dérivés phénylpropanoïdes généralement présents chez les Brassicacées. Le sinapoyl-glucose, sinapoyl-malate et sinapoyl-choline sont présents chez *A. thaliana* et sont impliqués dans la résistance aux UV (Fraser et Chapple, 2011). Il existe d'autres esters ainsi que des amides phénoliques, dont la nature varie largement en fonction des espèces. Les plus répandus sont probablement les esters *p*-coumaroyl-quinatate et caféoyl-quinatate (aussi appelé acide chlorogénique) impliqués dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques, en particulier les radiations UV (Clé et al, 2008; Niggeweg et al, 2004). Contrairement aux esters de shikimate (intermédiaires de la voie de la lignine et qui par conséquent ne s'accumulent pas), l'acide chlorogénique est présent en quantité relativement importante chez certaines plantes comme la pomme ou le café (Clifford, 1999).

Les enzymes de la voie dite du shikimate menant à la phénylalanine sont chloroplastiques (Tzin and Galili, 2010), tandis que la plupart des autres enzymes produisant les dérivés des phénylpropanoïdes à partir de la phénylalanine sont cytosoliques, sauf les cytochromes P450 qui se situent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Wu et al, 2016). On trouve également des enzymes vacuolaires telles que l'aureosidin synthase (AmSA1) d'*Anthirrhinium majus* (muflier), impliquée dans la synthèse d'aurones (Ono et al, 2006).

L'émergence du métabolisme phénolique

Chez les plantes modernes, le métabolisme phénolique joue un rôle central dans l'adaptation à leur environnement, comme présenté précédemment. De nombreuses études phylogénomiques ont eu pour objectif de déterminer à partir de quel moment de l'évolution ce métabolisme est apparu chez les plantes, et s'il a pu contribuer à l'adaptation des premières plantes terrestres à leur nouvel environnement. Les gènes homologues du métabolisme phénolique central (*PAL* ; *C4H* ; *4CL*) menant à la synthèse du précurseur commun *p*-coumaroyl-CoA, ainsi que les gènes de la branche des esters phénoliques précurseurs de lignine, ont été recherchés chez des membres représentatifs des grands groupes phylogénétiques de la lignée verte (Viridiplantae: chlorophytes, charophytes, bryophytes, lycophytes, ptéridophytes, gymnospermes et angiospermes). Ces analyses ont montré que certaines algues, ayant divergé avant les plantes terrestres, possédaient déjà des éléments permettant de former un début de voie métabolique (de Vries et al, 2017).

On trouve chez certaines algues chlorophytes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Micromonas sp* et *Ostreococcus tauri*) des gènes qui semblent être les orthologues de ceux qui participent à la biosynthèse du shikimate, mais pas d'homologues des gènes contribuant à la voie des phénylpropanoïdes (Tohge et al, 2013a ; Tohge et al, 2013b). Ces observations ont été confirmées dans une autre étude, également chez une autre espèce de chlorophyte (*Ostreococcus lucimarinus*) (Xu et al, 2009). En revanche, chez certaines algues charophytes, considérées comme les plus proches phylogénétiquement des plantes terrestres, on trouve plusieurs homologues de gènes de la voie des phénylpropanoïdes. Par exemple, chez *Klebsormidium nitens*, il est possible d'identifier des orthologues potentiels des gènes *PAL*, *4CL* et du duo *HCT/CYP98* (de Vries et al, 2017). Chez ces algues on trouve également des homologues des gènes codant pour les CAD et les peroxidases impliquées dans la production et la polymérisation de monolignols. La présence de tels gènes pourrait expliquer la présence de composés apparentés à des lignines chez certaines algues. Chez les plantes terrestres basales telles que *Physcomitrella patens* ou *Sellaginella moellendorffi*, des homologues des gènes nécessaires à la voie des esters phénoliques, jusqu'à la CCoAOMT, ont été identifiés, sans pour autant avoir été caractérisés.

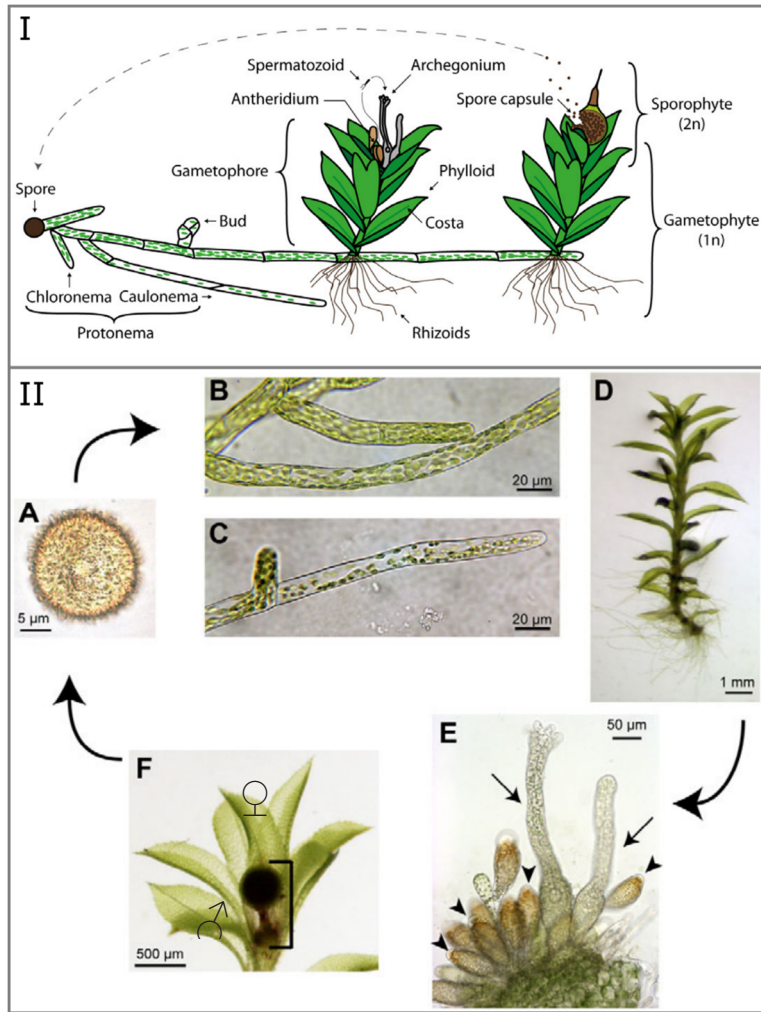


Figure 7 : Cycle de vie haplodiplophasique à haplophase dominante de la mousse *P. patens*.
I: Schéma issu de Strotbek et al, 2013; **II:** Images issues de Prigge and Bezanilla, 2010. **A:** spore (1n); **B:** chloronema (1n); **C:** caulonema (1n); **D:** gamétophore (1n); **E:** organes reproducteurs. ♂ antheridies: organes mâles; ♀ archégonies: organes femelles; **F:** sporophyte issu du zygote (2n) générant une spore (A) après méiose de cellules sporophytiques.

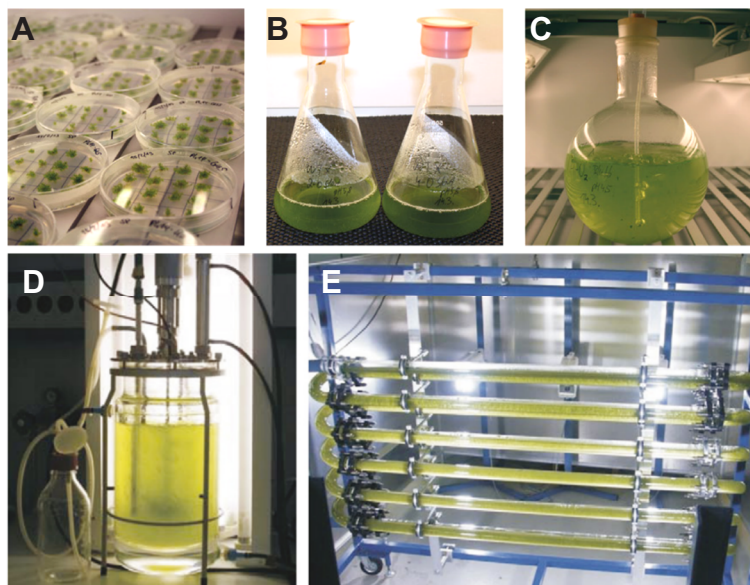


Figure 8 : Culture de la mousse *P. patens* (Decker et Reski, 2007).

A: Culture sur milieu solide en boîte de Petri; **B:** Culture liquide en Erlenmeyer; **C:** Culture liquide ventilée (Strotbek et al, 2013); **D:** Bioréacteur circulaire; **E:** Bioréacteur en verre tubulaire.

Physcomitrella patens, un modèle de choix

Le groupe des bryophytes au sens large comprend les anthocérophytes, les marchantiophytes et les bryophytes au sens strict (s.s). Bien que les relations phylogénétiques au sein des bryophytes soient encore incertaines, des données indiquent que les bryophytes seraient un groupe monophylétique, et que les marchantiophytes et les bryophytes s.s seraient des groupes frères (Puttick et al, 2018 ; **Figure 1**). *P. patens* est un représentant des bryophytes au sens strict (Funariaceae), dont le génome a été séquencé en 2008 (Rensing et al, 2008). Plus récemment, un transcriptome des différents tissus et stades de développement de la plante, exprimé dans différentes conditions, a été publié (Perroud et al, 2018). De par sa position phylogénétique, à la base des plantes terrestres, *P. patens* est un modèle de choix pour étudier l'émergence de certains caractères chez les plantes terrestres, considérant qu'un nombre important de caractères ancestraux ont été retenus au cours de son évolution.

Le cycle de vie de *P. patens*

Comme toutes les bryophytes, *P. patens* présente un cycle de vie haplodiplophasique à haplophase dominante (**Figure 7**). La phase dominante est le gamétophyte haploïde, générant des gamétophores mesurant quelques millimètres et dont les pseudo-feuilles, les phyllides, sont constituées d'une seule couche de cellules (**Figure 7.II.D**). Il émerge par développement végétatif à partir d'un filament haploïde microscopique appelé protonema. Ce dernier est composé de deux types de filaments : les filaments de chloronema (**Figure 7.II.B**) qui sont riches en chloroplastes et qui ont un rôle photosynthétique, et les filaments de caulonema (**Figure 7.II.C**) qui contiennent moins de chloroplastes, mais qui ont la capacité de s'allonger rapidement (20 à 30 $\mu\text{m/h}$) afin de coloniser le milieu à la recherche de nutriments (Menand et al, 2007). Le protonema se développe à partir d'une spore haploïde (**Figure 7.II.A**), issue de la méiose de cellules sporophytiques contenues dans le sporophyte diploïde (**Figure 7.II.F**). Le sporophyte se développe au sommet du gamétophore, à partir du zygote. Ce dernier est issu de la fécondation de l'ovule contenu dans l'archégone, par les spermatozoïdes produits par les anthéridies (**Figure 7.II.E**).

A l'échelle du laboratoire, les mousses sont cultivées principalement sur milieu nutritif KNOP (Reski and Abel, 1985) en boîte de Petri ou en culture liquide (**Figure 8A et B**). Les gamétophores repiqués individuellement sont capables de générer des filaments de protonema desquels se développeront d'autres gamétophores. Pour augmenter la croissance, il est possible d'utiliser des systèmes de culture ventilés (**Figure 8C**) (Strotbek et al, 2013). A plus grande

échelle, les mousses sont cultivées dans des bioréacteurs en verre circulaires ou tubulaires (**Figure 8D et E**) (Decker and Reski, 2007).

Le cycle de vie de *P. patens* apporte plusieurs avantages. D'une part, des protoplastes pour la transfection peuvent être générés à partir de protonema haploïde, ce qui signifie que l'altération génétique ne pourra pas être compensée par un deuxième allèle. D'autre part, il est possible de générer une grande quantité de matériel par développement végétatif sans passer par un stade fécondation. Ainsi, les mutants stériles pourront tout de mêmes être propagés, ce qui confère un avantage considérable par rapport aux plantes vasculaires modèles.

Le ciblage de gènes chez *P. patens*

La réparation de cassures double brin de l'ADN génomique se fait principalement par deux systèmes : la jonction d'extrémités non homologues (non-homologous end joining NHEJ) qui permet la ligation des deux extrémités d'ADN au site de cassure, et la recombinaison homologue (homologous recombination HR) qui utilise un ADN partageant une forte homologie de séquence pour remplacer le site d'ADN génomique altéré par recombinaison (Hanin and Paszkowski, 2003 ; Li and Heyer, 2008). Le NHEJ ne nécessite pas d'homologie de séquence et résulte généralement en une altération de la séquence au site de réparation. Ce mécanisme est d'ailleurs exploité dans le cadre de l'édition du génome de plantes par le système CRISPR-Cas9, notamment chez la mousse (Jinek et al, 2012 ; Schaeffer and Nakata, 2015 ; Collonnier et al, 2017). La NHEJ est parfois associée à une recombinaison illégitime (illegitimate recombination IR) (Kegel et al, 2006) qui permet l'intégration d'un transgène au site de cassure (Collonnier et al, 2017).

La recombinaison homologue utilise quant à elle la séquence de la chromatide sœur, dans le cas d'un organisme diploïde, pour réparer à l'identique la cassure double brin (**Figure 9**) (Weterings and Chen, 2008). Le NHEJ et la HR sont deux mécanismes qui coexistent, mais leur fréquence dépend de chaque organisme. La recombinaison homologue est fréquente chez les procaryotes et la levure, tandis que la jonction d'extrémités non homologues est prédominante chez les eucaryotes pluricellulaires (Hanin and Paszkowski, 2003). *P. patens* se démarque des autres plantes par la fréquence très importante de recombinaison homologue qui est comprise entre 66 et 100%, contre une fréquence inférieure à 1% chez les autres plantes telles que *N. tabacum*, *A. thaliana*, *C. reinhardtii* ou *V. carteri* (Schaefer, 2001).

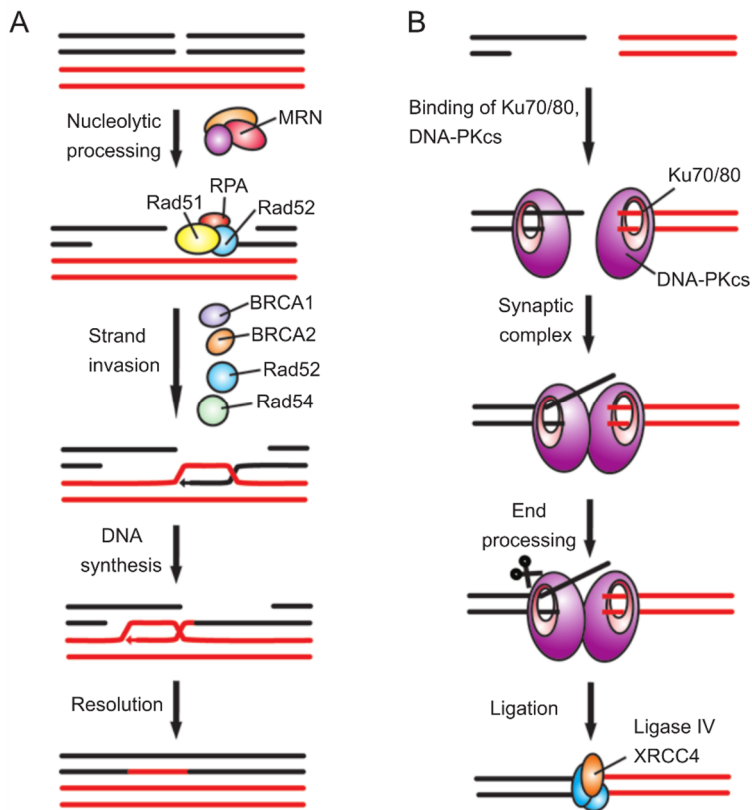


Figure 9 : Mécanisme de réparation d'une cassure d'ADN double brin (double-strand DNA breaks DSB) (Weterings et Chen, 2008).

A: Mécanisme de réparation par recombinaison homologue (HR) entre un ADN matrice (chromatide sœur) et le site de cassure, impliquant différents partenaires protéiques; **B:** Mécanisme de réparation par jonction d'extrémités non homologues (non-homologous end joining NHEJ).

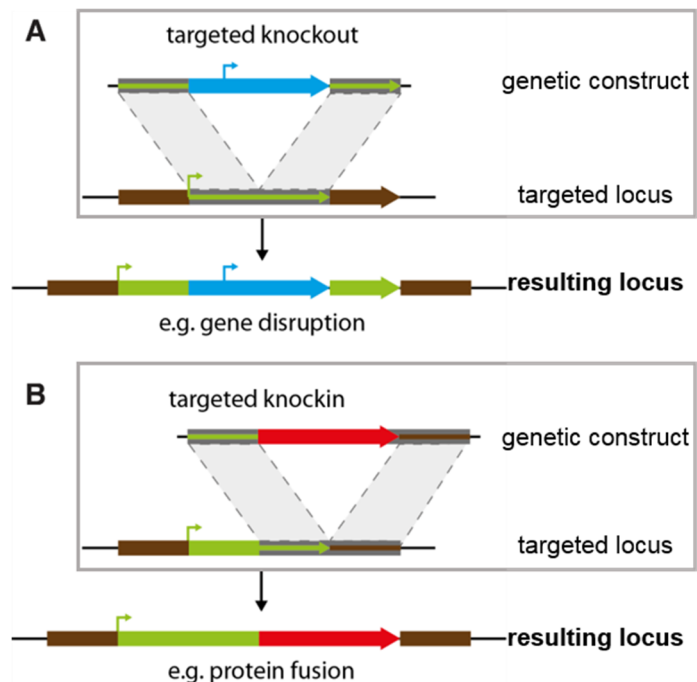


Figure 10 : Intégration d'un transgène par recombinaison homologue entre un fragment d'ADN exogène et l'ADN génomique (Strotbek et al, 2013).

A: Inactivation d'un gène par remplacement d'une partie de la séquence codante par un gène de sélection (exemple NPTII); **B:** Intégration ciblée d'une séquence codante, par exemple pour générer une protéine de fusion.

P. patens est donc un modèle de choix pour le ciblage de gènes (gene targeting, GT), par l'intégration d'un transgène à un locus donné par recombinaison homologue (Mengiste and Paszkowski, 1999). Le ciblage d'un gène est réalisé par la transfection de protoplastes de *P. patens* par un transgène flanqué en 5' et 3' par deux régions homologues au locus ciblé (Strotbek et al, 2013). Par ce système, on peut désactiver un gène par l'intégration d'un gène de sélection dans le locus ciblé (**Figure 10A**), ou intégrer un transgène à la suite d'un gène natif pour obtenir une protéine de fusion (i.e construction GUS) (**Figure 10B**). On peut également remplacer un gène par un autre, selon une approche de knock-in/knock-out, ce qui permet, en autres, de cibler des gènes non essentiels, comme montré chez *E. coli* (Sabri et al, 2013). Les régions homologues ayant une taille de 1kb chacune permettent d'atteindre une fréquence d'intégration du transgène de 50% (Kamisugi et al, 2005).

L'utilisation de *P. patens* en biotechnologie

Grâce à ses nombreux avantages (facilité de culture à grande échelle, recombinaison homologue...), *P. patens* est un bon modèle pour la production de molécules d'intérêt pour la santé humaine ou la cosmétique. Par exemple, des lignées transformées de *P. patens* peuvent produire du patchoulol, une molécule utilisée dans l'industrie du parfum (Zhan et al, 2014), du taxadiène précurseur de molécules anticancéreuses (Anterola et al, 2009), ou des glycoprotéines humaines comme l'érythropoïétine (Weise et al, 2007). L'entreprise Greenovation est spécialisée dans la production de protéines thérapeutiques à partir de mousse comme par exemple l' α -galactosidase A, utilisée pour combler le déficit en cette protéine dû à la maladie de Fabry. L'utilisation des plantes pour la production de glycoprotéines à visée thérapeutique a longtemps été limitée par le fait que les plantes réalisent des modifications post-traductionnelles (ajout de xylose et fucose) qui ont un potentiel allergène pour l'humain. Dans le cas de *P. patens*, il est possible d'utiliser des lignées knock-out pour les enzymes qui réalisent ces modifications (Koprivova et al, 2004). L'entreprise Mibelle a, quant à elle, développé le MossCellTec NO.1, un actif cosmétique issu de protonema de *P. patens*. Enfin, Tychobio effectue des recherches sur l'ingénierie métabolique de *P. patens* afin de construire de nouvelles voies métaboliques.

Etude du métabolisme phénolique chez *P. patens*

Des analyses phylogénomiques ont suggéré que *P. patens* possède au moins un gène homologue de ceux qui codent les enzymes réalisant chacune des étapes menant à la biosynthèse de shikimate (Tohge et al, 2013).

Une approche BLASTp a mis en évidence plusieurs protéines homologues de la voie centrale des phénylpropanoïdes chez *P. patens*, partageant une identité de séquence supérieure à 80% avec celles d'*Arabidopsis thaliana* (de Vries et al, 2017 ; couleur orange **Figure 11**). En revanche, la plupart des protéines homologues mises en évidence pour la synthèse de coumarines, lignine, flavonoïdes et autres phénylpropanoïdes partagent une faible identité de séquence avec les protéines de référence.

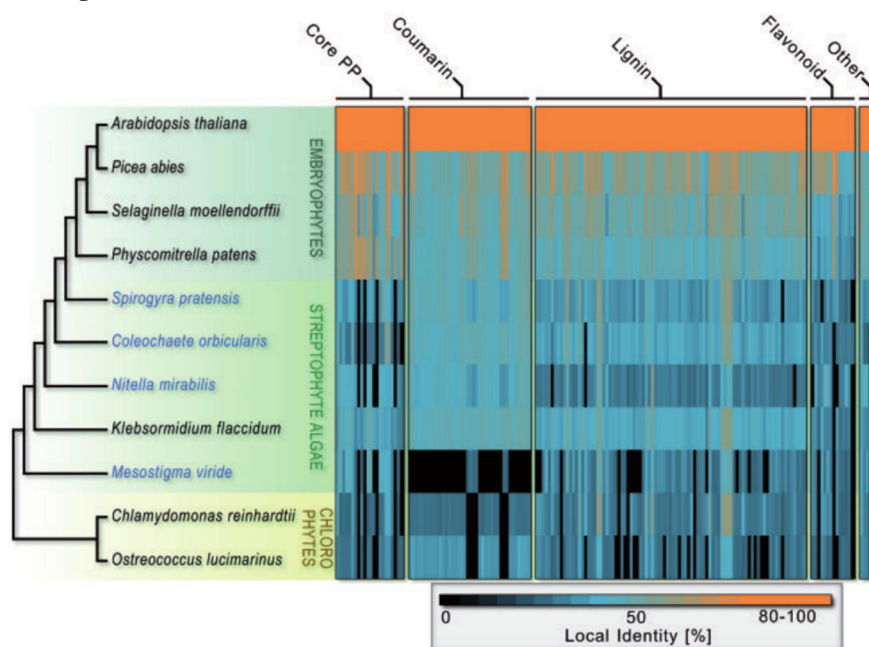


Figure 11 : Matrice de similarité des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes entre les enzymes caractérisées chez *A. thaliana* et les plus proches homologues présents chez des espèces de la lignée verte (de Vries et al, 2017).

Les protéines homologues ont été recherchées par BLASTp pour les espèces dont le génome est disponible (noms en noir), et par tBLASTn pour les espèces dont seul le transcriptome est disponible (noms en bleu). Les scores en noir indiquent l'absence d'homologue (Evaluate $<10^{-7}$).

Il est très intéressant de noter que chez les algues, on ne trouve que très peu de protéines homologues de la voie centrale des phénylpropanoïdes (absence symbolisée par la couleur noire **Figure 11**), et les autres protéines partagent une identité de séquence faible avec les protéines d'*A. thaliana* (couleur bleue **Figure 11**).

Ces données suggèrent clairement que le métabolisme des phénylpropanoïdes, et notamment la voie centrale, serait apparu chez les premières plantes terrestres.

Les premières plantes terrestres étant dépourvues de lignine, quel serait donc le rôle de ce métabolisme phénolique ancestral, s'il n'amène pas à la production de lignine ? L'utilisation de *P. patens*, phylogénétiquement proche des premières plantes terrestres, pourrait permettre de répondre à cette question.

Les recherches sur le métabolisme phénolique de *P. patens* ont commencé il y a quelques années au laboratoire. En collaboration avec le laboratoire de Ralf Reski de l'Université de Freiburg (Allemagne), les recherches se sont portées dans un premier temps sur l'enzyme CYP98, impliquée dans la 3' hydroxylation des esters de shikimate chez les plantes vasculaires (**Figure 6**) qui est codée par un seul gène dans le génome de mousse. Les travaux réalisés par Hugues Renault et al (2017) montrent que la voie des esters phénoliques existe chez *P. patens*, mais que l'intermédiaire hydroxylé ne serait pas un ester de shikimate, mais un ester de thréonate. D'autre part, la génération de lignées transgéniques délétées pour le gène *PpCYP98* entraîne une disparition complète du caféate libre et conjugué sous forme d'esters de thréonate, indiquant ainsi que la production de ces molécules est dépendante de l'enzyme CYP98. *In vitro*, PpCYP98 est capable de produire du caféoyl-thréonate à partir de *p*-coumaroyl-thréonate, mais pas d'hydroxyler directement le *p*-coumarate libre en caféate. De plus, les lignées $\Delta PpCYP98$ ont un phénotype de fusion d'organes, associé à une altération sévère de la cuticule (**Figure 12**). L'analyse de la composition chimique de la cuticule montre une disparition totale du caféate associée à une diminution de la teneur de certains monomères d'acides gras.

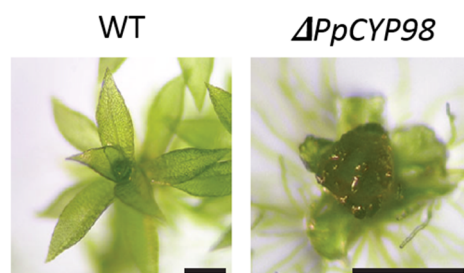


Figure 12 : Phénotype de fusion d'organes au niveau du gamétophore des lignées $\Delta PpCYP98$ (Renault et al, 2017).

En conclusion, la voie des phénylpropanoïdes existe chez *P. patens* et elle est impliquée dans la biosynthèse d'acides hydroxycinnamiques, en particulier le caféate, accumulé sous forme conjuguée au thréonate ou intégré dans la cuticule. Contrairement aux plantes vasculaires, la cuticule de *P. patens* est riche en acides hydroxycinnamiques et son élaboration est dépendante de ces derniers.

Objectifs de ma thèse

Ma thèse de doctorat a eu pour objectif de poursuivre l'exploration du métabolisme phénolique chez *P. patens*. La caractérisation de PpCYP98 a suggéré qu'il existait en amont une HydroxyCinnamoyl Transferase (HCT), responsable de la synthèse de *p*-coumaroyl-thréonate. Je me suis donc concentrée principalement sur des BAHD acyltransférases hydroxycinnamoyl-dépendantes, capables de transférer des résidus hydroxycinnamoyle à partir d'hydroxycinnamoyl-CoA (i.e *p*-coumaroyl-CoA, caféoyl-CoA, féruloyl-CoA) sur des composés accepteurs dotés d'une fonction alcool. Cette activité enzymatique résulte en la production d'un ester. Une partie de mon travail s'est concentrée sur la caractérisation de PpHCT, l'homologue des HCTs déjà caractérisées chez les plantes vasculaires, qui fait l'objet du **Chapitre 1**.

Nous avons précédemment montré que l'abolition du métabolisme phénolique chez *P. patens* induisait une altération sévère de la cuticule, associée à une disparition complète de caféate et une diminution de certains monomères d'acides gras (Renault et al, 2017). Ces observations ont suggéré que le caféate pourrait être incorporé dans la cuticule sous forme d'un conjugué d'acides gras. Le **Chapitre 2** est donc consacré à la caractérisation de PpFHT, une BAHD acyltransférase responsable de la synthèse d'un ester de caféate et d'acide gras, précurseur potentiel de la cuticule.

Comme décrit précédemment, le métabolisme des phénylpropanoïdes comprend une très grande variété de molécules phénoliques. Les flavonoïdes sont de puissants écrans UV qui ont pu participer à l'adaptation au milieu terrestre. Nous nous sommes demandé si *P. patens* était capable de synthétiser de telles molécules. Le **Chapitre 3** concerne donc la recherche et la caractérisation de gènes homologues de la voie de biosynthèse des flavonoïdes chez *P. patens*. Il inclut également une approche d'ingénierie métabolique visant à produire la dihydromyricétine, un flavonoïde polyhydroxylé, par l'intégration simultanée de plusieurs séquences codantes de pétunia, chez qui la voie des flavonoïdes est très active. Jusqu'à maintenant, l'expression hétérologue stable de gènes dans *P. patens* à des fins appliquées concernait uniquement l'intégration d'une seule séquence codante : le gène codant pour la taxadiène synthase provenant de *Taxus brevifolia* (Anterola et al, 2009) ou celui codant la patchoulol synthase de *Pogostemon cablin* (Zhan et al, 2014). Le but de mon travail était

d'évaluer la possibilité de reconstruire une voie métabolique complète, impliquant l'intégration de multiples gènes.

REFERENCES

- Aigner, S., Remias, D., Karsten, U., and Holzinger, A.** (2013). Unusual phenolic compounds contribute to ecophysiological performance in the purple-colored green alga *Zygonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) from a high-alpine habitat. *Journal of Phycology* 49, 648–660.
- Akula, R., and Ravishankar, G.A.** (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1720–1731.
- Anterola, A., Shanle, E., Perroud, P.-F., and Quatrano, R.** (2009). Production of taxa-4(5),11(12)-diene by transgenic *Physcomitrella patens*. *Transgenic Research* 18, 655–660.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., and Pesquet, E.** (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany* 115, 1053–1074.
- Barros, J., Serrani-Yarce, J.C., Chen, F., Baxter, D., Venables, B.J., and Dixon, R.A.** (2016). Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis. *Nature Plants* 2, 16050.
- Bassard, J.-E., Ullmann, P., Bernier, F., and Werck-Reichhart, D.** (2010). Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 71, 1808–1824.
- Beerling, D.J., and Berner, R.A.** (2005). Feedbacks and the coevolution of plants and atmospheric CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 1302–1305.
- Beisson, F., Li-Beisson, Y., and Pollard, M.** (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 329–337.
- Bhatia, S., Sharma, K., Sharma, A., Garg, A., Kumar, S., and Purohit, A.** (2011). Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation. *Pharmacognosy Reviews* 5, 138–146.
- Blackmore, S., Wortley, A.H., Skvarla, J.J., and Rowley, J.R.** (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist* 174, 483–498.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M.** (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54, 519–546.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., and Matern, U.** (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews* 5, 293–308.
- Carletti, G., Nervo, G., and Cattivelli, L.** (2014). Flavonoids and Melanins: A Common Strategy across Two Kingdoms. *International Journal of Biological Sciences* 10, 1159–1170.
- Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B., and Saindrenan, P.** (2002). Downregulation of a Pathogen-Responsive Tobacco UDP-Glc:Phenylpropanoid Glucosyltransferase Reduces Scopoletin Glucoside Accumulation, Enhances Oxidative Stress, and Weakens Virus Resistance. *Plant Cell* 14, 1093–1107.
- Chong, J., Poutaraud, A., and Hugueney, P.** (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 177, 143–155.
- Clé, C., Hill, L.M., Niggeweg, R., Martin, C.R., Guisez, Y., Prinsen, E., and Jansen, M.A.K.** (2008). Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*;

consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69, 2149–2156.

Clifford, M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 362–372.

Collonnier, C., Epert, A., Mara, K., Maclot, F., Guyon-Debast, A., Charlot, F., White, C., Schaefer, D.G., and Nogu , F. (2017). CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal* 15, 122–131.

Cook, N.C., and Samman, S. (1996). Flavonoids, Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources 7, 66-76.

D’Auria, J.C. (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 331–340.

Decker, E.L., and Reski, R. (2007). Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 393–398.

Delaux, P.-M., Radhakrishnan, G.V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J.D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., et al. (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 13390–13395.

Delwiche, C.F., Graham, L.E., and Thomson, N. (1989). Lignin-Like Compounds and Sporopollenin Coleochaete, an Algal Model for Land Plant Ancestry. *Science* 245, 399–401.

Dudareva, N., Pichersky, E., and Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology* 135, 1893–1902.

Emiliani, G., Fondi, M., Fani, R., and Gribaldo, S. (2009). A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biology Direct* 4, 7.

Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., and Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* 3: 222.

Fich, E.A., Segerson, N.A., and Rose, J.K.C. (2016). The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annual Review of Plant Biology* 67, 207–233.

Franke, R., Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Denault, J.W., Ruegger, M.O., Cusumano, J.C., and Chapple, C. (2002). The ArabidopsisREF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal* 30, 33–45.

Fraser, C.M., and Chapple, C. (2011). The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 9, e0152.

Gattuso, G., Caristi, C., Gargiulli, C., Bellocco, E., Toscano, G., and Leuzzi, U. (2006). Flavonoid Glycosides in Bergamot Juice (*Citrus bergamia* Risso). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3929–3935.

Gensel, P.G. (2008). The Earliest Land Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39, 459–477.

Gou, J.-Y., Yu, X.-H., and Liu, C.-J. (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 18855–18860.

- Gray, D.W., Lewis, L.A., and Cardon, Z.G.** (2007). Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives. *Plant, Cell & Environment* 30, 1240–1255.
- Grienenberger, E., Besseau, S., Geoffroy, P., Debayle, D., Heintz, D., Lapierre, C., Pollet, B., Heitz, T., and Legrand, M.** (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *The Plant Journal* 58, 246–259.
- Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., and Prior, R.L.** (2004). Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *The Journal of Nutrition* 134, 613–617.
- Hanin, M., and Paszkowski, J.** (2003). Plant genome modification by homologous recombination. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 157–162.
- Hart, J.H.** (1981). Role of Phytostilbenes in Decay and Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 19, 437–458.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J.** (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572–584.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.** (2003). Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 278, 95–103.
- Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M.** (2004). Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. *The Plant Cell Online* 16, 1446–1465.
- Hyun, M.W., Yun, Y.H., Kim, J.Y., and Kim, S.H.** (2011). Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase. *Mycobiology* 39, 257–265.
- Iwashina, T.** (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* 113, 287–299.
- Jiang, J., Zhang, Z., and Cao, J.** (2013). Pollen wall development: the associated enzymes and metabolic pathways. *Plant Biology* 15, 249–263.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E.** (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821.
- Kai, K., Mizutani, M., Kawamura, N., Yamamoto, R., Tamai, M., Yamaguchi, H., Sakata, K., and Shimizu, B.** (2008). Scopoletin is biosynthesized via *ortho*-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55, 989–999.
- Kamisugi, Y., Cuming, A. C., & Cove, D. J.** (2005). Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research*, 33, e173.
- Karsten, U., and Holzinger, A.** (2014). Green algae in alpine biological soil crust communities: acclimation strategies against ultraviolet radiation and dehydration. *Biodiversity and Conservation* 23, 1845–1858.

- Kegel, A., Martinez, P., Carter, S.D., Aström, S.U.** (2006). Genome wide distribution of illegitimate recombination events in *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research* *34*, 1633–1645.
- Kim, S.S., and Douglas, C.J.** (2013). Sporopollenin monomer biosynthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology* *56*, 1–6.
- Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D.R., Vassao, D.G., Jackson, B.L., Kish, C.M., Orlova, I., Spassova, S.M., Lewis, N.G., Noel, J.P., et al.** (2006). Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 10128–10133.
- Koprivova, A., Stemmer, C., Altmann, F., Hoffmann, A., Kopriva, S., Gorr, G., Reski, R., and Decker, E.L.** (2004). Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans: Targeted knockouts lacking plant-specific N-glycans. *Plant Biotechnology Journal* *2*, 517–523.
- Kosma, D.K., Molina, I., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2012). Identification of an *Arabidopsis* Fatty Alcohol:Caffeoyl-Coenzyme A Acyltransferase Required for the Synthesis of Alkyl Hydroxycinnamates in Root Waxes. *Plant Physiology* *160*, 237–248.
- Larbat, R., Kellner, S., Specker, S., Hehn, A., Gontier, E., Hans, J., Bourgaud, F., and Matern, U.** (2007). Molecular Cloning and Functional Characterization of Psoralen Synthase, the First Committed Monooxygenase of Furanocoumarin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 542–554.
- Lenton, T.M., Dahl, T.W., Daines, S.J., Mills, B.J.W., Ozaki, K., Saltzman, M.R., and Porada, P.** (2016). Earliest land plants created modern levels of atmospheric oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, 9704–9709.
- Li, X., and Heyer, W.-D.** (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research* *18*, 99–113.
- Maberly, S.C.** (2014). The fitness of the environments of air and water for photosynthesis, growth, reproduction and dispersal of photoautotrophs: An evolutionary and biogeochemical perspective. *Aquatic Botany* *118*, 4–13.
- Martone, P.T., Estevez, J.M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M.W., Somerville, C., and Ralph, J.** (2009). Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Current Biology* *19*, 169–175.
- Menand, B., Calder, G., and Dolan, L.** (2007). Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* *58*, 1843–1849.
- Mengiste, T., and Paszkowski, J.** (1999). Prospects for the Precise Engineering of Plant Genomes by Homologous Recombination. *Biological Chemistry* *380*, 749–758.
- Minami, E.-I., Ozeki, Y., Matsuoka, M., Koizuka, N., and Tanaka, Y.** (1989). Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants. *European Journal of Biochemistry* *185*, 19–25.
- Moore, K., Rao, P.V.S., and Towers, G.H.N.** (1967). Degradation of phenylalanine and tyrosine by basidiomycetes. *Life Sciences* *6*, 2629–2633.

- Niggeweg, R., Michael, A.J., and Martin, C.** (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22, 746–754.
- Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T., and Tanaka, Y.** (2006). Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 11075–11080.
- Osborne, C.P., Beerling, D.J., Lomax, B.H., and Chaloner, W.G.** (2004). Biophysical constraints on the origin of leaves inferred from the fossil record. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 10360–10362.
- Perroud, P.-F., Haas, F.B., Hiss, M., Ullrich, K.K., Alboresi, A., Amirebrahimi, M., Barry, K., Bassi, R., Bonhomme, S., Chen, H., et al.** (2018). The *Physcomitrella patens* gene atlas project: large-scale RNA-seq based expression data. *The Plant Journal* 95, 168–182.
- Prigge, M.J., and Bezanilla, M.** (2010). Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* 137, 3535–3543.
- Puttick, M.N., Morris, J.L., Williams, T.A., Cox, C.J., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C.H., Schneider, H., Pisani, D., et al.** (2018). The Interrelationships of Land Plants and the Nature of the Ancestral Embryophyte. *Current Biology* 28, 733–745.
- Rautengarten, C., Ebert, B., Ouellet, M., Nafisi, M., Baidoo, E.E.K., Benke, P., Stranne, M., Mukhopadhyay, A., Keasling, J.D., Sakuragi, Y., et al.** (2012). Arabidopsis Deficient in Cutin Ferulate Encodes a Transferase Required for Feruloylation of -Hydroxy Fatty Acids in Cutin Polyester. *Plant Physiology* 158, 654–665.
- Renault, H., Alber, A., Horst, N.A., Basilio Lopes, A., Fich, E.A., Kriegshauser, L., Wiedemann, G., Ullmann, P., Herrgott, L., Erhardt, M., et al.** (2017). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature Communications* 8, 14713.
- Rensing, S.A.** (2018a). Great moments in evolution: the conquest of land by plants. *Current Opinion in Plant Biology* 42, 49–54.
- Rensing, S.A.** (2018b). Plant Evolution: Phylogenetic Relationships between the Earliest Land Plants. *Current Biology* 28, R210–R213.
- Rensing, S.A., Kissel, C., Laj, C., Ninnemann, U.S., Richter, T.O., and Cortijo, E.** (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319, 60–64.
- Reski, R., and Abel, W.O.** (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354–358.
- Rippin, M., Becker, B., and Holzinger, A.** (2017). Enhanced Desiccation Tolerance in Mature Cultures of the Streptophytic Green Alga *Zygnema circumcarinatum* Revealed by Transcriptomics. *Plant and Cell Physiology* 58, 2067–2084.
- Sabri, S., Steen, J.A., Bongers, M., Nielsen, L.K., and Vickers, C.E.** (2013). Knock-in/Knock-out (KIKO) vectors for rapid integration of large DNA sequences, including whole metabolic pathways, onto the *Escherichia coli* chromosome at well-characterised loci. *Microbial Cell Factories* 12: 60.
- Saleme, M. de L.S., Cesarino, I., Vargas, L., Kim, H., Vanholme, R., Goeminne, G., Van Acker, R., de Assis Fonseca, F.C., Pallidis, A., and Voorend, W.** (2017). Silencing

CAFFEYOYL SHIKIMATE ESTERASE affects lignification and improves saccharification. *Plant Physiology* 175, 1040-1057.

Schaefer, D.G. (2001). Gene targeting in *Physcomitrella patens* 4, 143-150.

Schaeffer, S.M., and Nakata, P.A. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Science* 240, 130–142.

Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., and Werck-Reichhart, D. (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* Is a 3'-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276, 36566–36574.

Schwede, T.F., Rétey, J., and Schulz, G.E. (1999). Crystal Structure of Histidine Ammonia-Lyase Revealing a Novel Polypeptide Modification as the Catalytic Electrophile. *Biochemistry* 38, 5355–5361.

Stanjek, V., Piel, J., and Boland, W. (1999). Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae). *Phytochemistry* 50, 1141–1146.

Strotbek, C., Krininger, S., and Frank, W. (2013). The moss *Physcomitrella patens*: methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *The International Journal of Developmental Biology* 57, 553–564.

Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O. (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal* 48, 261–273.

Suchi, M., Sano, H., Mizuno, H., and Wada, Y. (1995). Molecular Cloning and Structural Characterization of the Human Histidase Gene (HAL). *Genomics* 29, 98–104.

Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., and Fernie, A.R. (2013a). Shikimate and Phenylalanine Biosynthesis in the Green Lineage. *Frontiers in Plant Science* 4: 62.

Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., and Fernie, A.R. (2013b). The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 48, 123–152.

Tzin, V., and Galili, G. (2010). The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book* 8, e0132.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* 153, 895–905.

Vanholme, R., Cesarino, I., Rataj, K., Xiao, Y., Sundin, L., Goeminne, G., Kim, H., Cross, J., Morreel, K., Araujo, P., et al. (2013). Caffeoyl Shikimate Esterase (CSE) Is an Enzyme in the Lignin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Science* 341, 1103–1106.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* 3, 2–20.

de Vries, J., and Archibald, J.M. (2018). Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist* 217, 1428-1434.

de Vries, J., de Vries, S., Slamovits, C.H., Rose, L.E., and Archibald, J.M. (2017). How Embryophytic is the Biosynthesis of Phenylpropanoids and their Derivatives in Streptophyte Algae? *Plant and Cell Physiology* 58, 934–945.

- Wallace, S., Fleming, A., Wellman, C.H., and Beerling, D.J.** (2011). Evolutionary development of the plant spore and pollen wall. *AoB PLANTS* 2011, plr027.
- Wang, J.P., Naik, P.P., Chen, H.-C., Shi, R., Lin, C.-Y., Liu, J., Shuford, C.M., Li, Q., Sun, Y.-H., Tunlaya-Anukit, S., et al.** (2014). Complete Proteomic-Based Enzyme Reaction and Inhibition Kinetics Reveal How Monolignol Biosynthetic Enzyme Families Affect Metabolic Flux and Lignin in *Populus trichocarpa*. *The Plant Cell* 26, 894–914.
- Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R., and Hawkins, S.** (2013). Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science* 4: 220.
- Wanner, L.A., Li, G., Ware, D., Somssich, I.E., and Davis, K.R.** (1995). The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 27, 327–338.
- Weise, A., Altmann, F., Rodriguez-Franco, M., Sjoberg, E.R., Bäumer, W., Launhardt, H., Kietzmann, M., and Gorr, G.** (2007). High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* Δ -fuc-t Δ -xyl-t mutant. *Plant Biotechnology Journal* 5, 389–401.
- Weng, J.-K., and Chapple, C.** (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis: Tansley review. *New Phytologist* 187, 273–285.
- Weterings, E., and Chen, D.J.** (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Research* 18, 114–124.
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M.S., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., et al.** (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, e4859–e4868.
- Wu, Z., Gui, S., Wang, S., and Ding, Y.** (2014). Molecular evolution and functional characterisation of an ancient phenylalanine ammonia-lyase gene (NnPAL1) from *Nelumbo nucifera*: novel insight into the evolution of the PAL family in angiosperms. *BMC Evolutionary Biology* 14: 100.
- Wu, J., Wang, X.-C., Liu, Y., Du, H., Shu, Q.-Y., Su, S., Wang, L.-J., Li, S.-S., and Wang, L.-S.** (2016). Flavone synthases from *Lonicera japonica* and *L. macranthoides* reveal differential flavone accumulation. *Scientific Reports* 6, 19245.
- Xu, F., Cai, R., Cheng, S., Du, H., Wang, Y., and Cheng, S.** (2008). Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*. *African Journal of Biotechnology* 7, 721-729.
- Xu, Z., Zhang, D., Hu, J., Zhou, X., Ye, X., Reichel, K.L., Stewart, N.R., Syrenne, R.D., Yang, X., Gao, P., et al.** (2009). Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics* 10, S3.
- Xu, J., Ding, Z., Vizcay-Barrena, G., Shi, J., Liang, W., Yuan, Z., Werck-Reichhart, D., Schreiber, L., Wilson, Z.A., and Zhang, D.** (2014). ABORTED MICROSPORES Acts as a Master Regulator of Pollen Wall Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26, 1544–1556.
- Zhan, X., Zhang, Y.-H., Chen, D.-F., and Simonsen, H.T.** (2014). Metabolic engineering of the moss *Physcomitrella patens* to produce the sesquiterpenoids patchoulol and α/β -santalene. *Frontiers in Plant Science* 5: 636.

Chapitre I:

PpHCT is a BAHD acyltransferase required for caffeate biosynthesis and cuticle formation in the moss *Physcomitrella patens*

Lucie Kriegshauser¹, Desirée Gütle², Annette Alber¹, Trevor H. Yeats³, Laurence Herrgott¹, Jocelyn K.C. Rose³, Ralf Reski^{2,4}, Danièle Werck-Reichhart¹ and Hugues Renault¹

¹Institute of Plant Molecular Biology | CNRS, University of Strasbourg, France

²Plant Biotechnology, Faculty of Biology, University of Freiburg, Germany

³Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

⁴BIOSS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg, Germany

SUMMARY

The plant phenylpropanoid pathway appeared upon plant terrestrialization and is thought to be critical for their adaptation to a dry environment. It was recently demonstrated via functional analysis of the moss homolog of the *p*-coumaroyl ester *meta*-hydroxylase (PpCYP98) that the early phenolic pathway provides caffeoyl structural building blocks for cuticle formation and control of water permeability. We identify here the BAHD hydroxycinnamoyl transferase (PpHCT) acting upstream and downstream of PpCYP98. We demonstrate that it is able to generate *p*-coumaroyl esters of threonate and provide evidence that it can function in a reversible manner to form caffeoyl-CoA. Deletion mutants of *PpHCT* show a stunted gametophore growth with organ fusion phenotype and increased water permeability characteristic of cuticle defect. Analysis of mutant gametophore cuticle composition reveals a total absence of caffeate monomers, a dramatic decrease in some essential aliphatic constituents, and the presence of an increased amount of *p*-coumaroyl units. Accumulation of *p*-coumaroyl threonate esters in the mutant is also pointed out by the analysis of soluble gametophore metabolites, which indicates the presence of an additional hydroxycinnamoyl transferase in moss. Our data thus demonstrate the early evolution of BAHD acyltransferases, which control the entry point to the synthesis of monolignols in vascular plants and reveal their ancestral role in cuticle formation in moss.

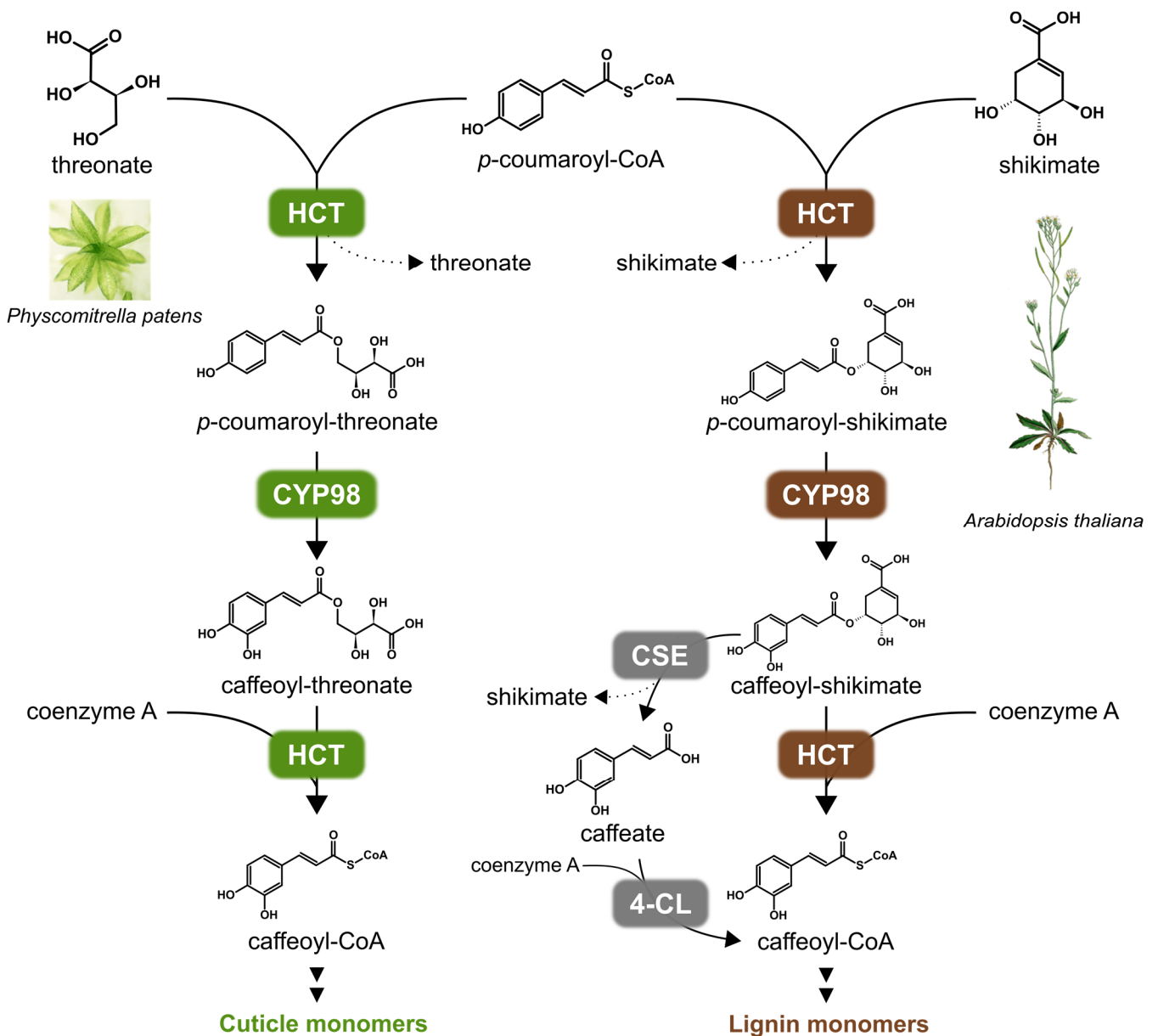


Figure 1: Formation of caffeoyl residues in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana*.

HCT: hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase (Hoffman et al, 2003; Hoffman et al, 2004); CYP98: *p*-coumaroyl-shikimate 3'-hydroxylase (C3'H) (Schoch et al, 2001; Franke et al, 2002); 4-CL: 4-coumaroyl CoA-ligase; CSE: caffeoyl shikimate esterase (Vanholme et al, 2013).

INTRODUCTION

The first land plants appeared around 500 million years ago (Mya), allowing formation of an oxygen-rich atmosphere by 400-420 Mya (Kenrick and Crane, 1997; Lenton et al, 2016). For land colonization, plants had to adapt to the challenges of early terrestrial environment, including drought, extreme temperatures, high radiance, or presence of microorganisms. Essential for this transition was the establishment of protective and structuring physical barriers. One of them is cuticle, mainly consisting in a lipidic polymer covering epidermis, which limits water loss and forms a barrier against UV light or microorganisms (Fich et al, 2016). Another is lignin, an extremely resistant phenolic polymer, which accumulates on the walls of sap-conducting vessels and allows erect plant growth (Weng et Chapple, 2010). Evolution of dedicated metabolism was thus required for their synthesis, and for the formation of other essential apoplastic barriers protecting in particular roots or reproductive cells and associating both lipids and phenolic constituents, suberin and sporopollenin (Graça, 2015; Brooks and Shaw, 1978). The phenylpropanoid pathway is one of the most critical branches of the plant adaptive metabolism. It is providing precursors for the synthesis of lignin, suberin and sporopollenin precursors, and for the formation of powerful UV screens and antioxidants (Vogt et al, 2010). Recent work in addition demonstrates that it provides essential building blocks for cuticle formation in basal land plants, such as the moss *Physcomitrella patens* (Renault et al, 2017).

The most common products generated by the phenylpropanoid pathway, including flavonoids, coumarins, stilbenes or monolignols, all derive from *p*-coumaroyl-CoA. The phenylpropanoid core pathway is usually initiated by a phenylalanine ammonia lyase (PAL), which catalyzes the non-oxidative deamination of phenylalanine to *trans*-cinnamate. The latter is subsequently hydroxylated by a membrane-bound cytochrome P450, a cinnamate 4-hydroxylase (C4H or CYP73) and conjugated to coenzyme A by a 4-coumaroyl CoA-ligase (4-CL) to form *p*-coumaroyl-CoA. First committed step to the lignin pathway is the hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT), which catalyzes transfer of the *p*-coumaroyl moiety from *p*-coumaroyl-CoA to shikimate, to form *p*-coumaroyl-shikimate (**Figure 1**) (Hoffman et al, 2003; Hoffman et al, 2004). The next step involves a second cytochrome P450, *p*-coumaroyl-shikimate 3'-hydroxylase (C3'H or CYP98), generating caffeoyl-shikimate (Schoch et al, 2001; Franke et al, 2002). Finally, HCT catalyzes the transfer of the caffeoyl moiety back to coenzyme A to release caffeoyl-CoA (Hoffman et al, 2003; Wang et al, 2014).

It has been shown that caffeoyl-CoA can also result from the release of caffeate from caffeoyl-shikimate by a caffeoyl shikimate esterase (CSE), caffeate being then conjugated with coenzyme A by a 4-CL (Vanholme et al, 2013; Saleme et al, 2017). The resulting caffeoyl-CoA is then further processed by several enzymes to generate monolignols (coniferyl alcohol and sinapyl alcohol), which are then polymerized into lignin.

HCT belongs to the BAHD acyltransferase family of proteins, sharing conserved HXXXDG and DFGWG signatures, and transferring acyl moiety from a coenzyme A activated donor to acyl-acceptors (D'Auria, 2006). A phylogenetic analysis of the BAHD family defines several clades, usually reflecting the nature of their preferred substrate. BAHD belonging to clade V are hydroxycinnamoyl transferases, using hydroxycinnamoyl derivatives as donors (*p*-coumaroyl-CoA, caffeoyl-CoA, feruloyl-CoA), but different acceptors such as organic acids (shikimate, quinate, threonate), amines or fatty acids. Clade V thus includes HCTs and hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferases (HQT), using shikimate and quinate as preferred acceptors, respectively. HQT generates chlorogenic acid (CGA) accumulating in some plant species such as apple or coffee (Clifford, 1999). Unlike caffeoyl-shikimate, CGA is not a key intermediate for lignin biosynthesis, but thought implicated in biotic and abiotic stress response, especially UV radiations (Clé et al, 2008; Niggeweg et al, 2004). *In vitro* activities of HCTs have been thoroughly investigated and it was shown that they can often use other acceptors than shikimate, for example 3-hydroxyanthranilate or 2,3-dihydroxybenzoate in *Coleus blumei* (Sander et Petersen, 2011), quinate in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* (Hoffman et al, 2003; Hoffman et al, 2004). This HCT substrate promiscuity seems to be common in land plants (Eudes et al, 2016). It has been proposed that a conserved arginine residue, located in the active site, is responsible for electrostatic interaction with the carboxyl of the acyl-acceptor, orienting the latter towards the enzyme catalytic center (Leong and Last, 2017). In *P. patens*, the major acylated intermediates formed by the phenylpropanoid pathway were shown to be threonate esters (*p*-coumaroyl-threonate and caffeoyl-threonate), while shikimate and quinate esters were not detected in the plant extracts (Renault et al, 2017).

In vivo functional analysis involving HCT silencing in *Pinus radiata* (Wagner et al, 2007), *A. thaliana* (Besseau et al 2007) and *Nicotiana benthamiana* (Hoffmann et al., 2004) always resulted in reduction in lignin content and reduced growth. Bryophytes and earlier divergent charophyte algae are devoid of lignin, although most of them seem to possess at least some of the genetic toolkit required to synthesize phenylpropanoids (de Vries et al, 2017). The nature

and the role of such ancestral phenylpropanoid derivatives are still poorly documented. In the bryophyte *P. patens*, $\Delta PpCYP98$ lines exhibit a typical organ fusion and a cuticle defect associated with a complete loss of caffeate derivatives, suggesting a role of the phenylpropanoid pathway in the formation of the cuticular polymer (Renault et al, 2017). Here, via a coupled *in vivo* and *in vitro* functional characterization of the *HCT* homolog in moss, we demonstrate the involvement of *PpHCT* (*Pp3c2_29140*) in the moss phenylpropanoid pathway and cuticle formation. We also reveal unforeseen complexity of the phenylpropanoid in basal land plants.

RESULTS

A phylogenetic approach to identify a candidate PpHCT

To identify candidate PpHCT in *P. patens*, we first conducted a BLASTp search using AtHCT sequence as query. The six first hits were strictly sharing the two BAHD family conserved signatures HXXXDG and DFGWG (D'Auria, 2006) (**Supplemental Figure 1**), they were thus kept for subsequent analysis. A multiple sequence alignment was then built with the full-length protein sequences of the six *P. patens* candidates together with 34 functionally characterized hydroxycinnamoyl-CoA-dependent BAHD transferases (**Supplemental Table 1**). Phylogenetic relationships between the 40 BAHD sequences were determined through a maximum likelihood approach. Tree structure revealed that only one *P. patens* sequence (*Pp3c2_29140*) was closely related to characterized HCTs reported to use shikimate or quinate as acyl acceptors and involved in the synthesis of lignin precursors (**Figure 2**). Other *P. patens* proteins were found associated with BAHD that use polyamine or aliphatic acyl acceptors. In addition, publicly available co-expression data derived from the *Physcomitrella patens* gene atlas project (Perroud et al, 2018) indicated that the *Pp3c2_29140* gene was tightly co-expressed with a gene coding for a 4-coumarate-CoA ligase (*Pp3c18_6360*) and PpCYP98 (*Pp3c22_19010*) (**Supplemental Figure 2**). *Pp3c2_29140*, later referred to as *PpHCT*, was thus considered as the best candidate and selected for further studies.

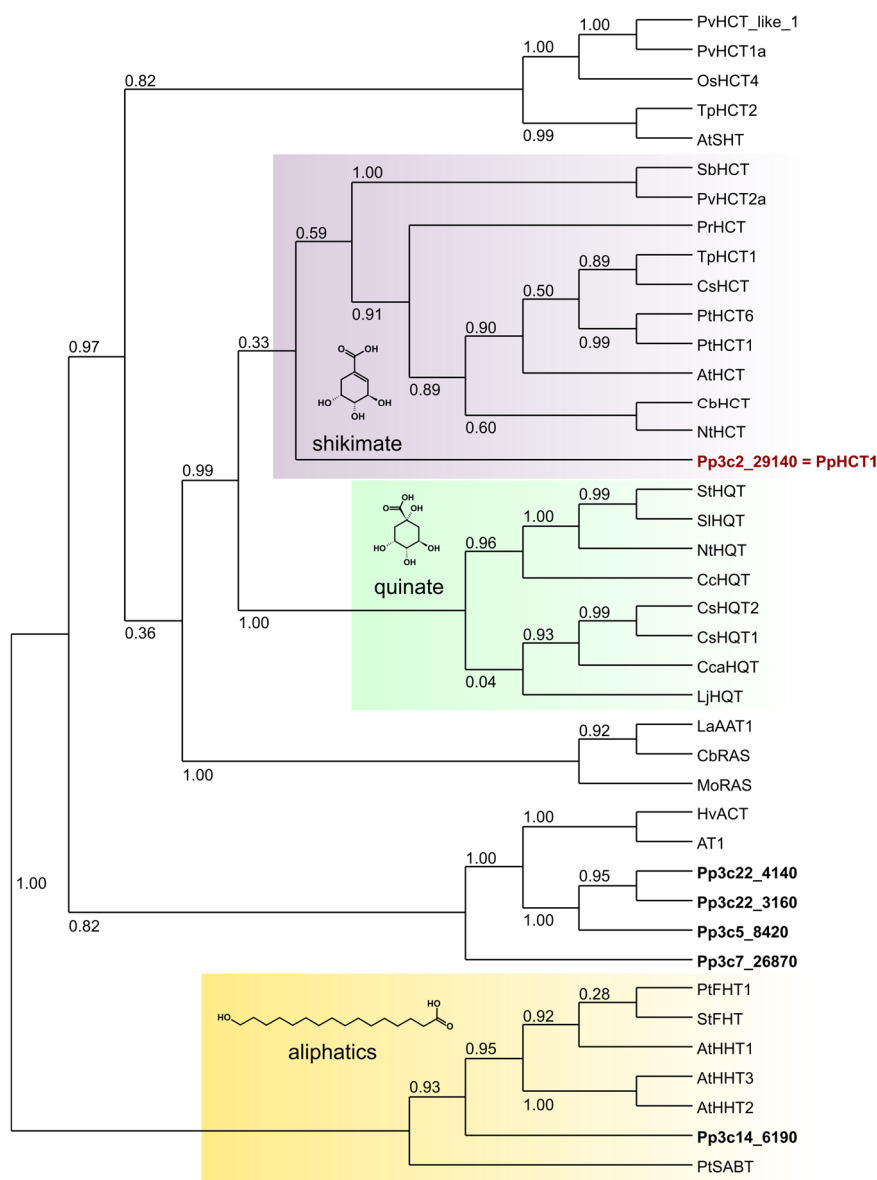


Figure 2: Cladogram of hydroxycinnamoyl-CoA-dependent BAHD transferases, including six putative BAHD of *P. patens*.

The BAHD proteins included in the cladogram were used for functional characterization and their accession numbers are listed in **Supplemental table 1**.

Recombinant PpHCT generates *p*-coumaroyl-threonate esters

The most abundant esters in *P. patens* gametophore extracts are *p*-coumaroyl- and caffeoyl-threonates. These latter were recently shown to be most likely derived from the 3' hydroxylation of *p*-coumaroyl-threonates by PpCYP98. Therefore, we expected PpHCT to generate *p*-coumaroyl-threonate from *p*-coumaroyl-CoA and threonate. To test this hypothesis, recombinant PpHCT was expressed in *Escherichia coli*, purified and incubated with *p*-coumaroyl-CoA and L-threonate. Resulting products were analyzed by UPLC-MS/MS, *p*-coumaroyl-threonate esters being detected based on specific single reaction monitoring (SRM)

transitions (**Figure 3**). This analysis revealed that PpHCT generated several positional isomers and diastereomers of *p*-coumaroyl-threonate. The major peak eluting at 5.6 min was identified as *p*-coumaroyl-4-threonate, and two minor peaks eluting at 4.83 and 4.96 min as *p*-coumaroyl-2-threonate.

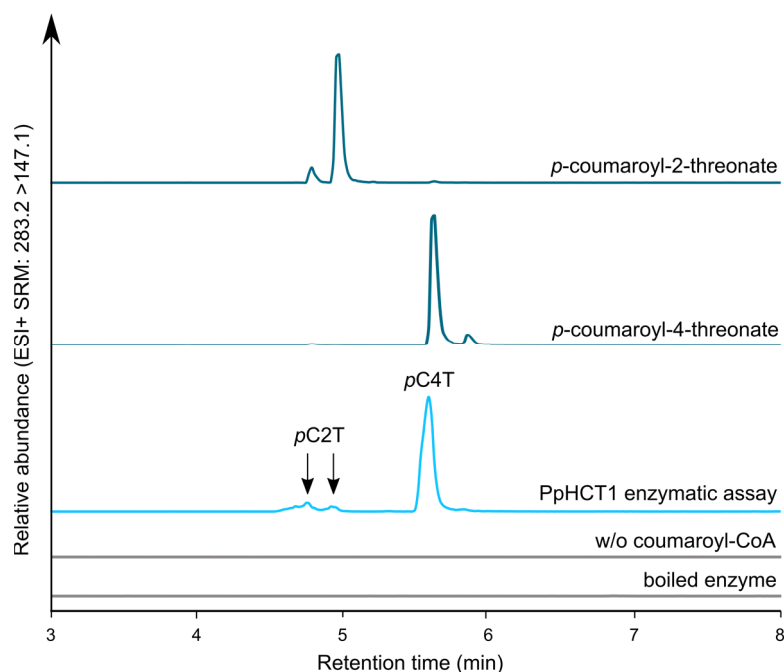


Figure 3: *In vitro* enzymatic conversion of *p*-coumaroyl-CoA and threonate into *p*-coumaroyl-threonate esters by PpHCT protein.

Assays were incubated for 25 minutes at 30°C and analyzed by UPLC-MS/MS using SRM transition of *p*-coumaroyl-threonate (ESI+ SRM: 283.2 > 147.1). Assays using boiled enzyme or without *p*-coumaroyl-CoA are used as controls.

Shikimate and quinate are usually considered as the physiological HCT acyl acceptors in higher plants. In addition, shikimate was reported to be metabolized by PpHCT in 4-CL-coupled whole yeast assays by Eudes et al. (2016). Therefore, we also tested PpHCT with shikimate and quinate as acyl acceptors *in vitro*. PpHCT was able to transfer *p*-coumarate from *p*-coumaroyl-CoA on both shikimate and quinate (**Supplemental Figure 3**), in each case generating of several positional isomers.

PpHCT catalyzes the deconjugation of caffeoyl-quininate into quininate and caffeoyl-CoA

The currently accepted phenylpropanoid pathway (**Figure 1**) assumes that caffeoyl shikimate or quininate esters have to be converted to caffeoyl-CoA. Direct conversion of caffeoyl-quininate or caffeoyl-shikimate and CoA into caffeoyl-CoA by HCT from tobacco and *Arabidopsis*, respectively, was previously demonstrated (Hoffman et al, 2003; Vanholme et al, 2013). To test if PpHCT can perform this reverse reaction, recombinant PpHCT was incubated with caffeoyl-quininate (as commercial chlorogenic acid) and CoA. This assay detected the formation of caffeoyl-CoA as well as a concomitant decrease in chlorogenic acid, compared to the controls

with boiled enzymes or incubated without CoA (**Figure 4**). However, the reverse reaction could not be further confirmed with caffeoyl-threonate, which was not available.

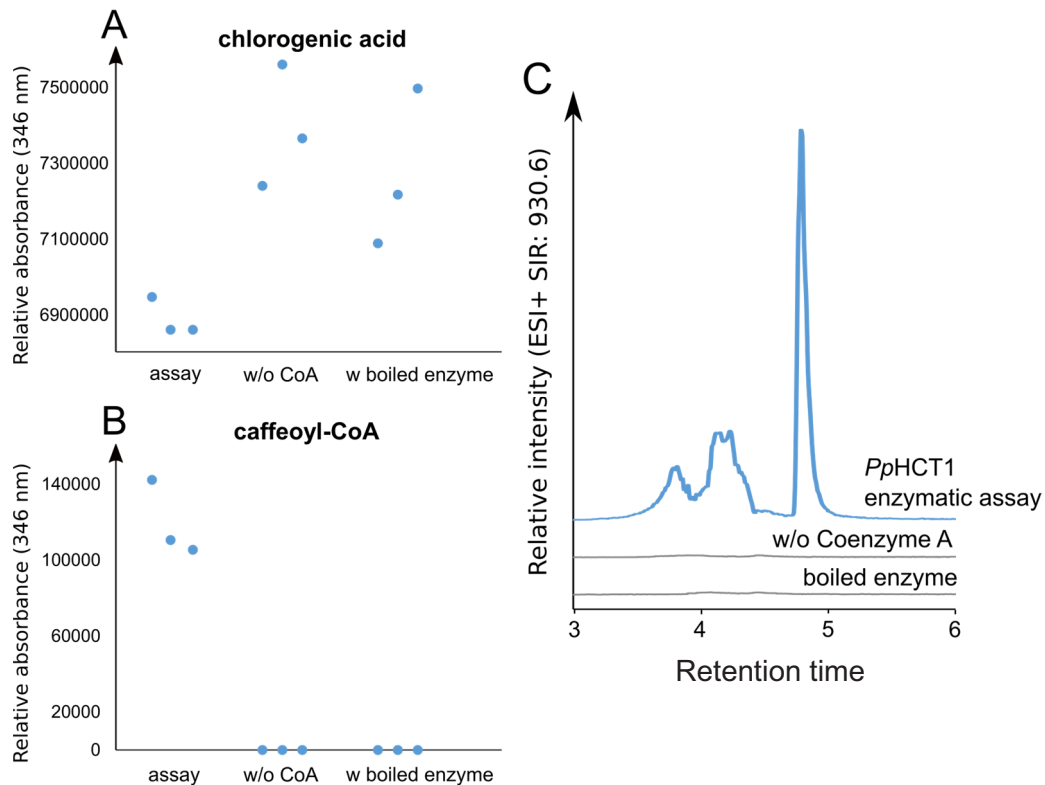


Figure 4: *In vitro* conversion of chlorogenic acid (caffeoyl-quininate) into caffeoyl-CoA by PpHCT.

Assays were incubated 25 minutes at 30°C. Assays with boiled enzyme or without coenzyme A were used as controls. **A and B:** HPLC-UV (346 nm) analysis of enzymatic incubation; **A:** Chlorogenic acid UV absorbance in assay and control reactions. **B:** Caffeoyl-CoA UV absorbance in assay and control reactions **C:** Caffeoyl-CoA detected by UPLC-MS using ESI+ SIR: 930.6 m/z.

Threonate is a substrate of HCTs from Bryophytes

A BAHD transferase using threonate as acyl acceptor was so far never reported. To determine if the ability to acylate threonate was restricted to PpHCT, the closest homologs of *Arabidopsis thaliana* (AtHCT) and *Marchantia polymorpha* (MpHCT) were expressed in *E. coli*, and their activities tested with threonate, quinate, or shikimate as acyl acceptors (**Figure 5**). Regardless of the protein, highest activity was recorded with shikimate as acceptor. AtHCT was the most effective at quinate and shikimate acylation, showing about 10-fold higher activity than PpHCT and MpHCT with these two substrates. PpHCT was, unexpectedly, more effective at shikimate than threonate acylation, and was more active with threonate as substrate than MpHCT. Activity of AtHCT with threonate as acceptor was barely detectable.

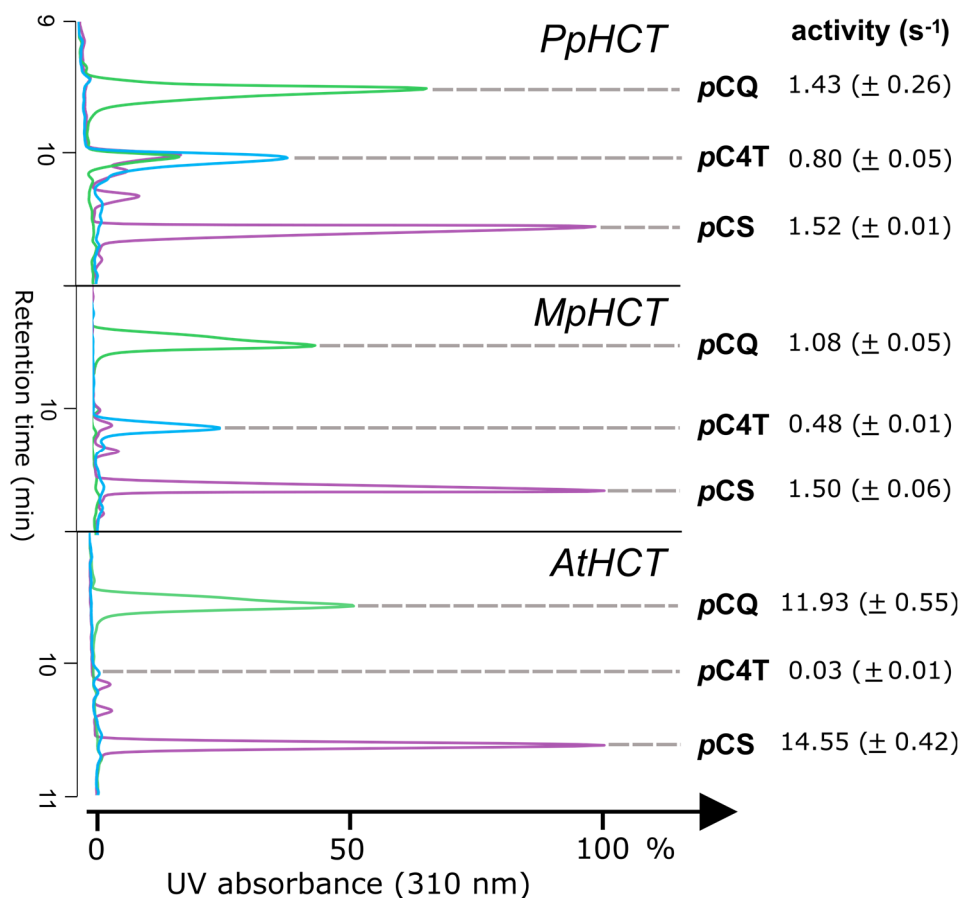


Figure 5: *In vitro* enzymatic conversion of *p*-coumaroyl-CoA and threonate, quinate or shikimate into *p*-coumaroyl esters by PpHCT, MpHCT and AtHCT proteins.

*p*CQ: *p*-coumaroyl-quinatate, *p*C4T: *p*-coumaroyl-4-threonate, *p*CS: *p*-coumaroyl-shikimate. Assays were incubated for 25 minutes at 30°C and analyzed by HPLC-UV at 310 nm. Blue lines correspond to incubation of *p*-coumaroyl-CoA with threonate, green line with quinate and purple line with shikimate. Chromatograms are normalized setting *p*-coumaroyl-shikimate (*p*CS) to 100%.

In vitro substrate preferences of PpHCT

To precise the substrate preference of PpHCT, we tested several acyl-CoA donors (*p*-coumaroyl-CoA, caffeoyl-CoA, feruloyl-CoA) in combination with different acceptors (threonate, shikimate and quinate). As shown in **Figure 6**, PpHCT was able to use all three acyl donors when shikimate was the acceptor. Unexpectedly, highest activity was observed with the combination of shikimate and feruloyl-CoA. PpHCT acceptor preference was less pronounced with *p*-coumaroyl-CoA as acyl donor. *p*-coumaroyl-CoA was the best donor with quinate as acceptor and the only compatible with threonate as acceptor.

Kinetic parameters were determined for the most relevant combinations with focus on *p*-coumaroyl-CoA as acyl donor. The results summarized in **Table 1** confirm a marked preference of PpHCT for shikimate as acceptor (K_m 220 μ M; K_{cat}/K_m 23 s⁻¹ mM⁻¹) rather than threonate

(K_m 17.23 mM, K_{cat}/K_m 0.009 s⁻¹ mM⁻¹). Such data suggest that threonate would need to be present in much higher concentration than shikimate in *P. patens* to be used as a substrate by PpHCT.

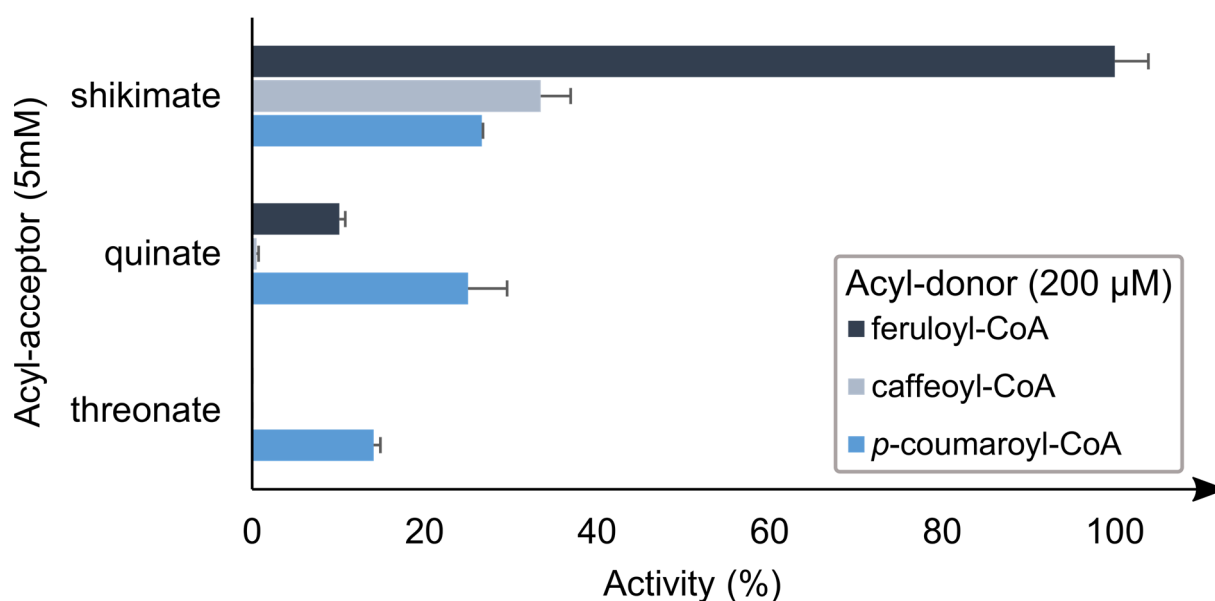


Figure 6: PpHCT-dependent *in vitro* conversion of different acyl-donors (feruloyl-CoA, caffeoyl-CoA and *p*-coumaroyl-CoA) in the presence of different acyl-acceptors (threonate, quinate or shikimate).

Assays were incubated for 25 minutes at 30°C. Results are mean of three independent replicates +/- standard deviation (except for *p*-coumaroyl-CoA and shikimate which is mean of two replicates), normalized to highest activity (activity with shikimate and feruloyl-CoA was set to 100%).

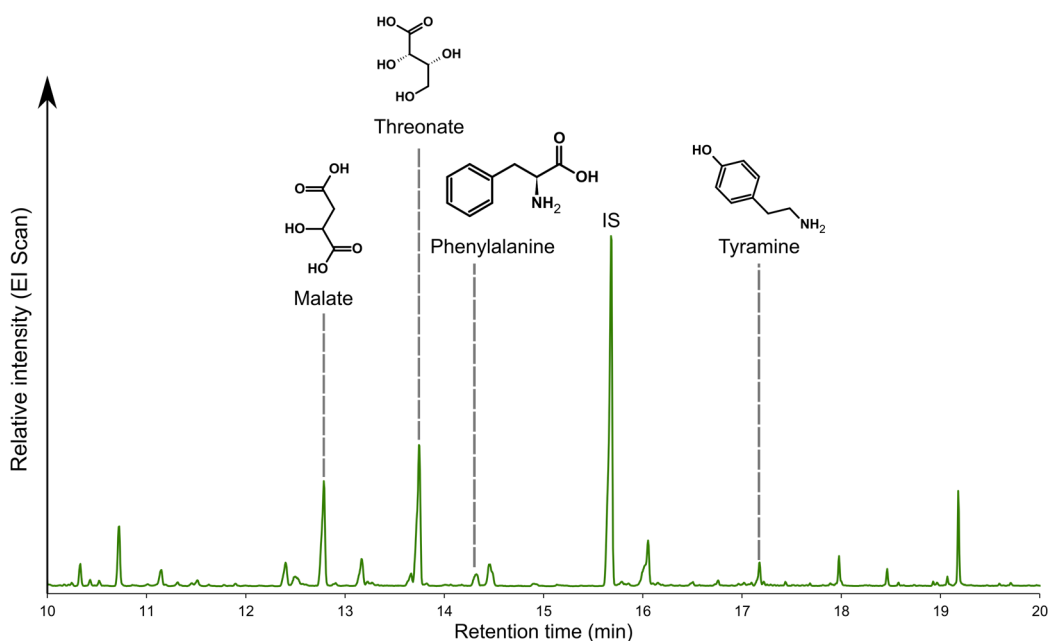
Table 1: Kinetic parameters of the recombinant PpHCT enzyme.

Assays were incubated for 10 minutes at 30°C. Fixed substrates are used at saturating concentration, except for threonate, which is used at the maximum concentration allowed by solubility in incubation buffer. Values are mean of three independent replicates +/- standard error. K_m and K_{cat} were determined using the nonlinear regression of Michaelis Menten using the GraphPad software (Supplemental Figure 4).

Substrates		K_m (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Fixed	Variable			
<i>p</i> -coumaroyl-CoA (200μM)	threonate	17.23 ±1.21	0.16 ±0.01	0.009
	quinate	9.44 ±1.61	3.48 ±0.28	0.4
	shikimate	0.22 ±0.03	5.01 ±0.14	23
threonate (32 mM)	<i>p</i> -coumaroyl-CoA	0.43 ±0.12	0.17 ±0.03	0.4
shikimate (8 mM)	<i>p</i> -coumaroyl-CoA	0.15 ±0.03	29.47 ±2.88	196

Threonate accumulates at high concentration in *P. patens* gametophore

To investigate this hypothesis, a GC-MS profiling of the major metabolites present in the growing *P. patens* gametophores was carried out (Figure 7). This analysis revealed that threonate was one of the most abundant free organic acids in the gametophore (more than 120 $\mu\text{moles/g DW}$). Shikimate and quinate were under detection limits, which is consistent with previous untargeted metabolic profiling of *P. patens* (Erxleben et al, 2012).



Compound ($\mu\text{moles/gDW}$)	WT gametophore	WT protonema
Tyramine	168.8 \pm 6.9	35.7 \pm 1.8
Threonate	127.7 \pm 20.6	50.9 \pm 8.0
Malate	56.96 \pm 4.4	54.5 \pm 19.9
Phenylalanine	5.75 \pm 0.4	4.28 \pm 0.1
Shikimate	-	-
Quinate	-	-
Glycerol	-	-
Tartaric acid	-	-
Anthranilate	-	-

Figure 7: Extracted ion chromatograms from GC-MS analysis of WT extract and absolute quantification of potential acyl-acceptors. Results are means \pm standard errors in three WT.

GC profiling also revealed the presence of high concentrations of malate and tyramine in the gametophore tissues, both of which were previously reported to be substrates for other acyltransferases (Sullivan, 2009; Back et al, 2001). Those were therefore tested as potential acyl acceptors using as donor *p*-coumaroyl-CoA, together with other potential acyl acceptors based on bibliographic data (anthranilate: Ishihara et al, 1998; glycerol: Kim et al, 2012; tartaric acid: Sullivan, 2014). None of them was found to be substrate of PpHCT.

PpHCT is required for the formation of caffeoyl-threonate

Coumaroyl- and caffeoyl-threonate esters were the main phenolic derivatives previously detected in *P. patens* (Renault et al. 2017). To determine if PpHCT was indeed responsible for their formation in the plant, four independent *P. patens* deletion mutants of *PpHCT* were generated. Analysis of the phenolic derivatives present in gametophore methanolic extracts of WT and $\Delta PpHCT$ lines revealed both qualitative and quantitative differences (**Figure 8A**), mainly corresponding to *p*-coumaroyl-2-threonate (*p*C2T), *p*-coumaroyl-4-threonate (*p*C4T) and their 3' hydroxylated derivatives caffeoyl-2-threonate (C2T) and caffeoyl-4-threonate (C4T). They were quantified by Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) based on mass transitions previously determined with synthetic standards (Renault et al, 2017). As expected if PpHCT generates the substrate(s) of PpCYP98, all caffeoyl-threonate derivatives were suppressed in $\Delta PpHCT$ lines (**Figure 8B**). More surprisingly, however, all *p*-coumaroyl-threonate isomers were, sometimes strongly (up to 6.5-fold in the case of a *p*C2T #2 isomer), increased in the $\Delta PpHCT$ lines compared to WT. No traces of shikimate or quinate esters were detected in WT nor mutant lines.

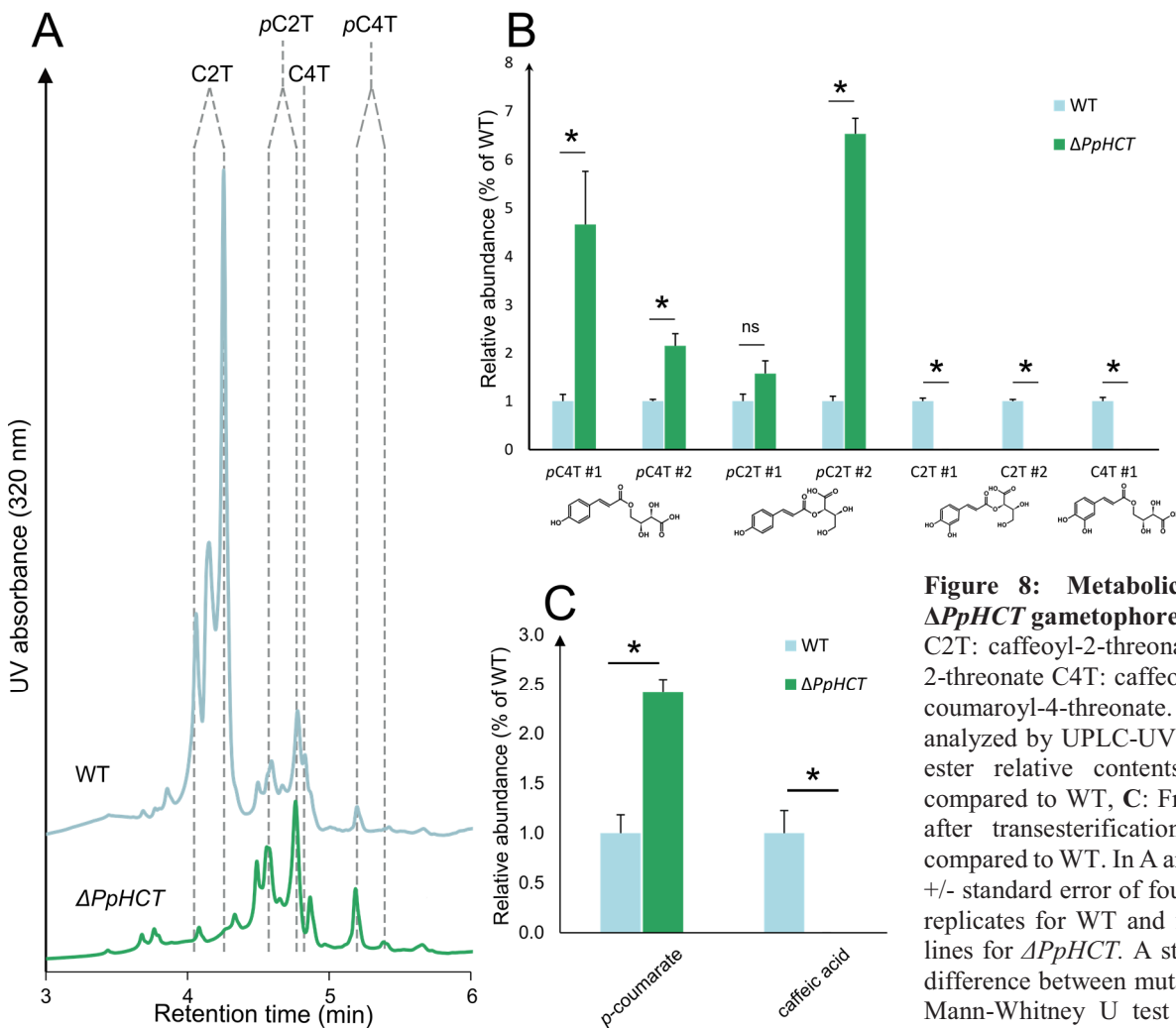


Figure 8: Metabolic profile of WT and $\Delta PpHCT$ gametophores.

C2T: caffeoyl-2-threonate, *p*C2T: *p*-coumaroyl-2-threonate C4T: caffeoyl-4-threonate, *p*C4T: *p*-coumaroyl-4-threonate. **A:** Methanolic extract analyzed by UPLC-UV (320 nm), **B:** Threonate ester relative contents in $\Delta PpHCT$ extracts compared to WT, **C:** Free acid relative contents after transesterification of $\Delta PpHCT$ extracts compared to WT. In A and B, results are the mean \pm standard error of four independent biological replicates for WT and four independent mutant lines for $\Delta PpHCT$. A star indicates a significant difference between mutant and WT according to Mann-Whitney U test (p -value<0.05); ns: not significant.

In order to detect other hydroxycinnamoyl intermediates, in particular caffeoyl conjugates that could be present in plant tissues, gametophore extracts were then submitted to acid hydrolysis before UPLC-MS/MS analysis (**Figure 8C**). No trace of caffeate and ferulate residues was detected in wild-type nor mutant lines. A strong coumarate increase however supported the previously recorded accumulation of *p*-coumaroyl-threonates in the $\Delta PpHCT$ mutant lines. *PpHCT* deletion thus abolishes the formation of free and conjugated caffeic acid.

PpHCT is required for moss cuticle formation

$\Delta PpCYP98$ mutant defects previously led to the conclusion that caffeate availability was critical for normal *P. patens* gametophore development and cuticle formation (Renault et al, 2017). $\Delta PpHCT$ lines, also totally devoid of caffeoyl residues, initially formed larger colonies than WT, due to protonema outgrowth (**Figure 9A**). Upon formation of gametophores, however, all four lines exhibited organ fusion associated with aborted gametophore development, reminiscent of the $\Delta PpCYP98$ phenotype (**Figure 9A-B**). A defect of the cuticle, the hydrophobic layer that coats the outer surface of the epidermis of aerial plant organs (Fich et al. 2016), often leads to developmental aberrations including organ fusion, as previously shown in *A. thaliana* (Kurdyukov et al, 2006; Wellesen et al, 2001) or *P. patens* (Renault et al, 2017). Tissue permeability was thus tested via toluidine blue (TB) staining of mutant and WT gametophores. The strong blue staining of $\Delta PpHCT$ confirmed their increased permeability (**Figure 7C**) compared to WT, and cuticle defect associated with *PpHCT* deletion.

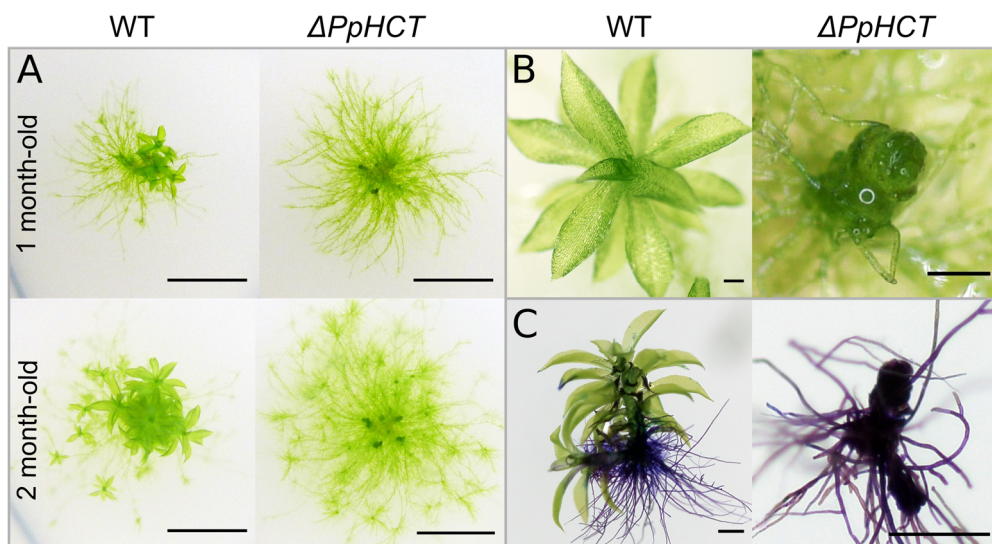


Figure 9: Development and permeability of the WT and $\Delta PpHCT$ gametophores.

A: One and two month-old colonies grown on agar plates, scale bar 0.5 cm **B:** Gametophore close-up views, scale bar 0.2 mm **C:** Toluidine blue stained gametophores, scale bar 0.5 mm.

$\Delta PpHCT$ cuticle has deeply altered phenolic and lipidic compositions

Cuticle essentially consists in a fatty acid-derived polyester, cutin, infiltrated and covered with waxes. In *P. patens*, cutin is mainly constituted of C16 or C18 fatty acids (Long-Chain Fatty Acids or LCFA), ω -hydroxylated LCFA, and phenylpropanoid derivatives (*p*-coumaric and caffeic acids) (Buda et al, 2013; Edstam et al, 2014). Waxes are largely formed by non-polymerized Very Long-Chain Fatty Acids (VLCFA), defined as fatty acids longer than 18 carbons. To determine the reason for increased permeability and cuticle alteration, cuticle monomeric composition of $\Delta PpHCT$ gametophore was analyzed. Both aliphatic and phenolic compositions were deeply modified in mutant lines (**Figure 10**). $\Delta PpHCT$ cuticle appeared totally devoid of caffeoyl residues, but showed a 3-fold increase in *p*-coumaroyl units compared to the WT, consistent with soluble phenolic analysis (**Figure 8C**). This change in phenolic composition was accompanied by a dramatic decrease in LCFA and ω -hydroxylated LCFA, especially in C16 FA and (9,10),16 di-OH C16 FA. Wax VLCFA were also reduced, except C20:4. Minor decrease in total amounts of 2-OH-VLCFA, prominent constituents of plasma membrane sphingolipids (Nagano et al, 2012), however suggested that plasma membrane was only slightly affected. Absence of caffeate thus appeared to result in a severe interference with cuticle formation.

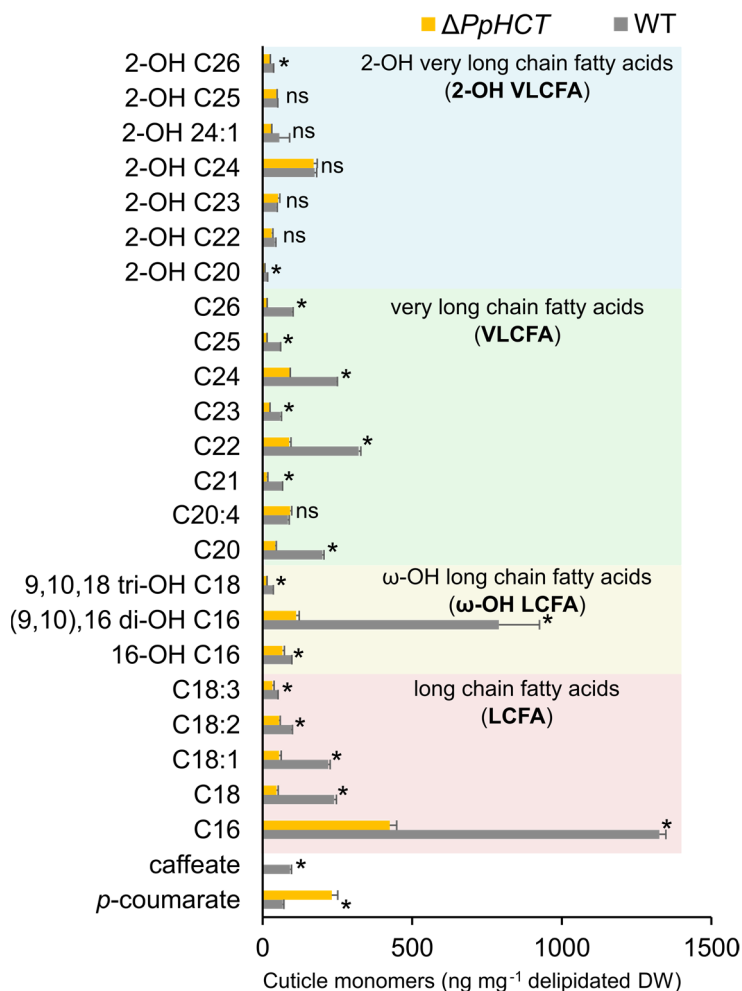


Figure 10: Cuticle monomeric composition of wild-type and $\Delta PpHCT$ gametophores.

Monomers were obtained by depolymerization of the insoluble fraction of gametophore tissues, and analyzed by GC-MS. Results are the mean \pm standard error of four independent biological replicates for WT and four independent mutant lines for $\Delta PpHCT$. Significant difference of mutant compared to WT from with Mann-Whitney U test: * p-value < 0.05; ns: not significant

PpHCT is expressed at the apex of the gametophore

The gametophore of *P. patens* has an apical growth (Prigge and Bezanilla, 2010) that requires *de novo* cuticle formation on emerging phyllids (Ingram and Nawrath, 2017). Moreover, *PpCYP98* was shown to be expressed at the apex of the gametophore (Renault et al, 2017). A similar expression pattern was thus expected for *PpHCT*. To assess the spatial expression of *PpHCT*, we generated *P. patens* lines expressing a fusion of the *PpHCT* gene with *uidA*, encoding bacterial *beta*-D-glucuronidase (GUS). These lines revealed that *PpHCT* was expressed, from an early stage, at the apex of the gametophore (**Figure 11A**). Conversely, GUS staining did not reveal significant expression in protonema, consistent with the absence of cuticle on protonema filaments (Wyatt et al, 2008). Lower expression in protonema than in gametophore was confirmed by quantitative RT-PCR (**Figure 11B**), detecting similar expression profiles for the three co-expressed genes *Pp4CL*, *PpCYP98* and *PpHCT*. In the $\Delta PpHCT$ lines, *Pp4CL* and *PpCYP98* expression was strongly reduced, which further indicated concerted expression of the moss phenolic pathway (**Figure 11C**).

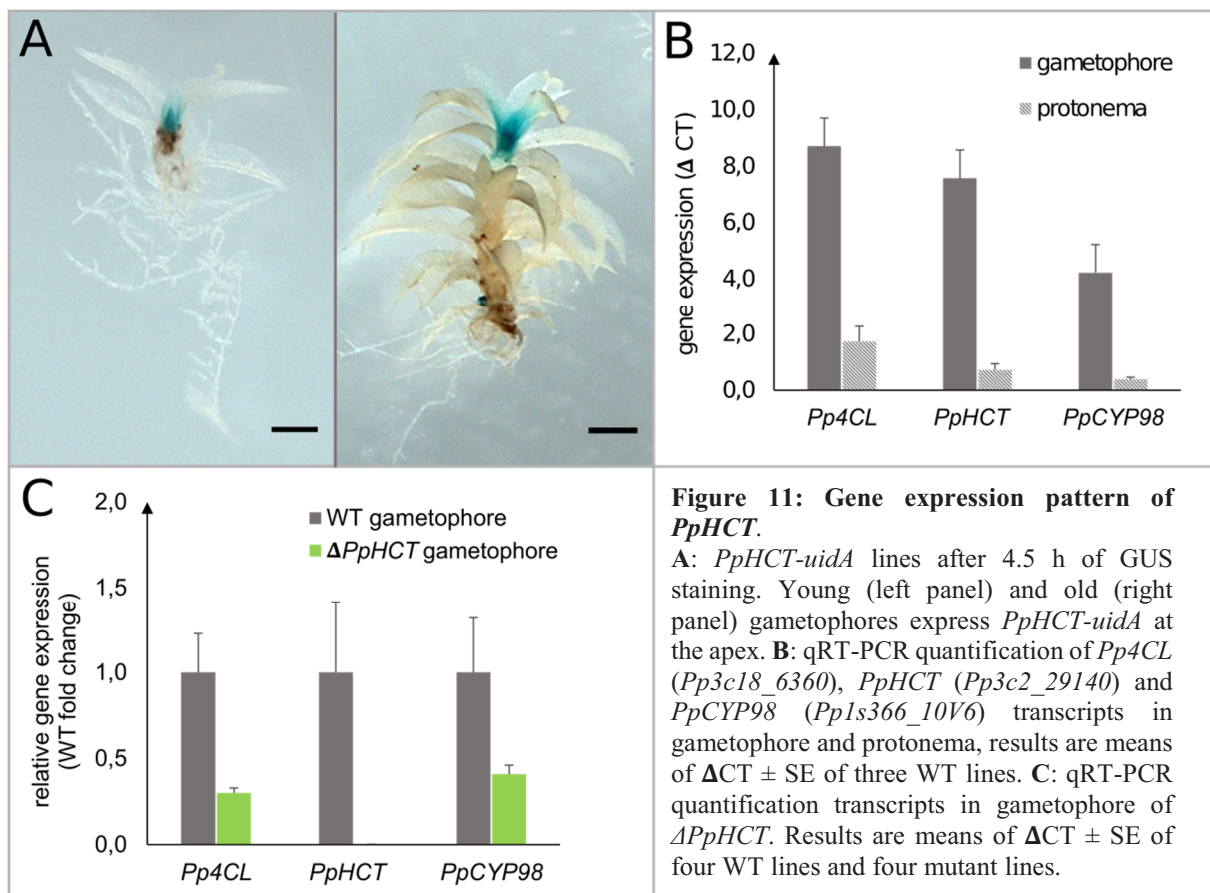


Figure 11: Gene expression pattern of *PpHCT*.

A: *PpHCT-uidA* lines after 4.5 h of GUS staining. Young (left panel) and old (right panel) gametophores express *PpHCT-uidA* at the apex. **B:** qRT-PCR quantification of *Pp4CL* (*Pp3c18_6360*), *PpHCT* (*Pp3c2_29140*) and *PpCYP98* (*Pp1s366_10V6*) transcripts in gametophore and protonema, results are means of $\Delta CT \pm SE$ of three WT lines. **C:** qRT-PCR quantification transcripts in gametophore of $\Delta PpHCT$. Results are means of $\Delta CT \pm SE$ of four WT lines and four mutant lines.

DISCUSSION

It has been previously demonstrated in several vascular plants, *N. benthamiana* (Hoffmann et al., 2004), *Medicago sativa* (Chen et al., 2006), *A. thaliana* (Besseau et al., 2007), or *Pinus radiata* (Wagner et al., 2007), that *HCT* silencing or suppression results in a strong reduction and/or compositional modification of lignin, usually associated with stunted growth. Whereas *in vitro* catalytic activities of several putative *HCT* orthologs in bryophytes, including *P. patens* have been reported (Eudes et al., 2016; Wang et al, 2017; Wu et al, 2018), we provide here the first *in vivo* *HCT* functional characterization in a non-vascular plant and associated new insight into early evolution of the phenylpropanoid pathway.

The most recent *in silico* mining of ancestral plant genomic and transcriptomic data concludes that the plant phenylpropanoid pathway most likely originated in streptophyte algae, the sister-group of land plants (de Vries et al, 2017). No *HCT* nor *CYP98* homologs are found in chlorophytes such as *Chlamydomonas reinhardtii* (Weng and Chapple, 2010), yet both of them seem to be present in charophytes. The two partner enzymes thus seem to have evolved simultaneously in the course of plant terrestrialization. This hypothesis is supported by the strikingly similar growth defect phenotypes of the $\Delta PpHCT$ and $\Delta PpCYP98$ mutants (Renault et al., 2017), and the essential role both of them share in gametophore development. In addition, *PpHCT* deletion leads to a complete loss of caffeate residues and impaired cuticle formation, like the deletion of *PpCYP98*. Moreover, *PpCYP98* *in vitro* metabolizes *p*-coumaroyl-threonates (Renault et al., 2017), the most likely *PpHCT* products *in vivo*.

Threonate is the most likely physiological substrate of PpHCT

Quite unexpectedly, *PpHCT* *in vitro* seems most active with shikimate as acceptor and a feruloyl donor, both of which are not detected *in vivo*. At this stage, our data unambiguously demonstrate that *PpHCT* is acting upstream of *PpCYP98*, but it is not possible to totally discard the possibility of a *meta*-hydroxylation occurring on shikimate/quininate esters like in vascular plants, as both *in vitro* *PpHCT* and *PpCYP98* substrate preferences would suggest (Albert A. PhD thesis, 2016). Transfer of caffeoyl residues would then occur after *meta*-hydroxylation and mediated by another transferase. Identification of the homolog of caffeoyl-shikimate esterase (CSE) in *P. patens* and the generation of the corresponding knock-out lines may allow the accumulation of shikimate/quininate esters and their detection, as previously shown in poplar (Saleme et al, 2017). Still, this possibility is made unlikely by the absence of detectable

shikimate and quinate in the moss extracts (although essential precursors of aromatic amino acids that must be present in trace amounts), the absence of detectable hydroxycinnamoyl-shikimate or hydroxycinnamoyl-quininate esters (Renault et al., 2017, and this work), and the very high concentrations of threonate that we show here to be present in the plant tissues. Assuming a volume of the *P. patens* gametophore vacuole similar to other plants (around 90% of the cell volume) and accumulation of threonate in the cytoplasm, threonate concentrations in contact with PpHCT would amount to about 10-fold the enzyme K_m for the compound.

The most striking difference between PpHCT and orthologs from vascular plants is the presence of a 144 amino acids flexible loop joining the two main folded domains of the protein (**Supplemental Figure 4**). To test the impact of this loop on the enzyme activity, two versions of the PpHCT protein were expressed in *E. coli*. The enzyme truncated from loop structure did not show any change in substrate preference, but just a small decrease in activity with threonate as acceptor, without alteration in activity for shikimate and quinate acylation (**Supplemental Figure 4**). It is thus possible that the additional loop present in bryophyte HCT homologs may favor threonate acylation.

***PpHCT* mutants reveal independent formation and function of *p*-coumaroyl and caffeoyl units in moss cuticle**

As PpHCT is expected to generate the *p*-coumaroyl ester substrate of CYP98, a suppression of both *p*-coumaroyl and caffeoyl threonate esters was expected in the mutants *PpHCT* lines. Not only *p*-coumaroyl esters increase in the soluble fraction of the *PpHCT* gametophore, but we also observe a doubling of bound *p*-coumaroyl units upon analysis of the cuticle constituents. The presence of a higher amount of *p*-coumaroyl units in the mutants reveals the existence of independent pathways to generate *p*-coumaroyl and caffeoyl units, probably involving a second transferase. Our data indicate that *p*-coumaroyl residues keep incorporated in the cuticle layer in the absence of caffeate when normal cuticle polymerization and major lipid incorporation are prevented. This suggests direct attachment of *p*-coumaroyl units to the cell wall sugar polymers or to another insoluble fraction. Overall, the observed dissociation of the synthesis and incorporation of the two phenolic cuticle constituents seems indicative of different roles of *p*-coumaroyl and caffeoyl units in cuticle architecture or protective function.

Physiological roles of PpHCT

As *P. patens* is devoid of lignin, its phenylpropanoid pathway aims to produce free hydroxycinnamic acid esters and precursors of the cuticular polymer. Knock-out mutants of *PpHCT* and *PpCYP98* (Renault et al, 2017) both show the same gametophore aborted growth and organ fusion phenotype, associated with a complete loss of cuticular caffeoyl units. In both of them, soluble caffeoyl esters are also suppressed. Cuticle is essential to control water permeability and provides plant protection against drought (Kosma et al, 2009; Lü et al, 2012) and other environmental stresses, including UV-B radiations (Krauss et al, 1991; Yeats et Rose, 2013) and microorganisms (Serrano et al, 2014). Soluble caffeoyl esters, as chlorogenic acids accumulating in some plant taxa, are also expected to provide a protection against UV radiation and oxidative stress (Clé et al, 2008). In addition to being key intermediates in cuticle precursors biosynthesis, threonate esters (or some of their isomers) are thus likely to be involved in stress responses, in the same way as chlorogenic acid in vascular plants. Indeed, caffeoyl-threonate esters are present in substantial amount in moss extract, contrary to caffeoyl-shikimate in vascular plants (Vanholme et al, 2013; Saleme et al, 2017). The severe developmental defect of $\Delta PpHCT$ and $\Delta PpCYP98$ mutants however prevents meaningful evaluation of their UV tolerance.

Phenolic compounds are minor but important components of the plant cuticle, since they are covalently attached to fatty acid monomers (Riley et Kolattukudy, 1975). Although hydroxycinnamic acids are contained in small proportion in the cuticle of vascular plants (Fich et al, 2016), more substantial amounts of *p*-coumarate and ferulate have been detected in the leaf cuticle of woody plants such as *Prunus persica* and *Olea europaea* (Liakopoulos et al, 2001), and tomato *Solanum lycopersicum* (Bolger et al, 2014). Caffeate was also reported in tomato (Bolger et al, 2014). Coumaric residues bound to cuticle were also found in several bryophyte species (Caldicott and Eglinton, 1976). The presence of larger amounts of caffeic acid might be a typical feature of early-diverging land plant lineages, although this characteristic has to be confirmed for a larger panel of bryophytes. We here confirm that the absence of caffeate in *P. patens* prevents the formation of the cuticle and interferes with cutin polymerization, as shown by the drastic decrease in major cutin monomers C16 FA and (9,10),16 di-OH C16 FA observed in both *PpHCT* and *PpCYP98* deletion mutants (**Figure 10**). This suggest an important role of the phenolic units for the anchoring or structuration of the cuticle lipidic scaffold, which has now to be further investigated.

MATERIALS AND METHODS

Phylogenetic analysis

Physcomitrella patens HCT-related sequences were identified by BLASTp using AtHCT protein as query and retrieved from the Phytozome database. Protein sequence of the first six BLASTp hits were aligned with 34 functionally characterized BAHD protein (full list in **Supplemental Table 1**) using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004). Phylogenetic relationships were reconstructed with the PhyML3.0 software by a maximum likelihood method and the LG evolution model (Le and Gascuel, 2008). A heuristic search for best trees was performed with the NNI algorithm. Branch tree supports were calculated with the approximate likelihood ratio test (Anisimova and Gascuel, 2006). All sequence manipulation and phylogenetic analyses were performed with the Seaview 4 software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>).

Plant material and growing conditions

Physcomitrella patens (Hedw.) Bruch & Schimp. strain Gransden (Rensing et al. 2008) was cultured in liquid or on solid Knop medium (Reski and Abel, 1985) supplemented with 50 mmol. L⁻¹ H₃BO₃, 50mmol.L⁻¹ MnSO₄, 15mmol.L⁻¹ ZnSO₄, 2.5 mmol.L⁻¹ KI, 0.5 mmol.L⁻¹ Na₂MoO₄, 0.05 mmol.L⁻¹ CuSO₄ and 0.05 mmol.L⁻¹ CoCl₂. Medium was solidified with 12 g.L⁻¹ purified agar (OXOID, Thermo Scientific). Plants were kept at 23°C under 16/8 h day/night cycle, light intensity set to 70 mmol.m⁻².s⁻¹. Gametophores were propagated on agar plates. Gametophore liquid cultures were established by soft tissue disruption (~ 15 s) of individual gametophores. Liquid cultures were kept under constant agitation for proper aeration and weekly subcultured.

Generation of transgenic lines

PpHCT knockout mutants were generated by protoplast transfection with a genetic disruption construct allowing introduction of the *NPTII* expression cassette into *PpHCT* locus by homologous recombination (**Supplemental Figure 5A**). Genetic construct was made by assembling two 750 bp genomic regions PCR-amplified from *P. patens* genomic DNA with the *NPTII* selection cassette by GIBSON cloning (Gibson et al, 2009). The assembled fragment was then PCR-amplified and blunt-end cloned into the pTA2 vector using the pJET1.2 cloning kit (Thermo Fisher). The *PpHCT* disruption construct was excised from vector backbone by *EcoRI* digestion, using restriction sites introduced during PCR. Final sterile DNA solution used

for PEG-mediated protoplast transfection contained 45 μ g (about 20 pmoles) of excised fragment in 0.1 M Ca(NO₃)₂. Protoplasts isolation, transfection and regeneration were performed according to Hohe et al, 2004. Transformants were selected on Knop plates supplemented with 25 mg l⁻¹ geneticin (G418).

For *PpHCT: uidA* reporter lines, two genomic regions for homologous recombination framing the *PpHCT* STOP codon were PCR-amplified from genomic DNA and assembled with the *uidA* reporter gene following the same procedures as above. A linker DNA sequence was introduced during PCR to limit GUS protein hindrance on *PpHCT* activity (**Supplemental Figure 6A**). The *PpHCT: uidA* construct was excised from the vector backbone by *NheI* digestion. 50 μ g of excised fragment were used for protoplasts transfection. Since the *PpHCT: uidA* does not contain any selection marker, it was co-transfected with the pRT101 plasmid (Girke et al, 1998) containing the *NPTII* selection cassette. Transformants were selected on Knop plates supplemented with 25 mg l⁻¹ geneticin (G418).

Molecular characterization of transgenic lines

PCR-based validation of genomic integration

Genomic DNA was extracted from a small amount of protonema collected under a hood using sterile forceps with 100 μ L of DNA extraction buffer (75 mM Tris pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄ and 0.01 % Tween 20) and incubated for 15min at 45°C under agitation (1400 rpm). Two μ l were used for PCR reaction using Phire II polymerase (Thermo Scientific) in a final volume of 20 μ l. Proper integration of genetic construct in the genome was assessed using a tailored PCR strategy (**Supplemental Figure 5B and 6B**) and primers listed in **Supplemental Table 2**. Lines with proper 5' and 3' integration of the genetic construct at the desired locus were subjected to further molecular characterization.

Transcript analysis by semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from 10 mg of lyophilized tissue with 1 ml of TriReagent (Sigma-Aldrich). After 5 minutes of agitation at room temperature, samples were centrifuged at 13,000 rpm at RT. After transfer of the supernatant to a new microtube, an equal volume of chloroform was added, and samples were then thoroughly vortexed and centrifuged at 13,000 rpm at RT to induce phase separation. The clear upper phase was recovered and transferred to a new microtube, RNA were precipitated by adding 0.1 volume of sodium acetate (NaOAc, 3M, pH 5.2) and 2.5 volumes of absolute ethanol. After incubation at -20°C for 2h, RNA was spin down by a centrifugation at 13,000 rpm at 4°C. Supernatant were discarded, the RNA pellet was

washed with 1 ml of 70% Ethanol, then dried at RT for 10 minutes and finally resuspended in DEPC-treated water.

Twenty micrograms of RNA were treated with 5U of RQ1 DNaseI (Promega) and subsequently purified using phenol-chloroform (50/50%-v/v) and precipitation by NaOAc/EtOH. One microgram of DNaseI-treated RNA was reverse-transcribed with oligo(dT) and the Superscript III enzyme (Thermo Scientific) in 20 µl reaction. *PpHCT* transcripts were amplified from two microliters of cDNA using the Phire II polymerase (Thermo Scientific) in 20 µl reaction. The constitutively expressed *L21* gene (Pp1s107_181V6.1), encoding a 60S ribosomal protein, was used as reference gene (**Supplemental Figure 5C**). Primers used for RT-PCR are visible in **Supplemental Table 2**. Lines with a complete absence of *HCT* transcripts were kept for subsequent validation steps.

Evaluation of transgene number by qPCR

To determine the number of integration events, a previously reported qPCR strategy was implemented (Renault et al, 2017). Quantitative PCR reactions contained in a 10 µL final volume: 10 ng genomic DNA, 5 µL LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2x (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and 500 nM of each forward and reverse primers. The primers used were designed using the online tool primer3plus (<http://primer3.ut.ee/>), ideally meeting the following criteria: GC content between 40 and 60%, T_m between 60 and 64°C, a size of 20 to 25 nt and allowing amplification of a fragment from 60 to 150 nucleotides. The qPCR primers used are listed in the **Supplemental Table 2**. Each reaction was performed in triplicate. Reactions were run in 384-well plates on a LightCycler® 480 device (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The amplification program consisted of a denaturation phase of 5 min at 95°C, followed by a series of 45 cycles (10 sec at 95°C, 15 sec at 60°C and 15 sec at 72°C), ending with a melting curve up to 95°C for 5 sec. The fluorescence intensity was recorded in real time. For each reaction, C_p was determined using the Second Maximum Derivative method with the LightCycler® 480 software, and primers efficiency were determined using the LinReg software (Ramakers et al, 2003). Input normalization was performed using the single gene *PpCLF*. Transgene copy number was determined by comparing relative values of the tested genomic segment in transgenic lines with those of the WT (**Supplemental Figure 5D**).

Determination of gene expression by qRT-PCR

Total RNA was isolated from 10 mg of lyophilized ground plant material with the TriReagent (Sigma-Aldrich) and treated with the RQ1 DNaseI (Promega) according to manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was retro-transcribed using the SuperScript III enzyme (ThermoFisher scientific) and an oligo(dT)₁₈. Quantitative PCR reactions consisted of 10 ng cDNA, 500 nM of each primers and 5 µl of 2X LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix (Roche) in a 10 µl final volume. Reactions were run in triplicates on a LightCycler® 480 II device (Roche). The amplification program was 95 °C for 10 min and 40 cycles (95 °C denaturation for 10 s, annealing at 60 °C for 15 s, extension at 72 °C for 15 s), followed by a melting curve analysis from 55 to 95 °C to check for transcripts specificity. Crossing points (Cp) were determined using the manufacturer's software. Cp values were corrected according to primer pair PCR efficiency computed with the LinReg PCR method (Ruijter et al, 2009). Pp3c19_1800 and Pp3c27_3270 genes were used as internal reference for expression normalization. List of qPCR primers is available in **Supplemental Table 2**.

Recombinant protein production

Coding sequences of PpHCT, MpHCT and AtHCT were PCR-amplified from cDNA using Gateway-compatible primers (**Supplemental Table 2**) and shuttled to the pHGWA expression vector by gateway cloning. *Escherichia coli* Rosetta2pLyS strain was transformed with the pHGWA plasmids containing the coding sequences. *E. coli* was cultivated in ZYP-5052 autoinducible medium. Recombinant proteins were purified by Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using an AKTA Pure 25 system equipped with HisTrap HP 1 mL column and submitted to gel filtration using a Superdex 200 increase 10/300 GL column. Purified recombinant proteins were conserved in solution 1x PBS and 10% glycerol.

In vitro enzymatic assays

Fourty millimolar stock solutions of shikimate and quinate (Sigma-Aldrich) were prepared in H₂O. Five millimolar stock solutions of *p*-coumaroyl-CoA, caffeoyl-CoA and feruloyl-CoA (Transmit) were prepared in H₂O. Eighty millimolar stock solution of L-threonic acid was prepared from its hemicalcium salt (Sigma-Aldrich # 380644) in H₂O containing 40 mM EDTA to chelate calcium and thus improve solubility.

Standard *in vitro* HCT assays were performed in 100 µL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 5µg recombinant PpHCT protein, 1mM dithiothreitol, 5 mM acyl-acceptor

(shikimate, quinate or threonate) and 200 μ M acyl-CoA (*p*-coumaroyl-CoA, caffeoyl-CoA or feruloyl-CoA). Reactions were initiated by addition of the acyl-CoA, incubated at 30°C for 25 minutes and stopped by addition of 100 μ L of acetonitrile. Reactions were analyzed by liquid chromatography.

To determine PpHCT kinetic parameters, substrate and enzyme concentrations were optimized for each tested reaction. For shikimate, 50 ng protein, 200 μ M *p*-coumaroyl-CoA and 0.125-8 mM shikimate were used. For quinate, 100 ng protein, 200 μ M *p*-coumaroyl-CoA and 0.312-20 mM quinate were used. For threonate, 2 μ g protein, 200 μ M *p*-coumaroyl-CoA and 4-32 mM L-threonate were used. For acyl-CoA, 50 ng protein and 8 mM shikimate, or 2 μ g protein and 32 mM threonate, and 3,125-400 μ M *p*-coumaroyl-CoA or caffeoyl-CoA were used. Reactions were initiated by addition of the saturating substrate and incubated at 30°C for 10 minutes, stopped by addition of 100 μ L of acetonitrile. Reactions were analysed by HPLC-PDA. Kinetic parameters were calculated with nonlinear regression of Michealis-Menten using the GraphPad Prism software (**Supplemental Figure 7**).

Metabolic profiling of *Physcomitrella patens*

Tissue collection and processing

Protonema material was harvested three days after tissue disruption and subculture. Gametophores in liquid culture were harvested 5 weeks after the last disruption, and 1 week after nutrient medium change. Plant material was collected by filtration on a 100 μ m pore size sieve, quickly blotted on paper towel and snap-frozen in liquid nitrogen. Samples were lyophilized for 2 days, and dry material was homogenized using 5 mm steel beads and a Tissuelyser II (Qiagen) for 1 min at 30Hz.

Metabolite extraction

Metabolites were extracted from 5mg dry plant powder with 500 μ L of 80% MeOH containing 10 μ M morin for LC analyses or 100 μ M ribitol for GC analyses as internal standards. After 1 hour of agitation at 1400 rpm and room temperature, samples were centrifuged at maximum speed at 4°C. 22 μ m-filtered supernatants constituted the crude metabolic extracts.

HPLC-UV chromatography

Metabolite separation and detection were carried out on a high-performance liquid chromatography system (Alliance 2695; Waters) coupled to a photodiode array detector (PDA 2996; Waters). Ten microliters of metabolic extract were injected onto a Kinetex Core-Shell C18 column (100 mm x 4.6 mm, 2.6 μ m particle size; Phenomenex). The mobile phase

consisted of a mix of H₂O + 0.1% formic acid (solvent A) and Acetonitrile (ACN) + 0.1% formic acid (solvent B). Needle and injection loops were washed with Weak (95% H₂O/5% ACN) and Strong (95% ACN/5% H₂O) solvents. Elution program was as follows: 0 min, 95% A; 15 min, 5% A (curve 8); 17 min, 5% A (curve 6); 18 min, 95% A (curve 6); 20 min, 95% A. Flow was set to 1 ml/min and column temperature to 28°C. Absorbance was recorded between 200 and 600 nm. The data were processed with the Empower 3 Software.

UPLC-MS/MS analysis

Separation and detection of metabolites were carried out by an ultra-high-performance liquid chromatography (Acquity UPLC, Waters) coupled to a photodiode array detector and a Quattro Premier XE Micromass mass spectrometer (Waters). Samples were injected onto an Acquity UPLC C18-BEH column (100 mm X 2.1 mm; 1.7 µm; Waters). The mobile phase consisted of a mix of H₂O + 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile (ACN) + 0.1% formic acid (solvent B). Needle and injection loops were washed with Weak (95% H₂O/5% ACN) and Strong (95% ACN/5% H₂O) solvents. The elution program was as follows: 0 min-98% A; 1.5 min-98% A (curve 6); 16 min- 50% A (curve 5); 16.5 min - 0% A (curve 6); 18 min- 0% A (curve 6); 18.5 min- 98% A (curve 6) ; 20 min- 98% A. Flow was set to 0.350 ml/min and column temperature to 28°C. The mass spectrometer was set as follows: the nebulizer gas flow (nitrogen) was set to 50 L/h, and the desolvation gas flow rate was set to 900 L/h. The interface temperature was set to 400°C, and the source temperature to 135°C. Capillary voltage has been set to 3.4 kV. The data were processed with the MassLynx software. Metabolite were ionized in positive mode and detected by specific MRM methods (**Supplemental Table 3**). The QuanLynx module of MassLynx was executed to integrate peaks and to report corresponding areas. Peak areas were normalized to plant dry weight and internal standard signal (morin), leading to relative levels. External calibration curves of authentic standards were employed for absolute quantification.

GC-MS analysis

For GC-MS analysis, 13 µl of crude metabolic extract were evaporated in a Speedvac concentrator (SPD121P ThermoScientific). Derivatization was carried out by addition of 50µL of pyridine containing 20mg.ml⁻¹ of O-Methoxyamine-HCL (Supelco), followed by an incubation at 40°C during 90 minutes under 900 rpm agitation. Then, 80µL of BSTFA (Sigma-Aldrich) were added and the mixture was incubated at 40°C during 30 minutes under 900 rpm agitation. The total volume (130µL) of derivatized sample was transferred into glass vials and subjected to GC-MS analysis.

Metabolite separation and detection were carried out on a gas chromatography (GC) Clarus 680 (PerkinElmer) coupled to a single-quad mass spectrometer with electron-impact ionization (EI) set to 70 eV. Ten microliters of sample were injected in Split mode. Injector temperature was set to 280°C and separation program was as follows: 50°C during 0.5 min, temperature increase from 50 to 200°C with a gradient of 10°C/min, from 200 to 280°C with a gradient of 20°C/min, from 280°C to 320°C with a gradient of 40°C/min, and a final step at 320°C for 9.5 minutes, for a total run duration of 31 minutes. Quantification of compounds was based on peak area from extracted ion chromatogram (EIC) by selecting *m/z* value typical for the given standard (Supplemental Figure 8).

Cuticle composition analysis

Cutin monomers analysis was performed on the same gametophore samples as used for metabolic analysis, according to a previously published protocol (Renault et al, 2017). Briefly, tissues were delipidated by extensive washing with a series of solvents. The delipidated tissues, including cuticle, were dried, weighed and chemically treated (12:3:5 methanol: methyl acetate: 25% sodium methoxide, 60°C, o/n) to depolymerize the cutin. Cuticle monomers were then derivatized with pyridine and BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide), dried again by heating under a stream of nitrogen, and resuspended in 100 µl of chloroform. The samples were analysed by gas chromatography (GC) using an Agilent GC 6850 with a Flame Ionization Detector. Compounds were identified based on a comparison of retention times with standards and also by performing GC–mass spectrometry (MS) using an Agilent GC 6890 coupled to a JEOL GC MATE II mass spectrometer. Monomers levels were normalized to the internal standards and the dry delipidated tissue weights.

GUS staining

Plant tissues were vacuum infiltrated during 10 min with X-Gluc solution (containing 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 0.5 mM ferrocyanide, 0.5 mM ferricyanide, 0.1% Triton X-100 1mM supplemented with 0.5 mg/ml X-Gluc) and incubated at 37 °C for 4.5 h. After appropriate staining, chlorophyll was removed by washing gametophores three times in 70% ethanol.

Permeability assay

The permeability test was performed by immersing the gametophores in a 0.05% toluidine blue solution for two minutes, then rinsing with water until the washing solution was clear.

REFERENCES

- Albert, A.** (2016). Phenolic 3-hydroxylases in land plants: biochemical diversity and molecular evolution. *Biochemistry, Molecular Biology*. Université de Strasbourg, English. <<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01591707/>>.
- Anisimova, M., and Gascuel, O.** (2006). Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Systematic Biology* 55, 539–552.
- Back, K., Jang, S.M., Lee, B.-C., Schmidt, A., Strack, D., and Kim, K.-M.** (2001). Cloning and Characterization of a Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine N-(Hydroxycinnamoyl)Transferase Induced in Response to UV-C and Wounding from *Capsicum annuum*. *Plant and Cell Physiology* 42, 475–481.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M.** (2007). Flavonoid Accumulation in Arabidopsis Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *The Plant Cell Online* 19, 148–162.
- Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M.E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T., Quesneville, H., Alseekh, S., Sørensen, I., Lichtenstein, G., et al.** (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics* 46, 1034–1038.
- Brooks, J., and Shaw, G.** (1978). Sporopollenin: A review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry. *Grana* 17, 91–97.
- Buda, G.J., Barnes, W.J., Fich, E.A., Park, S., Yeats, T.H., Zhao, L., Domozych, D.S., and Rose, J.K.C.** (2013). An ATP Binding Cassette Transporter Is Required for Cuticular Wax Deposition and Desiccation Tolerance in the Moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 25, 4000–4013.
- Caldicott A. B., Eglinton G.** (1976) Cutin acids from Bryophytes: an ω -1 hydroxy alkanolic acid in two liverwort species. *Phytochemistry* 15, 1139–1143.
- Chen, F., Srinivasa Reddy, M.S., Temple, S., Jackson, L., Shadle, G., and Dixon, R.A.** (2006). Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Plant Journal* 48, 113–124.
- Clé, C., Hill, L.M., Niggeweg, R., Martin, C.R., Guisez, Y., Prinsen, E., and Jansen, M.A.K.** (2008). Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69, 2149–2156.
- Clifford, M.N.** (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 362–372.
- D'Auria, J.C.** (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 331–340.
- Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.
- Edstam, M.M., Laurila, M., Höglund, A., Raman, A., Dahlström, K.M., Salminen, T.A., Edqvist, J., and Blomqvist, K.** (2014). Characterization of the GPI-anchored lipid transfer proteins in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology and Biochemistry* 75, 55–69.

- Erxleben, A., Gessler, A., Vervliet-Scheebaum, M., and Reski, R.** (2012). Metabolite profiling of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary conservation of osmoprotective substances. *Plant Cell Reports* *31*, 427–436.
- Eudes, A., Pereira, J.H., Yogiswara, S., Wang, G., Benites, V.T., Baidoo, E.E., Lee, T.S., Adams, P.D., Keasling, J.D., and Loqué, D.** (2016). Exploiting the Substrate Promiscuity of Hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimate Hydroxycinnamoyl Transferase to Reduce Lignin. *Plant and Cell Physiology* *57*, 568–579.
- Fich, E.A., Segerson, N.A., and Rose, J.K.C.** (2016). The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annual Review of Plant Biology* *67*, 207–233.
- Franke, R., Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Denault, J.W., Ruegger, M.O., Cusumano, J.C., and Chapple, C.** (2002). The ArabidopsisREF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal* *30*, 33–45.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison III, C.A., and Smith, H.O.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* *6*, 343.
- Girke, T., Schmidt, H., Reski, R., and Heinz, E.** (1998). Identification of a novel $\Delta 6$ -acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* *15*, 39–48.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., et al.** (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* *40*, D1178–D1186.
- Graça, J.** (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry* *3*:62.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.** (2003). Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 95–103.
- Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M.** (2004). Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. *The Plant Cell Online* *16*, 1446–1465.
- Hohe, A., Egner, T., Lucht, J.M., Holtorf, H., Reinhard, C., Schween, G., and Reski, R.** (2004). An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss, *Physcomitrella patens*. *Current Genetics* *44*, 339–347.
- Ishihara, A., Miyagawa, H., Matsukawa, T., Ueno, T., Mayama, S., and Iwamura, H.** (1998). Induction of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyl transferase activity by oligo-N-acetylchitooligosaccharides in oats. *Phytochemistry* *47*, 969–974.
- Ingram, G., and Nawrath, C.** (2017). The roles of the cuticle in plant development: organ adhesions and beyond. *Journal of Experimental Botany* *68*, 5307–5321.
- Kenrick, P., and Crane, P.R.** (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature* *389*, 33–39.

- Kim, I.A., Kim, B.-G., Kim, M., and Ahn, J.-H.** (2012). Characterization of hydroxycinnamoyltransferase from rice and its application for biological synthesis of hydroxycinnamoyl glycerols. *Phytochemistry* 76, 25–31.
- Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lu, S., Joubes, J., and Jenks, M.A.** (2009). The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of Arabidopsis. *Plant Physiology* 151, 1918–1929.
- Krauss, P., Markstadter, C., and Riederer, M.** (1997). Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant, Cell and Environment* 20, 1079–1085.
- Le, S.Q., and Gascuel, O.** (2008). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1307–1320.
- Lenton, T.M., Dahl, T.W., Daines, S.J., Mills, B.J.W., Ozaki, K., Saltzman, M.R., and Porada, P.** (2016). Earliest land plants created modern levels of atmospheric oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 9704–9709.
- Leong, B.J., and Last, R.L.** (2017). Promiscuity, impersonation and accommodation: evolution of plant specialized metabolism. *Current Opinion in Structural Biology* 47, 105–112.
- Liakopoulos, G., Stavrianiakou, S. and Karabourniotis, G.** (2001). Analysis of Epicuticular Phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* Leaves: Evidence for the Chemical Origin of the UV-induced Blue Fluorescence of Stomata. *Annals of Botany* 87, 641–648.
- Lu, S., Zhao, H., Des Marais, D.L., Parsons, E.P., Wen, X., Xu, X., Bangarusamy, D.K., Wang, G., Rowland, O., Juenger, T., et al.** (2012). Arabidopsis ECERIFERUM9 Involvement in Cuticle Formation and Maintenance of Plant Water Status. *Plant Physiology* 159, 930–944.
- Nagano, M., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M.** (2012). Plant sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases have unique characters unlike their animal and fungus counterparts. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1388–1392.
- Niggeweg, R., Michael, A.J., and Martin, C.** (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22, 746–754.
- Perroud, P.-F., Haas, F.B., Hiss, M., Ullrich, K.K., Alboresi, A., Amirebrahimi, M., Barry, K., Bassi, R., Bonhomme, S., Chen, H., et al.** (2018). The *Physcomitrella patens* gene atlas project: large-scale RNA-seq based expression data. *The Plant Journal* 95, 168–182.
- Prigge, M.J., and Bezanilla, M.** (2010). Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* 137, 3535–3543.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., and Moorman, A.F.** (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 339, 62–66.
- Reski, R., and Abel, W.O.** (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354–358.
- Renault, H., Alber, A., Horst, N.A., Basilio Lopes, A., Fich, E.A., Kriegshauser, L., Wiedemann, G., Ullmann, P., Herrgott, L., Erhardt, M., et al.** (2017). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature Communications* 8, 14713.

- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., et al.** (2008). The Physcomitrella Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* 319, 64–69.
- Riley, R.G., and Kolattukudy, P.E.** (1975). Evidence for Covalently Attached p-Coumaric Acid and Ferulic Acid in Cutins and Suberins. *Plant Physiology* 56, 650–654.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., and Moorman, A.F.M.** (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37, e45.
- Saleme, M. de L.S., Cesarino, I., Vargas, L., Kim, H., Vanholme, R., Goeminne, G., Van Acker, R., de Assis Fonseca, F.C., Pallidis, A., and Voorend, W.** (2017). Silencing CAFFEOYL SHIKIMATE ESTERASE affects lignification and improves saccharification. *Plant Physiology* 175, 1040-1057.
- Sander, M., and Petersen, M.** (2011). Distinct substrate specificities and unusual substrate flexibilities of two hydroxycinnamoyltransferases, rosmarinic acid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl-transferase, from *Coleus blumei* Benth. *Planta* 233, 1157–1171.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., and Werck-Reichhart, D.** (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* Is a 3'-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276, 36566–36574.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., and Métraux, J.-P.** (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* 5 :274.
- Sullivan, M.** (2009). A Novel Red Clover Hydroxycinnamoyl Transferase Has Enzymatic Activities Consistent with a Role in Phaselic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* 150, 1866–1879.
- Sullivan, M.L.** (2014). Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) leaves contain hydroxycinnamoyl-CoA:tartaric acid hydroxycinnamoyl transferase activity and accumulate hydroxycinnamoyl-tartaric acid esters. *Planta* 239, 1091–1100.
- Vanholme, R., Cesarino, I., Rataj, K., Xiao, Y., Sundin, L., Goeminne, G., Kim, H., Cross, J., Morreel, K., Araujo, P., et al.** (2013). Caffeoyl Shikimate Esterase (CSE) Is an Enzyme in the Lignin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Science* 341, 1103–1106.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* 3, 2–20.
- de Vries, J., de Vries, S., Slamovits, C.H., Rose, L.E., and Archibald, J.M.** (2017). How Embryophytic is the Biosynthesis of Phenylpropanoids and their Derivatives in Streptophyte Algae? *Plant and Cell Physiology* 58, 934–945.
- Wagner, A., Ralph, J., Akiyama, T., Flint, H., Phillips, L., Torr, K., Nanayakkara, B., and Te Kiri, L.** (2007). Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyltransferase in *Pinus radiata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 11856–11861.
- Wang, J.P., Naik, P.P., Chen, H.-C., Shi, R., Lin, C.-Y., Liu, J., Shuford, C.M., Li, Q., Sun, Y.-H., Tunlaya-Anukit, S., et al.** (2014). Complete Proteomic-Based Enzyme Reaction and Inhibition Kinetics Reveal How Monolignol Biosynthetic Enzyme Families Affect Metabolic Flux and Lignin in *Populus trichocarpa*. *The Plant Cell* 26, 894–914.

Wang, P.-P., Liu, H., Gao, S., and Cheng, A.-X. (2017). Functional Characterization of a Hydroxyacid/Alcohol Hydroxycinnamoyl Transferase Produced by the Liverwort *Marchantia emarginata*. *Molecules* *22*, 1854.

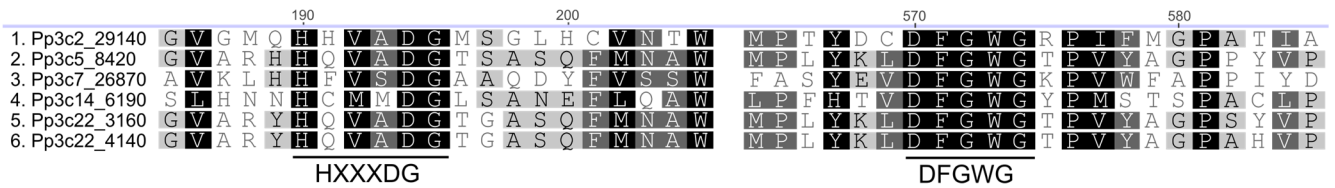
Weng, J.-K., and Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis: Tansley review. *New Phytologist* *187*, 273–285.

Wu, Y.-F., Zhao, Y., Liu, X.-Y., Gao, S., Cheng, A.-X., and Lou, H.-X. (2018). Isolation and functional characterization of hydroxycinnamoyltransferases from the liverworts *Plagiochasma appendiculatum* and *Marchantia paleacea*. *Plant Physiology and Biochemistry* *129*, 400-410.

Wyatt, H.D.M., Ashton, N.W., and Dahms, T.E.S. (2008). Cell wall architecture of *Physcomitrella patens* is revealed by atomic force microscopy. *Botany* *86*, 385–397.

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

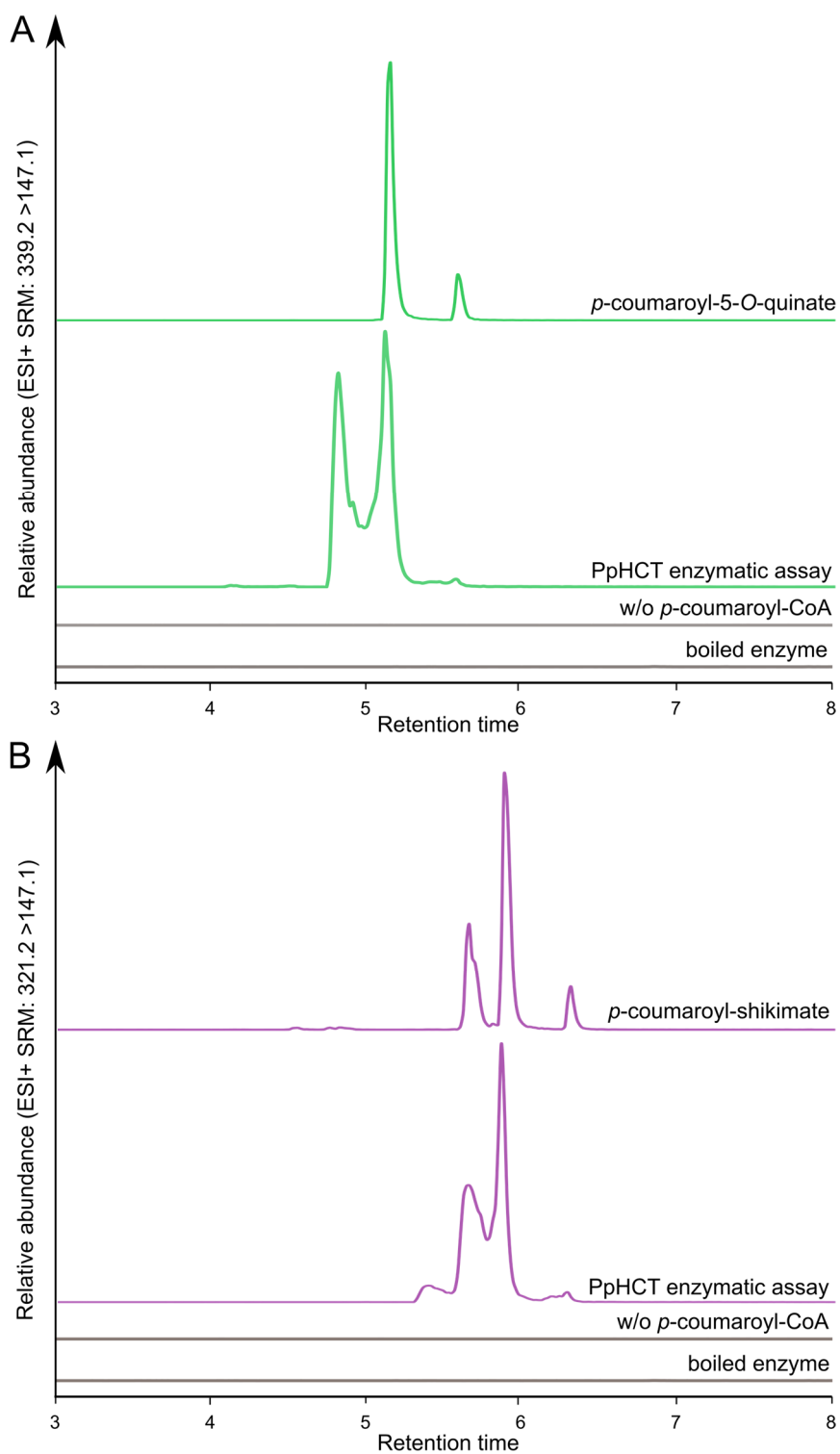
SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental Figure 1: Alignment of six protein sequences identified in *P. patens* proteome, sharing the two conserved signatures of the BAHD family: HXXXDG and DFGWG (D'Auria, 2006).

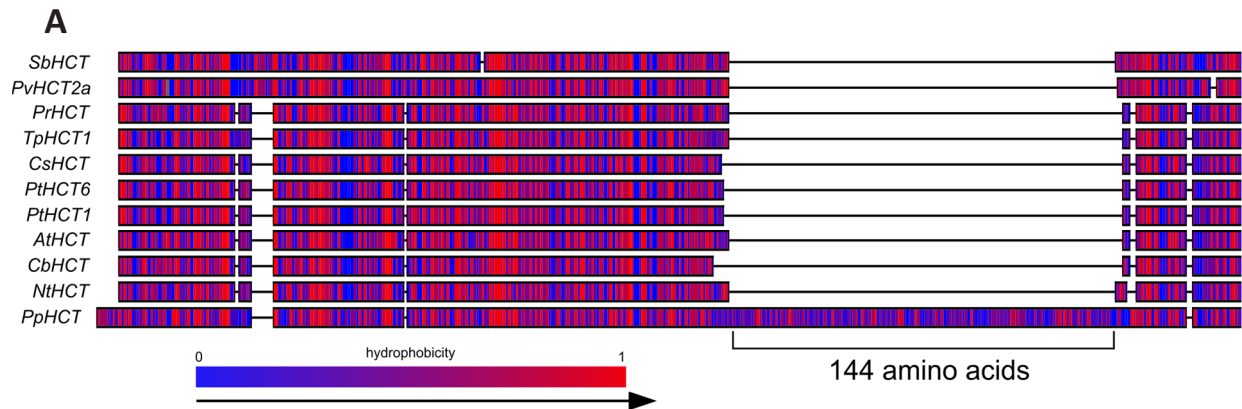
<input type="checkbox"/>	Views	ID	Define	Correlation
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c18_6360	(1 of 6) 6.2.1.12 - 4-coumarate-CoA ligase / 4-coumaryl-CoA synthetase	0.952
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c23_10340	(1 of 4) K04708 - 3-dehydrosphinganine reductase (E1.1.1.102)	0.909
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c24_10150	(1 of 1) PF13637//PF13920 - Ankyrin repeats (many copies) (Ank_4) // Zinc finger, C3HC4 type ...	0.893
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c13_16030	(1 of 9) PF03181 - BURP domain (BURP)	0.885
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c1_27530		0.871
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c22_19010	(1 of 1) K09754 - coumaroylquininate(coumaroylshikimate) 3'-monooxygenase (CYP98A3, C3'H)	0.866
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c12_21430	(1 of 4) PTHR31704:SF3 - PROTEIN MID1-COMPLEMENTING ACTIVITY 1-RELATED	0.86
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c11_2770	(1 of 6) 2.7.11.7 - [Myosin heavy-chain] kinase / Myosin II heavy-chain kinase	0.858
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c16_15310	(1 of 9) PF03181 - BURP domain (BURP)	0.857
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c2_19180	(1 of 7) PTHR21426:SF12 - EXOCYST COMPLEX COMPONENT 8	0.854
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Pp3c20_23750		0.852

Supplemental Figure 2: *In silico* gene co-expressed with *Pp3c2_29140* (*PpHCT*) according to gene-gene Pearson correlation factor displayed on Phytozome database (Goodstein et al, 2012). *PpHCT* is co-expressed with *4-coumarate-CoA-ligase* (*Pp3c18_6360*) and *CYP98* (*Pp3c22_19010*).



Supplemental Figure 3: *In vitro* enzymatic conversion of *p*-coumaroyl-CoA and quinate or shikimate into *p*-coumaroyl esters by PpHCT.

Assays with boiled enzyme or without *p*-coumaroyl-CoA were used as controls. Assays were incubated for 25 minutes at 30°C. **A:** Assay with *p*-coumaroyl-CoA and quinate analyzed by UPLC-MS/MS using SRM transition of *p*-coumaroyl-quinatate (ESI+ SRM: 339.2 > 147.1). **B:** Assay with coumaroyl-CoA and shikimate analyzed by UPLC-MS/MS using SRM transition of *p*-coumaroyl-shikimate (ESI+ SRM: 321.2 > 147.1).

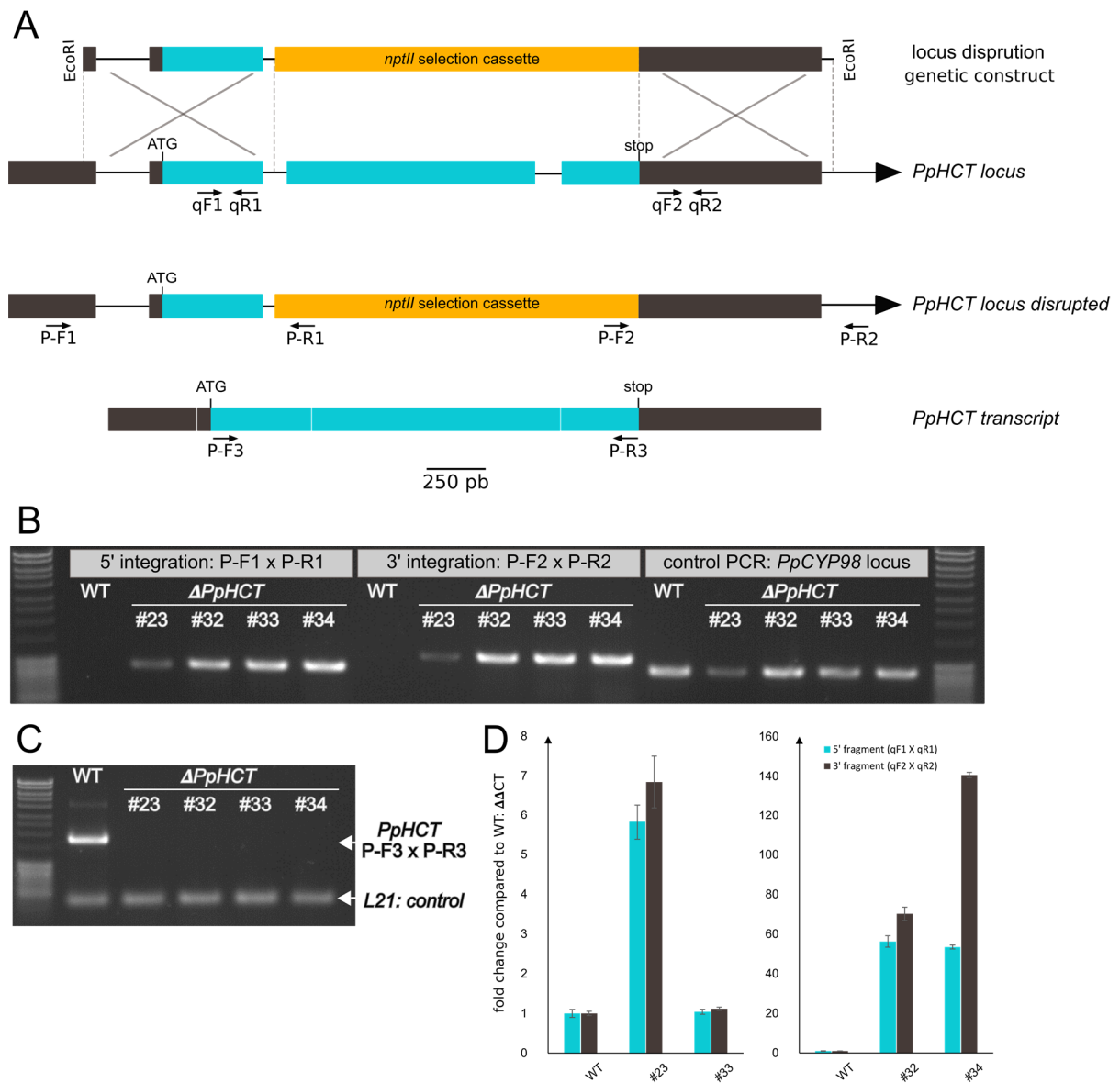


B

acyl-acceptor (5 mM)	protein	velocity (s^{-1})
Threonate	<i>PpHCT</i>	0.80 \pm 0.05
	truncated <i>PpHCT</i>	0.49 \pm 0.01
Quinate	<i>PpHCT</i>	1.43 \pm 0.26
	truncated <i>PpHCT</i>	1.49 \pm 0.05
Shikimate	<i>PpHCT</i>	1.24 \pm 0.49
	truncated <i>PpHCT</i>	1.15 \pm 0.04

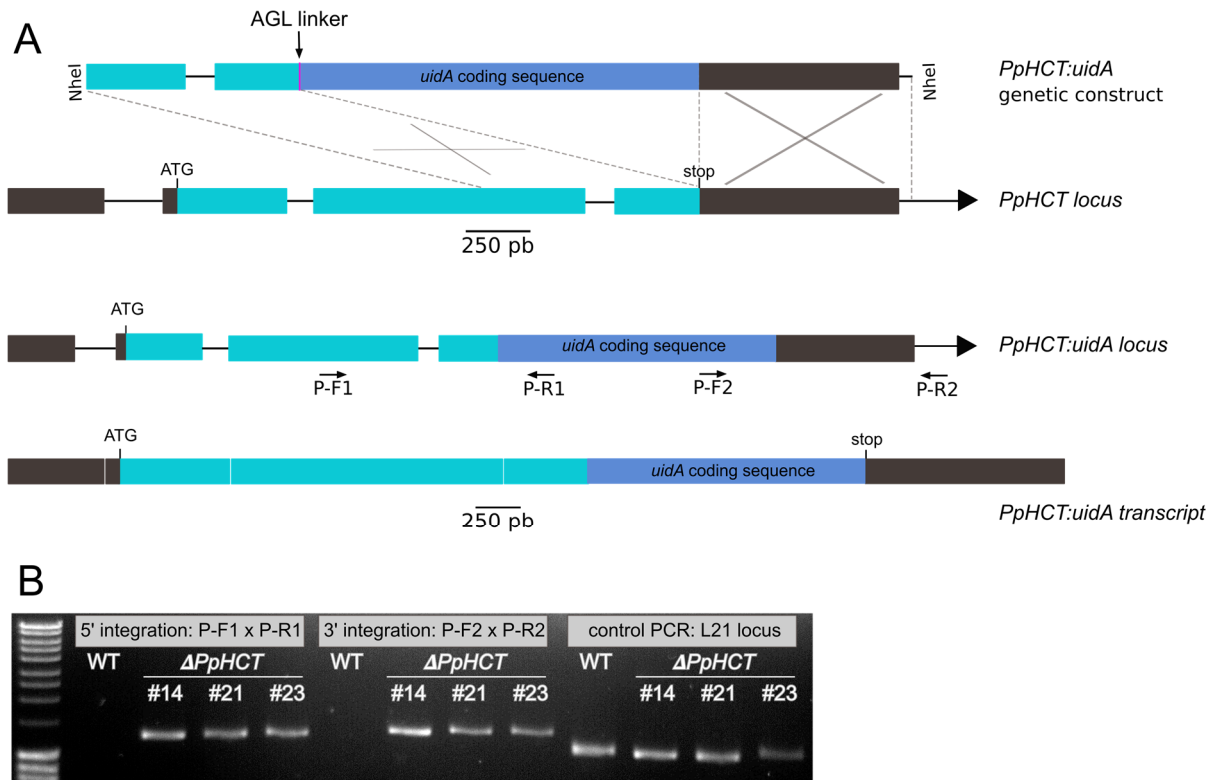
Supplemental Figure 4: Flexible loop joining the two main folded domains of the protein PpHCT.

A: Protein sequence alignment of PpHCT with ten proteins of vascular plants. **B:** *In vitro* activity of recombinant truncated PpHCT (deleted of the loop) compared to recombinant native PpHCT.



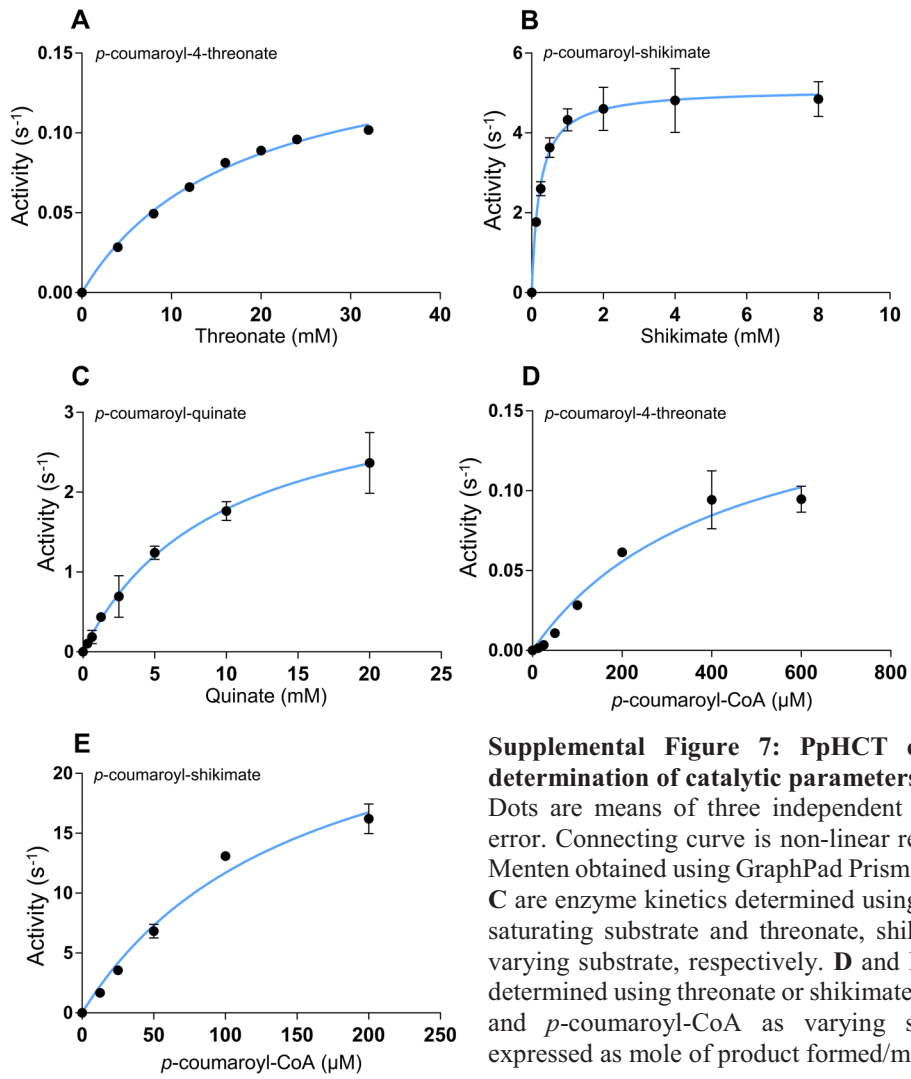
Supplemental Figure 5: Molecular characterization of $\Delta PpHCT$ lines.

A: Genetic construct for disruption of the *PpHCT* locus and locus structure resulting from homologous recombination. The disrupted $\Delta PpHCT$ locus has integrated the NPTII transgene. **B:** Screening for 5' and 3' integrations of the NPTII transgene in *PpHCT* locus and positive control of PCR (*CYP98*: Pp1s366_10V6 locus). **C:** PCR detection of *PpHCT* transcripts. **D:** Determination of the number of transgene integrations in the *P. patens* genome by quantitative PCR. The single copy *PpCLF* (Pp3c22_22940V3) gene is used for the normalization of the CT. The #33 $\Delta PpHCT$ line integrated the transgene in single copy. Primers (qF1, qR1, qF2, qR2, P-F1 to P-F3 and P-R1 to P-R3 and controls) are listed in **Supplemental Table 2**.



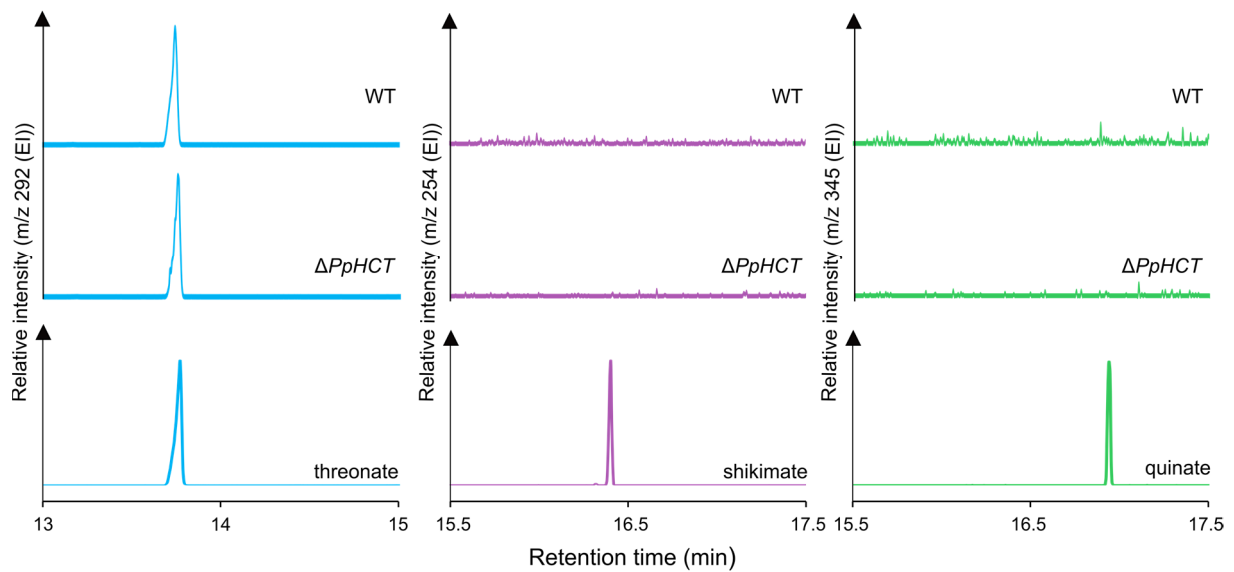
Supplemental Figure 6: Molecular characterization of $\Delta PpHCT: uidA$ lines.

A: Design of genetic construct for *PpHCT: uidA* gene insertion framing *PpHCT* STOP codon. The resulting *PpHCT* locus has integrated *uidA* coding sequence within reading frame. **B:** Screening for 5' and 3' integrations of *uidA* coding sequence in the *PpHCT* locus. Primers (P-F1, P-F2, P-R1, P-R2 and control) are listed in **Supplemental Table 2**.



Supplemental Figure 7: PpHCT enzyme kinetics for determination of catalytic parameters.

Dots are means of three independent replicates \pm standard error. Connecting curve is non-linear regression of Michaelis Menten obtained using GraphPad Prism version 7.00. **A**, **B** and **C** are enzyme kinetics determined using *p*-coumaroyl-CoA as saturating substrate and threonate, shikimate and quinate as varying substrate, respectively. **D** and **E** are enzyme kinetics determined using threonate or shikimate as saturating substrate and *p*-coumaroyl-CoA as varying substrate. Activity is expressed as mole of product formed/mole of enzyme/s.



Supplemental Figure 8: Extracted ion chromatogram from GC-MS analysis of WT and $\Delta PpHCT$ extracts.

SUPPLEMENTAL TABLES

Preferred acceptor	Name in tree	Organism	Accession number	References
Shikimate	AtHCT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_199704.1	Hoffmann et al., 2004
	CbHCT	<i>Coleus blumei</i>	CBI83579.1	Sander and Petersen, 2011
	CsHCT	<i>Cucumis sativus</i>	NP_001295843.1	Varbanova et al., 2011
	NtHCT	<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_009615699.1	Hoffmann et al., 2003
	Pp3c2_29140 = PpHCT	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp3c2_29140	This work
	PrHCT	<i>Pinus radiata</i>	ABO52899.1	Wagner et al., 2007
	PtHCT1	<i>Populus tremuloides</i>	ACC63882.1	Shi et al., 2010; Wang et al., 2014
	PtHCT6	<i>Populus tremuloides</i>	XP_006368492.1	Shi et al., 2010; Wang et al., 2014
	PvHCT2a	<i>Panicum virgatum</i>	AGM90558.1	Shen et al., 2013; Escamilla-Treviño et al., 2014
	PvHCT1a	<i>Panicum virgatum</i>	AFY17066.1	Shen et al., 2013; Escamilla-Treviño et al., 2014
	PvHCT_like_1	<i>Panicum virgatum</i>	JX845714	Shen et al., 2013; Escamilla-Treviño et al., 2014
	SbHCT	<i>Sorghum bicolor</i>	EES05411.1	Walker et al., 2013
	TpHCT1	<i>Trifolium patens</i>	ACI16630.1	Sullivan, 2009
Aliphatics	AtHHT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_851111.1	Gou et al., 2009; Molina et al. 2009
	AtHHT2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAQ62868.1	Rautengarten et al., 2012
	AtHHT3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_201161.1	Kosma et al., 2012
	PtFHT1	<i>Populus tremuloides</i>	XP_002298644.2	Cheng et al., 2013
	StFHT	<i>Solanum tuberosum</i>	NP_001275190.1	Serra et al., 2010
Quinate	CcaHQT	<i>Cynara cardunculus</i>	ABK79690.1	Comino et al., 2009
	CcHQT	<i>Coffea canephora</i>	ABO77956.1	Lallemand et al., 2012
	CsHQT1	<i>Cynara cardunculus</i>	ACF37072.1	Sonnante et al., 2010
	CsHQT2	<i>Cynara cardunculus</i>	ACJ23164.1	Sonnante et al., 2010
	LjHQT	<i>Lonicera japonica</i>	ACZ52698.1	Peng et al., 2010
	NtHQT	<i>Nicotiana tabacum</i>	CAE46932.1	Hoffman et al. 2003; Niggeweg et al., 2004
	SIHQT	<i>Solanum lycopersicum</i>	NP_001234850.1	Niggeweg et al., 2004
	StHQT	<i>Solanum tuberosum</i>	ABA46756.1	Payyavula et al., 2015
Putrescine	AT1	<i>Nicotiana attenuata</i>	AET80688.1	Onkokesung et al., 2012
Spermidine	AtSHT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179497.1	Grienenberger et al., 2009
Agmatine	HvACT	<i>Hordeum vulgare</i>	AAO73071.1	Burhenne et al., 2003
Shikimate / Glycerol	OsHCT4	<i>Oryza sativa</i>	NP_001057003.1	Kim et al., 2012
Aromatic alcohols	PtSABT	<i>Populus tremuloides</i>	XP_002319767.1	Chedgy et al., 2015
Malate	TpHCT2	<i>Trifolium patens</i>	ACI16631.1	Sullivan, 2009
4-hydroxyphenyllactate	CbRAS	<i>Coleus blumei</i>	A0PDV5.1	Berger et al., 2006; Sander and Petersen, 2011
	LaAAT1	<i>Lavandula angustifolia</i>	ABI48360.1	Landmann et al., 2011
	MoRAS	<i>Melissa officinalis</i>	G0LD36.1	Weitzel and Petersen, 2011
Unknown	Pp3c5_8420	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp3c5_8420	
	Pp3c7_26870		Pp3c7_26870	
	Pp3c14_6190		Pp3c14_6190	
	Pp3c22_3160		Pp3c22_3160	
	Pp3c22_4140		Pp3c22_4140	

Supplemental Table 1: Functionally characterized hydroxycinnamoyl-CoA-dependent BAHD transferases and the six *P. patens* protein candidates, including PpHCT, used in the cladogram of Figure 2. Adapted from Eudes et al, 2016.

A

#primer	name	sequence	target
1	5'HR_HCT_fwd	aatac gactcactatagggcgaattc CTTGTCTCATCCGCCAA	5' integration HR fragment
2	5'HR_HCT_rev	gctatagctgCAAAGTAGCACACGGACG	
3	NPTII_fwd (KOHCT)	tgctactttgCAGCTATGACCATTGACGC	NPTII coding sequence in vector
4	NPTII_rev (KOHCT)	gatgaagactTTGGGTAACGCCAGGTT	
5	3'HR_HCT_fwd	cgttacc caaAGTCTTCATCTTTACACTG AACTG	3' integration HR fragment
6	3'HR_HCT_rev	tatttagtgactatag gaattc TGCTCTTCCAAGTTGCATG	

B

#primer	name	sequence	target
316	5'HR_HCT_GUS_fwd	actcactatagggc gctagc GGACCTGCCCATGGCTGT	5' integration HR fragment
317	5'HR_HCT_GUS_rev	ttaagc ctgc GAAGGATGCCACTAGTTGGCAAATG	
318	GUS_fwd (HCT)	ggcatccttcGCAGGCTTAATGTTACCTC	<i>uida</i> coding sequence in vector
319	GUS_rev (HCT)	gatgaagactTCATTGTTTGCCTCCCTG	
320	3'HR_HCT_GUS_fwd	caaacaatga AGTCTTCATCTTTACACTG	3' integration HR fragment
321	3'HR_HCT_GUS_rev	ggtgactatag gctagc GTACTCCTCATAAAGAATCTC	

C

#primer	name	sequence	target
323	P-F1	CCGTTCAAGTCCACCATCACC	5' integration KO-HCT
227	P-R1	TGTCGTGCTCCACCATGTTG	
228	P-F2	AAATCCAGTGACCTGCAGGC	3' integration KO-HCT
324	P-R2	GAGCTCGCTAAAGGGTACCATAA	
229	CYP98_fwd	GGCAGTCATGTGGGAGAACA	<i>CYP98</i> locus (CT)
230	CYP98_rev	ATGGCCCATTCCACCGAAAT	

#primer	name	sequence	target
273	P-F3	ATGGCCGCCGCAAGTCAAGTTC	<i>PpHCT1</i> transcript
274	P-R3	TTAGAAGGATGCCACTAGTTTGG	
295	L21 transcript_fwd	GGTTGGTCATGGGTTGCG	<i>L21</i> transcript (CT)
296	L21 transcript_rev	GAGGTCAACTGTCTCGCC	

#primer	name	sequence	target
220	q-F1	TTCTTGTCGAAGCTGAAGCA	number of 5' HR fragment integration
221	q-R1	CAAAGTAGCACACGGACGAA	
297	q-F2	CAGCGCACGTATGAATCACA	number of 3' HR fragment integration
298	q-R2	CCAATGCGGCTTACAGGATC	
523	PpCLF_5915_qf	AGCAATGTCCGTGCCACTT	reference gene #1
524	PpCLF_5981_qr	TTGTAAGAATCACTCACCCACAG	
525	PpCLF_7739_qf	GTATTGGCGATCCCCTCTT	reference gene #2
526	PpCLF_7804_qr	GCATAAAATAGGTCACAGATTGAGG	

D

#primer	name	sequence	target
396	P-F1	GCAATGGTAACGGAGACTTCA	5' integration <i>uida</i>
397	P-R1	TAACATACGGCGTGACATCG	
219	P-F2	GAAGCTCAGAGAATGCGATGG	3' integration <i>uida</i>
376	P-R2	CCGATCACCTGCGTCAAT	
295	L21_fwd	GGTTGGTCATGGGTTGCG	<i>L21</i> locus (CT)
296	L21_rev	GAGGTCAACTGTCTCGCC	

E

#primer	name	sequence	target
HR-849	Pp3c19_1800_qF1	ATGCTTGCATTGCAGTGCTG	reference gene #1
HR-850	Pp3c19_1800_qR1	TTCAATGCGCGTGATAACCC	
HR-855	Pp3c27_3270_qF1	AATTACGGTGCGCTTGATCC	reference gene #2
HR-856	Pp3c27_3270_qR1	AAGCGCTTGATCAACGCATC	
285	Pp3c2_29140_F	ACCACATGGACACATTTGCC	<i>PpHCT1</i>
286	Pp3c2_29140_R	ATTCATACGTGCGCTGCAAC	
340	Pp3c18_6360_F	CACCGGATTGCCGAAAGGTG	<i>4-CoA-ligase</i>
341	Pp3c18_6360_R	ACCAACTCTCAACCCGCACA	
HR-577	Pp1s366_10V6_qF1	ATATGATCACGGCAGGCATG	<i>PpCY98</i>
HR-578	Pp1s366_10V6_qR1	TGAACATCCGGATTGCGAAC	

Supplemental Table 2: List of primers used in this study.

A: Primers used for amplification the *PpHCT* disruption construct; **Green:** overlapping sequences, **blue:** specific of target sequence, **orange:** *EcoRI* restriction site. **B:** Primers used for amplification of the *PpHCT: uida* construct. **Green:** overlapping sequences, **blue:** specific of target sequence, **orange:** *NheI* restriction site. **C:** Primers used for molecular characterization of *APpHCT* in **Supplemental Figure 5**. **D:** Primers used for molecular characterization of *PpHCT:uida* in **Supplemental Figure 6**. **E:** Primers used for qRT-PCR analysis.

	MW	Ionization mode	Cone voltage	Collision energy	MRM transition
<i>p</i> -coumaric acid	164.16	ESI+	22	10	165.2 > 147.1
Caffeic acid	180.16	ESI+	20	12	181.2 > 163.1
Ferulic acid	194.18	ESI+	20	8	195.3 > 177.2
<i>p</i> -coumaroyl-threonate	282.07	ESI+	14	14	283.2 > 147.1
Caffeoyl-threonate	298.07	ESI+	14	14	299.2 > 163.1
Caffeoyl-quinic acid	354.31	ESI+	17	16	355.2 > 163.1
Caffeoyl-shikimate	336.08	ESI+	17	16	337.2 > 163.1
Morin	302.4	ESI+	36	26	303.4 > 153

Supplemental Table 3: Multiple Reaction Monitoring detection of standards used in this study.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Berger, A., Meinhard, J., and Petersen, M.** (2006). Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta* 224, 1503–1510.
- Burhenne, K., Kristensen, B.K., and Rasmussen, S.K.** (2003). A New Class of N-Hydroxycinnamoyltransferases: PURIFICATION, CLONING, AND EXPRESSION OF A BARLEY AGMATINE COUMAROYLTRANSFERASE (EC 2.3.1.64). *Journal of Biological Chemistry* 278, 13919–13927.
- Chedgy, R.J., Köllner, T.G., and Constabel, C.P.** (2015). Functional characterization of two acyltransferases from *Populus trichocarpa* capable of synthesizing benzyl benzoate and salicyl benzoate, potential intermediates in salicinoid phenolic glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 113, 149–159.
- Cheng, A.-X., Gou, J.-Y., Yu, X.-H., Yang, H., Fang, X., Chen, X.-Y., and Liu, C.-J.** (2013). Characterization and Ectopic Expression of a *Populus* Hydroxyacid Hydroxycinnamoyltransferase. *Molecular Plant* 6, 1889–1903.
- Comino, C., Hehn, A., Moglia, A., Menin, B., Bourgaud, F., Lanteri, S., and Portis, E.** (2009). The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. *BMC Plant Biology* 9, 30.
- Escamilla-Treviño, L.L., Shen, H., Hernandez, T., Yin, Y., Xu, Y., and Dixon, R.A.** (2014). Early lignin pathway enzymes and routes to chlorogenic acid in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Molecular Biology* 84, 565–576.
- Gou, J.-Y., Yu, X.-H., and Liu, C.-J.** (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 18855–18860.
- Grienenberger, E., Besseau, S., Geoffroy, P., Debayle, D., Heintz, D., Lapierre, C., Pollet, B., Heitz, T., and Legrand, M.** (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *The Plant Journal* 58, 246–259.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.** (2003). Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 278, 95–103.
- Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M.** (2004). Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. *The Plant Cell Online* 16, 1446–1465.
- Kim, I.A., Kim, B.-G., Kim, M., and Ahn, J.-H.** (2012). Characterization of hydroxycinnamoyltransferase from rice and its application for biological synthesis of hydroxycinnamoyl glycerols. *Phytochemistry* 76, 25–31.
- Kosma, D.K., Molina, I., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2012). Identification of an *Arabidopsis* Fatty Alcohol:Caffeoyl-Coenzyme A Acyltransferase Required for the Synthesis of Alkyl Hydroxycinnamates in Root Waxes. *Plant Physiology* 160, 237–248.

- Lallemand, L.A., Zubieta, C., Lee, S.G., Wang, Y., Acajjaoui, S., Timmins, J., McSweeney, S., Jez, J.M., McCarthy, J.G., and McCarthy, A.A.** (2012). A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee. *PLANT PHYSIOLOGY* 160, 249–260.
- Landmann, C., Hücherig, S., Fink, B., Hoffmann, T., Dittlein, D., Coiner, H.A., and Schwab, W.** (2011). Substrate promiscuity of a rosmarinic acid synthase from lavender (*Lavandula angustifolia* L.). *Planta* 234, 305–320.
- Molina, I., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2009). Identification of an Arabidopsis Feruloyl-Coenzyme A Transferase Required for Suberin Synthesis. *Plant Physiology* 151, 1317–1328.
- Niggeweg, R., Michael, A.J., and Martin, C.** (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22, 746–754.
- Onkokesung, N., Gaquerel, E., Kotkar, H., Kaur, H., Baldwin, I.T., and Galis, I.** (2012). MYB8 Controls Inducible Phenolamide Levels by Activating Three Novel Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:Polyamine Transferases in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* 158, 389–407.
- Payyavula, R.S., Shakya, R., Sengoda, V.G., Munyaneza, J.E., Swamy, P., and Navarre, D.A.** (2015). Synthesis and regulation of chlorogenic acid in potato: Rerouting phenylpropanoid flux in *HQT*-silenced lines. *Plant Biotechnology Journal* 13, 551–564.
- Peng, X., Li, W., Wang, W., and Bai, G.** (2010). Cloning and Characterization of a cDNA Coding a Hydroxycinnamoyl-CoA Quinate Hydroxycinnamoyl Transferase Involved in Chlorogenic Acid Biosynthesis in *Lonicera japonica*. *Planta Medica* 76, 1921–1926.
- Rautengarten, C., Ebert, B., Ouellet, M., Nafisi, M., Baidoo, E.E.K., Benke, P., Stranne, M., Mukhopadhyay, A., Keasling, J.D., Sakuragi, Y., et al.** (2012). Arabidopsis Deficient in Cutin Ferulate Encodes a Transferase Required for Feruloylation of -Hydroxy Fatty Acids in Cutin Polyester. *Plant Physiology* 158, 654–665.
- Sander, M., and Petersen, M.** (2011). Distinct substrate specificities and unusual substrate flexibilities of two hydroxycinnamoyltransferases, rosmarinic acid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl-transferase, from *Coleus blumei* Benth. *Planta* 233, 1157–1171.
- Serra, O., Hohn, C., Franke, R., Prat, S., Molinas, M., and Figueras, M.** (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm: FHT function in potato periderm. *The Plant Journal* 62, 277–290.
- Shen, H., Poovaiah, C.R., Ziebell, A., Tschaplinski, T.J., Pattathil, S., Gjersing, E., Engle, N.L., Katahira, R., Pu, Y., Sykes, R., et al.** (2013). Enhanced characteristics of genetically modified switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for high biofuel production. *Biotechnology for Biofuels* 6, 71.
- Shi, R., Sun, Y.-H., Li, Q., Heber, S., Sederoff, R., and Chiang, V.L.** (2010). Towards a Systems Approach for Lignin Biosynthesis in *Populus trichocarpa*: Transcript Abundance and Specificity of the Monolignol Biosynthetic Genes. *Plant and Cell Physiology* 51, 144–163.
- Sonnante, G., D'Amore, R., Blanco, E., Pierri, C.L., De Palma, M., Luo, J., Tucci, M., and Martin, C.** (2010). Novel Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase Genes from

Artichoke Are Involved in the Synthesis of Chlorogenic Acid. *Plant Physiology* 153, 1224–1238.

Sullivan, M. (2009). A Novel Red Clover Hydroxycinnamoyl Transferase Has Enzymatic Activities Consistent with a Role in Phaelic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* 150, 1866–1879.

Varbanova, M., Porter, K., Lu, F., Ralph, J., Hammerschmidt, R., Jones, A.D., and Day, B. (2011). Molecular and Biochemical Basis for Stress-Induced Accumulation of Free and Bound p-Coumaraldehyde in Cucumber. *Plant Physiology* 157, 1056–1066.

Wagner, A., Ralph, J., Akiyama, T., Flint, H., Phillips, L., Torr, K., Nanayakkara, B., and Te Kiri, L. (2007). Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyltransferase in *Pinus radiata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 11856–11861.

Walker, A.M., Hayes, R.P., Youn, B., Vermerris, W., Sattler, S.E., and Kang, C. (2013). Elucidation of the Structure and Reaction Mechanism of Sorghum Hydroxycinnamoyltransferase and Its Structural Relationship to Other Coenzyme A-Dependent Transferases and Synthases. *Plant Physiology* 162, 640–651.

Wang, J.P., Naik, P.P., Chen, H.-C., Shi, R., Lin, C.-Y., Liu, J., Shuford, C.M., Li, Q., Sun, Y.-H., Tunlaya-Anukit, S., et al. (2014). Complete Proteomic-Based Enzyme Reaction and Inhibition Kinetics Reveal How Monolignol Biosynthetic Enzyme Families Affect Metabolic Flux and Lignin in *Populus trichocarpa*. *The Plant Cell* 26, 894–914.

Weitzel, C., and Petersen, M. (2011). Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry* 72, 572–578.

Chapitre 2:

Emergence of a new BAHD clade in land plants bridging aliphatic and phenolic precursors of cuticle

Lucie Kriegshauser¹, Laurence Herrgott¹, Julie Zumsteg¹, Mathieu Erhardt¹, Desirée Gütle², Ralf Reski^{2,3}, Danièle Werck-Reichhart¹ and Hugues Renault¹

¹Institute of Plant Molecular Biology | CNRS, University of Strasbourg, France

²Plant Biotechnology, Faculty of Biology, University of Freiburg, Germany

³BIOSS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg, Germany

INTRODUCTION

Les polymères pariétaux

La cutine et la subérine sont des polymères extracellulaires qui servent de matrice à la constitution de barrières protectrices permettant l'adaptation à de nombreux stress environnementaux tels que la sécheresse, l'attaque de pathogènes ou les irradiations UV (Isaacson et al, 2009). Une des plus grandes innovations apparues au cours de l'évolution des premières plantes terrestres fut la mise en place d'une barrière protectrice externe au niveau des organes aériens afin de limiter les pertes d'eau : la cuticule (Fich et al, 2016). Elle recouvre les cellules épidermiques des organes aériens de toutes les plantes terrestres herbacées, sauf celles de la tige des plantes ligneuses (Gymnospermes et certaines Angiospermes dicotylédones) dont l'épiderme est remplacé par un périderme enrichi en subérine. Aucune étude n'a pu montrer la présence de cuticule chez les algues, sauf chez certaines comme *Klebsormidium nitens* ou *Chlamydomonas reinhardtii* dont les parois cellulaires sont recouvertes de structures ressemblant à de la cuticule (Kondo et al, 2016 ; Cook and Graham, 1998). Le rhizoderme est quant à lui dépourvu de cuticule mais est recouvert de subérine. Dans le cas des Gymnospermes et de certaines Angiospermes dicotylédones à croissance secondaire, le rhizoderme est également remplacé par un périderme enrichi en subérine. Le périderme correspond au phellogène, un méristème secondaire, qui produit le phelloderme, un tissu vivant (assimilateur ou de réserve) vers l'intérieur de l'organe, et le suber (liège) composé de cellules à parois secondaires subérisées, vers l'extérieur. La croissance en épaisseur de l'organe entraîne un délitement du tissu de revêtement (épiderme ou rhizoderme), laissant ainsi le périderme en contact avec l'extérieur comme on peut l'observer chez *A. thaliana* (Wunderling et al, 2018).

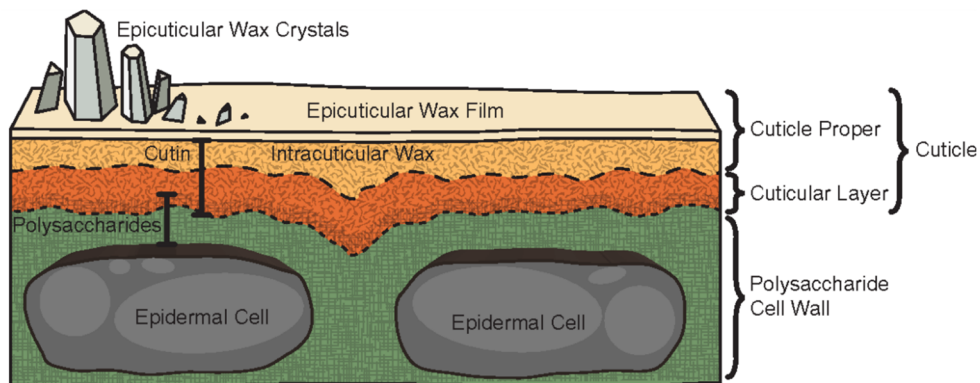


Figure 1 : Structure de la cuticule chez les trachéophytes.

Représentation schématique de la structure de la cuticule qui recouvre les cellules épidermiques (Yeats and Rose, 2013). La cuticule comprend : le polyester de cutine formé majoritairement d'acides gras, et les cires cuticulaires, des composés hydrophobes non polymérisés incluses dans la cutine (cires intracuticulaires) et au-dessus sous forme d'un film épicuticulaire et/ou de cristaux. La « couche cuticulaire » est un mélange de polysaccharides pariétaux et de composés hydrophobes de la cutine. La « cuticule proprement dite » désigne la portion la plus externe de la cutine et les cires.

La cuticule est composée de cutine (1), un polyester majoritairement composé d'acides gras, et de cires (2), des composés hydrophobes intégrés dans la cutine et qui peuvent aussi se trouver à sa surface sous forme d'un film épicuticulaire ou de cristaux (**Figure 1** ; Yeats et Rose, 2013 ; Fich et al, 2016). L'interface entre la paroi cellulaire des cellules épidermiques et la cuticule se nomme la couche cuticulaire (« cuticular layer ») et correspond à des polysaccharides pariétaux liés à des composés lipidiques de la cuticule (Jeffrey, 2006). Au-dessus se trouve la cuticule proprement dite (« cuticle proper »), une couche totalement hydrophobe dépourvue de polysaccharides pariétaux, et qui confère l'imperméabilité aux organes aériens.

Les feuilles d'*A. thaliana* et les phyllides de *P. patens* présentent des cristaux de cires épicuticulaires sur la surface de leurs cellules (**Figure 2A**). Sous forme de plaques chez *P. patens*, ces cristaux sont distribués de manière irrégulière au sein de différentes phyllides (Buda et al, 2013). L'observation au microscope électronique de coupes de feuilles ou de phyllides (**Figure 2B**) met en évidence une organisation cuticulaire similaire entre *A. thaliana* et *P. patens*. Dans les deux cas, la paroi cellulaire est recouverte d'une couche cuticulaire (CL), surmontée de la cuticule à proprement dite (CP) (Yeats et Rose, 2013 ; Buda et al, 2013). Les ramifications de polysaccharides pariétaux au niveau de la couche cuticulaire sont bien visibles dans la capsule du sporophyte de *P. patens* (**Figures 2B, 3 et 4**).

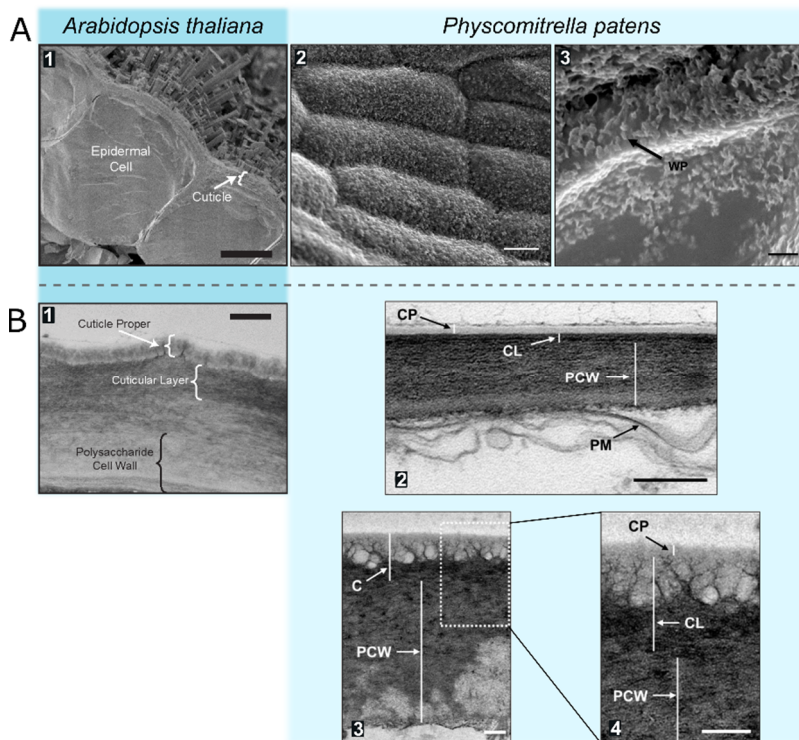


Figure 2 : Analyse microscopique de la cuticule en coupe transversale.

A: Cires épicuticulaires observées au microscope électronique à balayage; **A.1:** cristaux de cires épicuticulaires chez *A. thaliana*, échelle 5µm (Yeats and Rose, 2013); **A.2-3:** plaquettes de cires chez *P. patens*, échelle 10 et 2µm (Buda et al, 2013); **B:** observation de la cuticule au microscope électronique à transmission, **B.1:** coupe transversale de tige d'*A. thaliana*, échelle 500 nm (Yeats and Rose, 2013); **B.2:** coupe transversale de phyllide de *P. patens*; **B.3-4:** cuticule de la capsule de sporophyte de *P. patens* où la couche cuticulaire est bien visible. **B.2-4:** échelle 200 nm, CP: « cuticule proprement dite », CL: « couche cuticulaire », PCW: paroi cellulaire, PM: membrane plasmique 80 (Buda et al, 2013).

Rôle de la cuticule

Imperméabiliser les organes et limiter les pertes d'eau

La cuticule confère une imperméabilité aux tissus aériens, limitant ainsi les pertes en eau (Fich et al, 2016). Les cires épicuticulaires sont majoritairement impliquées dans cette fonction. En effet, les cuticules dont on a extrait les cires épicuticulaires présentent une perméabilité en moyenne 100 à 1000 plus importante que les cuticules intactes (Schreiber, 2010). Cette observation a été confirmée chez le mutant de tomate *lecer6*, dont la synthèse des cires est affectée et dont le fruit présente une plus grande perméabilité par rapport au sauvage (Leide et al, 2007). La perméabilité s'évalue par la quantité d'eau perdue par unité de surface et unité de temps. Elle est généralement exprimée par la perméance, P en mètres. s^{-1} , qui représente la vitesse de diffusion d'eau à travers la cuticule.

Empêcher la fusion d'organes au cours du développement

Au niveau des méristèmes et dans les bourgeons végétatifs ou floraux, les jeunes organes sont en étroit contact les uns avec les autres. La cuticule, déposée *de novo* lors du développement, les empêche de fusionner et leur permet de rester individuellement séparés, comme illustré dans le schéma de la **Figure 3** (Ingram et Nawrath, 2017).

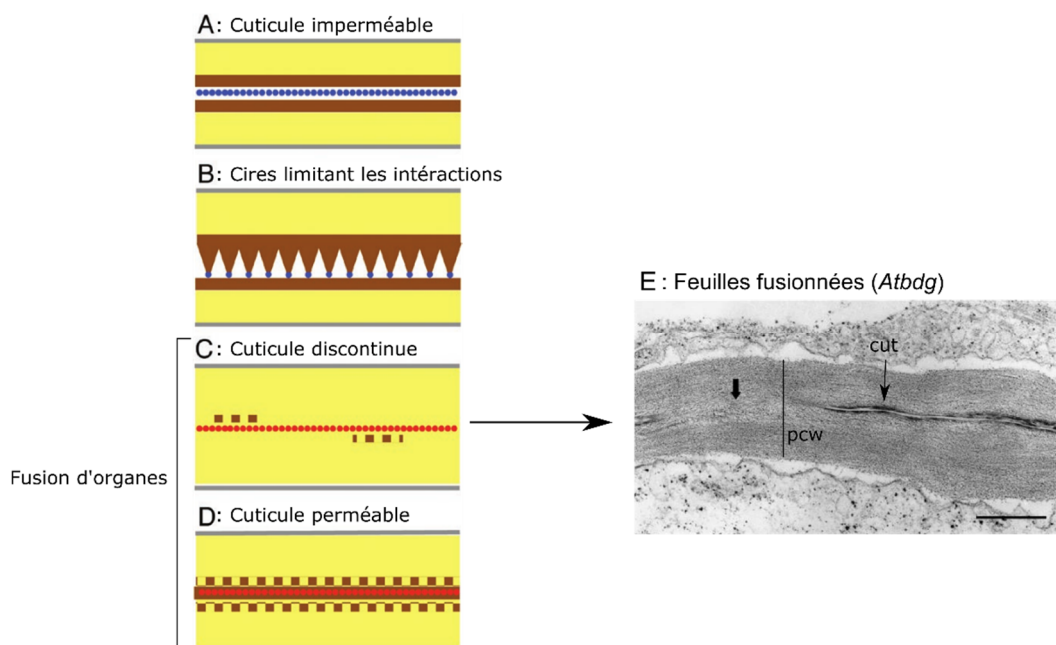


Figure 3 : Interactions entre les cellules épidermiques de deux organes en contact.

A-D : Représentations schématiques (Ingram et Nawrath, 2017) : membrane plasmique (gris), paroi cellulaire (jaune), cuticule (brun), point de contact entre deux organes (cercles bleus), points de fusion d'organes (cercles rouges). Lorsqu'il y a un défaut de cuticule (**C**), ou que la cuticule est perméable (**D**), on observe une fusion d'organe. **E** : Exemple d'une fusion d'organes (indiquée par la flèche) au niveau des feuilles d'un mutant affecté dans la biosynthèse de cuticule chez *A. thaliana* (*Atbdg*, Kurdyokov et al, 2006).

Les cires épicuticulaires permettent également de limiter les interactions. En revanche, une cuticule perméable ou des zones apoplastiques dépourvues de cuticule entraînent une fusion des deux organes par l'intermédiaire de leur paroi cellulaire (**Figure 3C et D**) (Ingram et Nawrath, 2017). Une fusion d'organes a été observée au niveau des feuilles chez *Atbdg* (**Figure 3E**), et au niveau des feuilles et du bourgeon floral chez *Atlcr*, deux mutants présentant un défaut de cuticule (Kurdyukov et al, 2006, Wellesen et al, 2001). L'altération de la cuticule par l'expression ectopique de cutinases chez *A. thaliana* entraîne également des fusions d'organes (Sieber et al, 2000 ; Takahashi et al, 2010).

Chez *P. patens*, la mutation des gènes *PpHCT1* ou *PpCYP98* impliqués dans la biosynthèse des précurseurs phénoliques de la cuticule entraîne une fusion d'organes au niveau des gamétophores, corrélée à une altération sévère de la structure de la cuticule ainsi que de sa composition en monomères d'acides gras (**Figure 4**, Chapitre I *PpHCT*, Renault et al, 2017).

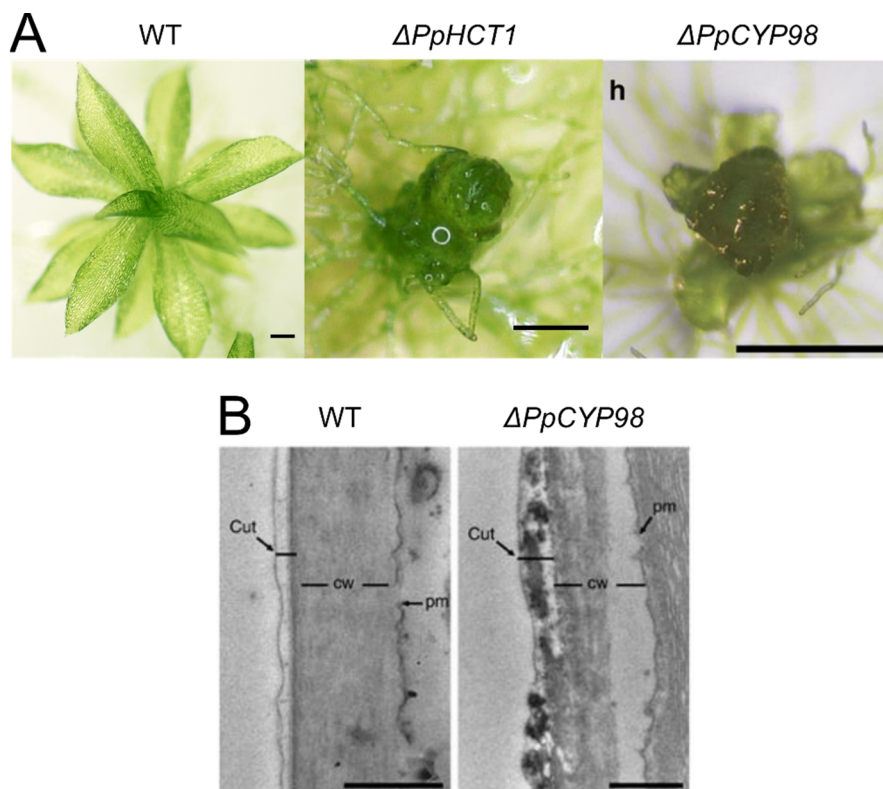


Figure 4 : Altération de la structure de la cuticule chez les mutants *hct* et *cyp98* chez *P. patens*.

A : Phénotype de gamétophores mutants présentant un phénotype de fusion d'organes dû à une altération de la cuticule. WT et $\Delta PpHCT1$, échelle 200 nm (Chapitre 1), $\Delta PpCYP98$, échelle 500 nm (Renault et al, 2017) **B** : observation de la cuticule de phyllides de *P. patens* WT et $\Delta PpCYP98$ en coupe transversale, au microscope électronique à transmission, échelle 0,5 μ m, Cut : cuticule, cw : paroi cellulaire, pm : membrane plasmique (Renault et al, 2017). Les corps denses aux électrons visibles sur les coupes de $\Delta PpCYP98$ pourraient correspondre à des monomères d'acides gras non polymérisés de la cuticule.

Trachéophytes

P. patens

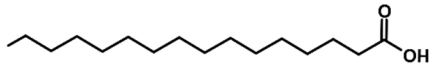
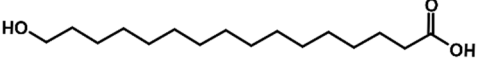
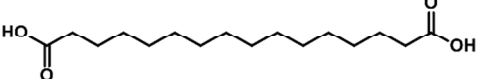
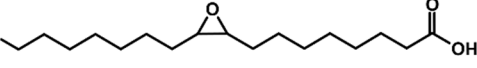
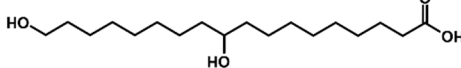
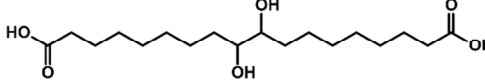
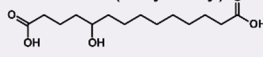
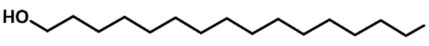
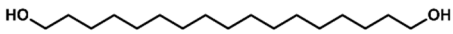
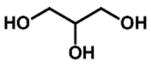
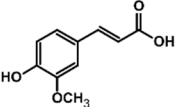
acides gras simples	cutine foliaire	subérine racinaire	cutine
acides gras non substitués 	1-25% C16:0 C18:0 C18:1, C18:2	1-10% C18:0 à C24:0	69% C16:0 majoritaires 38% C18:0, C18:1, C18:2 21% C20:4, C22:0, C24:0
acides gras ω-hydroxylés 	1-32% C16:0 C18:1, C18:2	11-43% C18:1, C16:0 à C26:0	2.60% C16:0
α-ω diacides gras 	généralement <5% >50% chez <i>A. thaliana</i> C16:0 C18:0 C18:1, C18:2	24-45% C18:1, C18:2 C16:0 à C26:0	
acides gras avec modifications dans la chaîne			
acides gras époxydés 	0-34% C18:0 (9,10 époxy) C18:1 (9,10 époxy)	0-30% C18:1 (9,10- époxy-18-hydroxy) C18:0 (9,10-époxy-1,18-diacide)	
acides gras polyhydroxylés 	0-34% C16:0 (10,16-dihydroxy) C18:0 (9,10,18-trihydroxy)	0-3% C18:0 (9,10,18-trihydroxy)	21.40% C16:0 (10,16-dihydroxy) C18:0 (9,10,18-trihydroxy)
α-ω diacides gras polyhydroxylés 	traces	0-8% C18:0 (9,10-dihydroxy)	très abondant (Buda et al, 2013) C14:0 (5-hydroxy) 
alcools gras 	0-8% C16:0 C18:1	1-6% C18:0 à C22:0	1.34% C18:0
diols gras 	0-5% C18:1	0-3% C22:0	6.25% C18:0 (1,9,18-trihydroxy)
glycérol 	1-14%	14-26%	non déterminé
composés phénoliques 	0-1% férulate	0-10% férulate <i>p</i> -coumarate sinapate caféate	abondant <i>p</i> -coumarate caféate

Tableau 1 : Composition en monomères de la cutine foliaire, de la subérine racinaire de trachéophytes, d'après Pollard et al, 2008, et de la cutine de *P. patens*, d'après Edstam et al, 2014 ; Buda et al, 2013 et Renault et al, 2017.

Un léger changement de composition en monomères de cutine n'entraîne pas d'altération drastique de la structure de la cuticule, ni de fusion d'organes : par exemple chez les mutants *Atgpat* chez *A. thaliana*. (Li et al, 2007a), *Ppabcg* chez *P. patens* (Buda et al, 2013). Il peut en revanche augmenter la perméabilité tissulaire comme chez le riz (Park et al, 2010).

Composition chimique de la cuticule

La cutine est un polyester hydrophobe composé majoritairement de dérivés d'acides gras oxygénés en C16 et C18, de glycérol, et d'une faible proportion de phénylpropanoïdes. Sa composition, c'est-à-dire la nature des composants et leurs proportions varient en fonction des espèces, mais aussi au sein des différents organes ou du stade de développement (Rautengarten et al, 2012). Les composés lipidiques de la cutine sont **des** acides gras non substitués (entre 1 et 25%), des acides gras ω -hydroxylés (1-32%), des acides α, ω -dicarboxyliques (<5%, mais >50% chez *A. thaliana*), des acides gras hydroxylés ou époxydés dans la chaîne, des alcools gras (0-8%), du glycérol (1-14%) et des composés phénoliques, majoritairement du férulate (0-1%) (Pollard et al, 2008) (**Tableau 1**). Les mêmes composants sont retrouvés dans le polymère de subérine, mais les proportions relatives changent, on trouve notamment une plus grande proportion de composés phénoliques (0-10%), dont le férulate, mais aussi du *p*-coumarate, du sinapate et du caféate. Ces derniers sont généralement absents de la cuticule foliaire chez les trachéophytes. L'analyse de cutine de gamétophytes de *P. patens* a montré que le composé aliphatique majoritaire est le diacide 5-hydroxytetradécane, un composé en C14 peu abondant chez les gymnospermes, et absent chez les angiospermes (Buda et al, 2013 ; Hunneman and Eglinton, 1972). Selon l'étude d'Edstam et al (2014), les dérivés d'acides gras en C16 sont des composés majoritaires de la cutine de *P. patens*, en particulier l'acide gras non substitué et l'acide (9,10),16-dihydroxyhexadécanoïque. Le diacide C18, composé majoritaire chez *A. thaliana* (Rautengarten et al, 2012), n'a pas été recherché chez *P. patens*. Enfin, une différence notable est la présence d'une quantité plus élevée de composés phénoliques, en particulier de caféate et de *p*-coumarate, dans la cutine de *P. patens*, et une absence de férulate (Renault et al, 2017). Le caféate est un composé phénolique absent des cuticules de trachéophytes, sauf chez *Solanum lycopersicum* dont la cutine foliaire est riche en caféate, puisque sa teneur dépasse celle de l'acide gras le plus abondant (Bolger et al, 2014). On y trouve également du *p*-coumarate et férulate en proportions plus faibles. La cutine foliaire de *Solanum pennelli* contient quant à elle seulement du caféate et du férulate (Bolger et al, 2014). Ces compositions se rapprochent de celles décrites pour la subérine, dans laquelle la proportion en molécules phénoliques peut être jusqu'à 10 fois plus importante que dans la cutine (Pollard et al, 2008).

Voie de biosynthèse de la cuticule

Les acides gras en C16 et C18 sont synthétisés dans le chloroplaste par les fatty acid synthase (FAS). Une partie de ces acides gras reste dans le chloroplaste pour participer notamment à la constitution des membranes des thylakoïdes et de la membrane interne : c'est ce que l'on appelle la voie procaryotique. En revanche, les modifications des acides gras s'effectuent dans le réticulum endoplasmique via la voie eucaryotique. Un transport entre les deux organelles est donc nécessaire. Il est admis que les acides gras traversent l'enveloppe du chloroplaste vers le cytosol, mais le mécanisme exact (par simple diffusion ou transport membranaire) reste inconnu pour le moment (Li-Beisson et al, 2017).

Après export depuis le chloroplaste vers le cytosol, les acides gras libres sont activés par liaison au Coenzyme A sous la catalyse des Long-Chain Acyl-CoA Synthase (LACS), enzymes associées à la membrane externe du chloroplaste (Koo et al, 2004). ABCA9, un transporteur ABC a été décrit comme étant impliqué dans l'import des acyl-CoA dans le réticulum endoplasmique au niveau des graines chez *A. thaliana* (Kim et al, 2013).

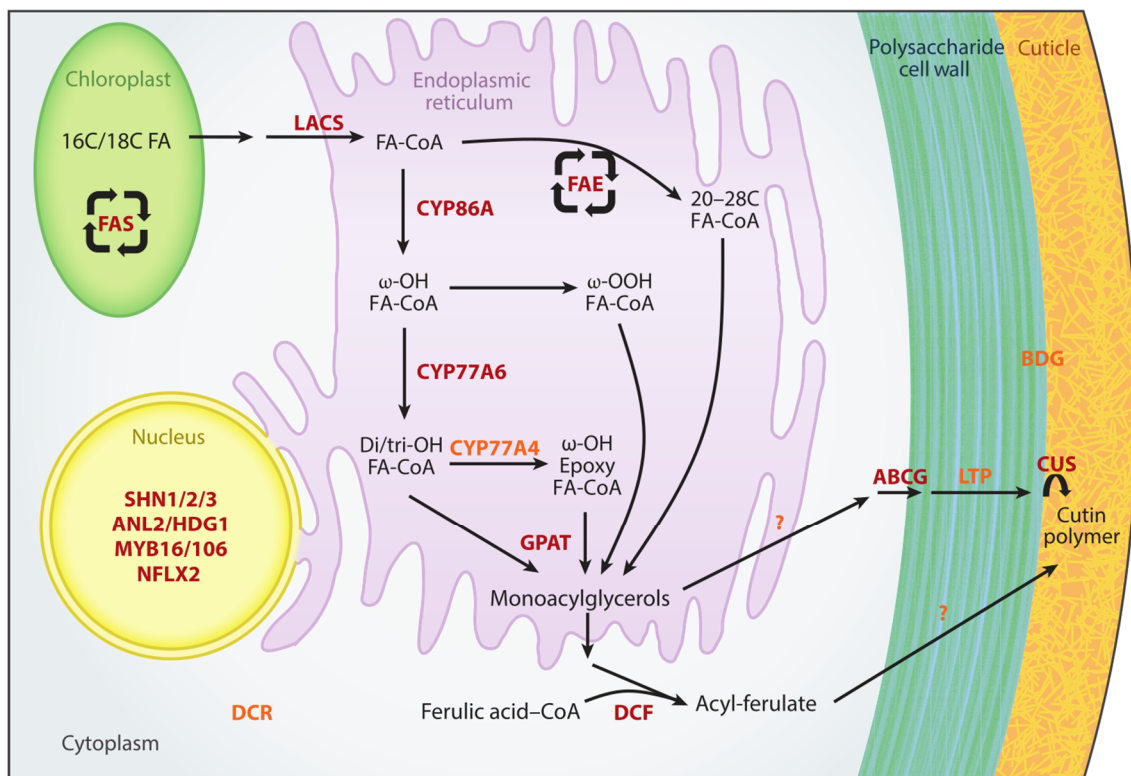


Figure 5 : Biosynthèse des précurseurs aliphatiques de cuticule (Fich et al, 2016).

FA: fatty acids = acides gras; FAS: fatty-acid synthase; LACS: long-chain acyl-CoA synthase; GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase; DCF: deficient in cutin ferulate (BAHD transferase); ABCG: transporteurs ATP binding cassette; LTP: lipid transfert proteins; CUS: cutin synthase.

Au niveau du réticulum endoplasmique, les acyl-CoA peuvent subir ensuite une élongation de la chaîne carbonée de 20 à 28 carbones par la Fatty Acid Elongase (FAE) (Barrett and Harwood, 1998). Les acides gras libres ou sous forme CoA peuvent également subir une hydroxylation en bout de chaîne, appelée ω -hydroxylation par CYP86A, un cytochrome P450 (Benveniste et al, 1998 ; Wellesen et al, 2001 ; Han et al, 2010 ; Haggitt, 2016, p. 20).

L'acide gras ω -hydroxylé peut être hydroxylé dans la chaîne par CYP77A6 pour former un acide gras di- ou tri-hydroxylé (Sauveplane et al, 2009 ; Li-Beisson et al, 2009). Chez *Nicotiana tabacum*, CYP94A5 est capable de catalyser la formation de diacides gras (Le Bouquin et al, 2001). Des acyl-ACP désaturases, enzymes chloroplastiques, peuvent produire des acides gras insaturés comme le C18 :1. CYP77A4 transforme la double liaison C=C des acides gras insaturés, tels que le C18 :1, en groupement époxy (Sauveplane et al, 2009). Ce dernier peut être ouvert en diol par EH1, une époxy hydrolase récemment caractérisée chez *A. thaliana*. (Pineau et al, 2017). Enfin, les acides gras résultants sont stockés sous forme de monoacylglycérols. Les glycerol-3-phosphate acyltransferases (GPAT) transfèrent l'acyl à partir des acyl-CoA sur un hydroxyle du glycérol, généralement en position 2 (*sn*-2), résultant en un 2-monoacylglycérol (2-MAG). Plusieurs GPAT sont caractérisées chez *A. thaliana*, et ont des fonctions spécialisées, soit dans la biosynthèse de cutine, soit dans celle de la subérine (Beisson et al, 2012). Cette spécialisation des GPAT est également supportée par une approche phylogénétique (Yang et al, 2012), qui met en évidence plusieurs homologues de GPAT chez *P. patens*. Le transport des acides gras vers la cutine se fait via des transporteurs de type ABCG à travers la membrane plasmique, et des transporteurs de type LTP à travers la paroi cellulaire. Certains transporteurs, PpABCG7 ainsi que PpLTPG2 et PpLTPG8, ont été caractérisés chez *P. patens* (Buda et al, 2013 ; Edstam et al, 2014). Une acyltransférase extracellulaire de la famille des GDSL (GDSL-motif lipase/hydrolase family protein), la cutin synthase (CUS), catalyse le transfert d'un acide gras sur le groupement ω -hydroxyle d'un acide gras du polymère de cutine, permettant l'allongement du polymère (Yeats et al, 2012 ; Bakan and Marion, 2017) (**Figure 6A**). Il a été montré que la CUS de *Solanum lycopersicum* est non seulement capable d'allonger le polymère linéaire en ajoutant bout à bout des acides 9(10),16-dihydroxyhexadécanoïques à partir de 2-MAG, mais aussi de brancher de nouveaux acides gras sur les hydroxyles se trouvant dans la chaîne, permettant l'élaboration d'un polymère ramifié (Philippe et al, 2016) (**Figure 6B**). AtCUS1 et PpCUS1, mises en évidence par une analyse phylogénétique, sont capables de catalyser la formation d'un oligomère de cutine *in vitro* (Yeats et al, 2014). Il existe une voie métabolique complémentaire dans le cytosol, qui permet de

connecter le métabolisme phénolique et le métabolisme des acides gras, pour aboutir à la synthèse d'un ester d'acide hydroxycinnamique et d'acide gras. L'enzyme DCF (Deficient in Cutin Ferulate) est une BAHD transférase capable de transférer un férulate à partir de féruloyl-CoA sur la fonction ω -hydroxyle du 16-hydroxypalmitate (C16) (Rautengarten et al, 2012). AtDCF étant cytosolique, cette réaction doit probablement s'effectuer à l'interface entre cytosol et réticulum endoplasmique. L'activité d'AtDCF en utilisant un MAG d'acide gras ω -hydroxylé n'a pas été testée, mais il est probable que ce soit le substrat *in vivo*, ce qui serait plus en adéquation avec la voie métabolique décrite ci-dessus. Enfin, le mécanisme de transport de féruloyl-palmitate à travers la membrane plasmique et la paroi cellulaire pour rejoindre le polymère cuticulaire n'est pas connu, ni comment cette molécule est intégrée au polymère de cutine.

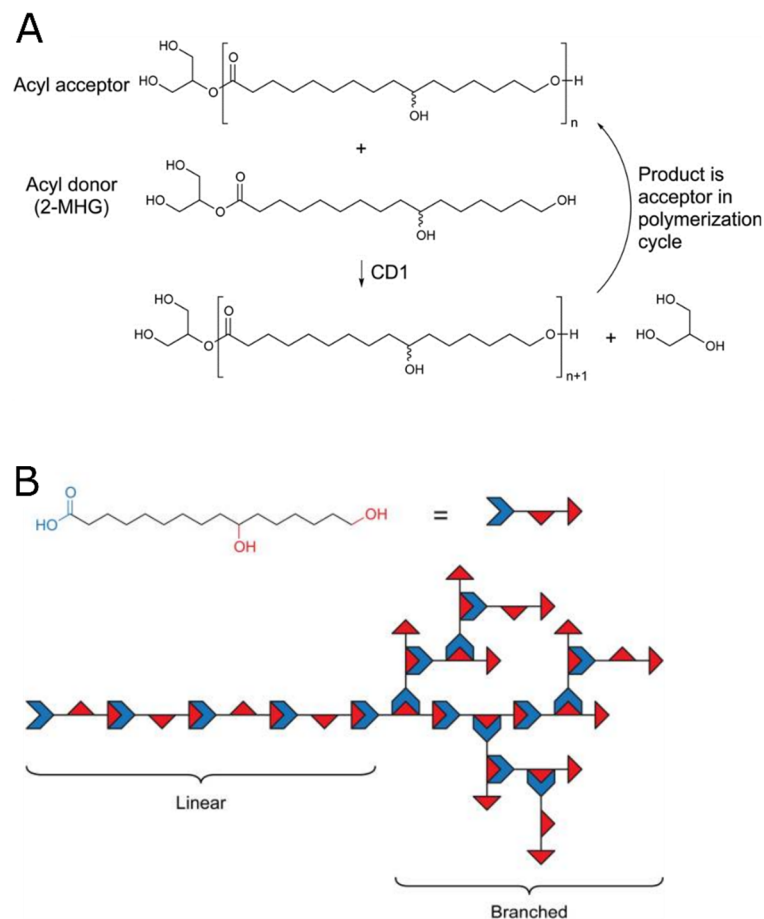


Figure 6 : Structure et formation du polymère de cutine.

A : Mécanisme de la polymérisation d'un 2-monoacylglycérol (2-MAG), donneur d'acyle, et d'un acide gras ω -hydroxylé, accepteur d'acyle effectuée par CD1, une acyltransférase de la famille des GDSSL. La fonction acide carboxylique du 2-MAG est transférée sur la fonction ω -hydroxyle de l'accepteur (Yeats et al, 2012). **B** : Structure moléculaire du polymère de cutine proposée par Yeats et Rose (2013). Les fonctions hydroxyles dans la chaîne des acides gras sont estérifiées par d'autres acides gras, permettant une réticulation du polymère.

Implication des composés phénoliques dans la biosynthèse de cutine et de subérine

A ce jour, l'implication de cinq BAHD dans la production d'esters d'acides hydroxycinnamiques et d'acides gras, précurseurs de biosynthèse de subérine et de cutine a été démontrée (Gou et al, 2009 ; Serra et al, 2010 ; Kosma et al, 2012 ; Rautengarten et al, 2012 ; Cheng et al, 2013). Un résumé des données se trouve en **Tableau 2**.

At3g48720 = AtDCF (deficient in cutin ferulate) (Rautengarten et al, 2012)

La teneur en acides hydroxycinnamiques de la cuticule a été étudiée dans différents organes : les feuilles au stade rosette, les feuilles au stade développement floral, et les différentes parties de la tige (apex, milieu, base). La plus forte teneur en férulate et en *p*-coumarate intégrés dans le polymère cuticulaire est trouvée au niveau de l'apex de la tige et dans les feuilles au stade rosette, c'est-à-dire dans les organes en croissance. Les mutants *dcf* ne montrent pas de phénotype particulier au niveau de leur morphologie en comparaison avec les plantes sauvages. En revanche, ils présentent une diminution drastique de la teneur en férulate incorporé dans la cuticule, tandis que la teneur en *p*-coumarate reste inchangée par rapport aux teneurs dans la cuticule de plantes sauvages. La teneur en 16-hydroxypalmitate (C16) reste inchangée et les acides gras C16 diminuent légèrement. L'expression de *DCF* est la plus importante à l'apex de la tige, là où il y a une forte croissance et donc une importante production de polymère cuticulaire pour l'élongation. Aucune expression n'a été observée dans les racines, ce qui suggère que *DCF* est uniquement impliquée dans la synthèse du polymère cuticulaire et non dans la subérine. *In vitro*, *DCF* utilise efficacement le féruloyle-CoA comme donneur et des acides gras ω -hydroxylés, préférentiellement le 16-hydroxypalmitate comme accepteur. Son activité est beaucoup plus faible avec le caféoyle-CoA et le *p*-coumaroyle-CoA, qui sont des composés phénoliques peu présents voire absents de la cutine des plantes sauvages. Le mutant *dcf* ne présente pas d'augmentation de la perméabilité foliaire au niveau des rosettes, selon un test au bleu de toluidine. L'implication de *DCF* dans la biosynthèse de subérine racinaire, qui contient plus de composés phénoliques que la cuticule, n'a pas été étudiée.

At5g41040 = AtHHT1 (hydroxycinnamoyl-CoA: ω -hydroxyacid O-hydroxycinnamoyltransferase) (Gou et al, 2009)

Le mutant *hht1* présente une diminution de la teneur en férulate incorporé au polymère de subérine au niveau de la racine et du manteau de la graine. La subérine est déposée au niveau des cellules de l'endoderme racinaire lors de l'élongation. Tout comme *AtDCF*, *AtHHT1* a une

Gène	Polymère impliqué	Analyse métabolique du polymère des mutants	Phénotype du mutant	Activités <i>in vitro</i>
<i>AtHHT1</i>	Subérine → Racines → Manteau de la graine	Diminution de la teneur en: - férulate - 16-hydroxypalmitate pour 1 lignée	Pas de changement au niveau de dépôt de subérine Augmentation de la perméabilité tissulaire	Féruoyl-CoA > <i>p</i> -coumaroyl-CoA (16-hydroxypalmitate comme accepteur) Pas d'activité avec caféoyl-CoA et 1-hexadécanol
<i>AtDCF</i>	Cuticule foliaire	Diminution du férulate de la cuticule Teneur en 16-hydroxypalmitate inchangée	Pas d'augmentation de la perméabilité au bleu de toluidine	Féruoyl-CoA > caféoyl-CoA > <i>p</i> -coumaroyl-CoA (16-hydroxypalmitate comme accepteur) Pas d'activité avec 1-hexadécanol
<i>StFHT</i>	Subérine: → Périoderme du tubercule	72% de réduction de la teneur en férulate 76% réduction des ω -hydroxy C18:1	Mutant RNAi affecté au niveau du périoderme du tubercule → perte de turgescence des cellules, augmentation de la perméabilité → pas de changement au niveau de la structure de la subérine	Seule activité observée avec féruoyl-CoA et 16-hydroxypalmitate Pas d'activité avec alcools gras
<i>PtFHT</i>	Cuticule foliaire Subérine: → Racines → Manteau de la graine	Pas de mutants Surexpression PtFHT dans <i>A. thaliana</i> → augmentation de la teneur en férulate dans la cutine foliaire	Pas de mutants	Féruoyl-CoA > <i>p</i> -coumaroyl-CoA (16-hydroxypalmitate comme accepteur) Accepteurs: 16-hydroxypalmitate > 1-dodécanol
<i>AtFACT</i>	Subérine: → Périoderme racinaire → Manteau de la graine Cires racinaires	Disparition des alkyl-caféate	Non déterminé	Caféoyl-CoA > féruoyl-CoA > <i>p</i> -coumaroyl-CoA (dodécan-1-ol comme accepteur)

Tableau 2 : Acyltransférases caractérisées impliquées dans la biosynthèse de précurseurs de cutine ou de subérine.

Arabidopsis thaliana : *AtHHT1* (At5g41040, Gou et al, 2009), *AtDCF* (At348720, Rautengarten et al, 2012), *AtFACT* (At5G63560, Kosma et al, 2012); *Solanum tuberosum*: *StFHT* (LOC102577559, Serra et al, 2010); *Populus trichocarpa*: *PtFHT* (JX515962, Cheng et al, 2013).

meilleure activité avec le féruloïl-CoA (K_m : 9.7 μ M, K_{cat}/K_m : 1787) qu'avec le *p*-coumaroïl-CoA (K_m : 36.7 μ M, K_{cat}/K_m : 372) lorsque le 16-hydroxypalmitate est utilisé comme accepteur. Aucune activité n'a été observée avec le caféoïl-CoA. AtHHT1 n'est pas active avec les acides gras de type C18 (acide stéarique), y compris les C18 hydroxylés dans la chaîne et le 1-hexadecanol, contrairement à ce qui a été observé par d'autres chercheurs (Molina et al, 2009). Il n'y a pas de différence significative au niveau des teneurs en *p*-coumarate dans les racines chez *hht1*. En revanche, la cutine d'*hht1* présente une diminution drastique de la teneur en acides gras C16 ω -hydroxylés. Ces mutants présentent également une augmentation de la perméabilité tissulaire, indiquant que le férulate joue un rôle important dans l'élaboration du polymère de subérine au niveau de la racine.

AtHHT1 et AtDCF ont donc des activités similaires, la première agissant au niveau de la biosynthèse de subérine racinaire, la seconde au niveau de la biosynthèse de cutine. Elles génèrent le même produit, pourtant leurs séquences protéiques ne partagent que 56.4% d'identité.

Solanum tuberosum FHT (StFHT), pour Fatty acid/Hydroxycinnamoyl-CoA Transferase est un homologue d'AtHHT1 caractérisé chez la pomme de terre (Serra et al, 2010). Le tubercule de pomme de terre du mutant *fht* présente une plus grande perméabilité tissulaire par rapport aux tubercules de plantes sauvages. StFHT est cytosolique, et s'accumule majoritairement dans le périoderme du tubercule (Boher et al, 2013). Chez *Populus trichocarpa*, PtFHT a une meilleure activité avec le féruloïl-CoA qu'avec le *p*-coumaroïl-CoA lorsque le 16-hydroxypalmitate est utilisé en accepteur. Le caféate n'a pas été testé. *PtFHT* est exprimé dans tous les organes aériens et souterrains de la plante, majoritairement dans les bourgeons apicaux (Cheng et al, 2013). Dans le périoderme, notamment chez la pomme de terre, le féruloïl-CoA est connu pour jouer un rôle prépondérant dans la biosynthèse de la subérine et des cires (Graça, 2015).

AT5g63560 = AtFACT (Fatty Alcohol: Caffeoïl-CoA caffeoïl Transferase)
(Kosma et al, 2012)

AtFACT synthétise des alkyl-caféate qui sont des esters de caféate et d'alcool gras, composants des cires recouvrant la surface racinaire. Les cires sont des dérivés aliphatiques non polymérisés, généralement à très longue chaîne (\geq C18), recouvrant la cutine ou la subérine, qui comprennent des alcanes, des acides gras, des alcools gras, des monoacylglycérols, et des esters d'acides hydroxycinnamiques (alkyl hydroxycinnamates) (Espelie et al, 1980 ; Li et al, 2007b ; Molina et al, 2009 ; Serra et al, 2010). La proportion de chacun des composants varie

en fonction des espèces comme démontré chez le panais, la carotte, la betterave ou la pomme de terre (Espelie et al, 1980). Les esters présents sont des alkyl-coumarate, alkyl-férulate et alkyl-caféate. Les cires racinaires d'*Arabidopsis* contiennent des esters de *p*-coumarate (avec des chaînes aliphatiques en C18, C20, ou C22) en plus grande proportion que les esters de férulate et de caféate (Li et al, 2007b). Les portions matures des racines sont recouvertes de rhizoderme suberisé ou de périderme. Il y a cinq fois plus de cires, et notamment 9 fois plus d'alkyl-hydroxycinnamates, dans la racine primaire que dans les racines secondaires, plus jeunes. Chez les mutants *Atfact*, il y a disparition des alkyl-caféate, alors que les esters de *p*-coumarate et de férulate sont inchangés (Kosma et al, 2012). L'enzyme FACT recombinante montre une préférence pour le caféate, plutôt que pour le férulate ou le *p*-coumarate, *in vitro*, lorsqu'elle est incubée avec des alcan-1-ol. En revanche, l'étude de l'affinité de l'enzyme pour un alcan-1-ol particulier n'a pas été réalisée.

OBJECTIFS

Les résultats obtenus chez les mutants $\Delta PpHCT$ et $\Delta PpCYP98$ montrent qu'une perturbation du métabolisme phénolique entraîne un phénotype de fusion d'organes associée à une altération de la cuticule. L'analyse des monomères de cutine a mis en évidence une diminution drastique de la teneur en 16-hydroxypalmitate accompagnée d'une disparition du caféate, suggérant que les deux composés pourraient être intégrés sous forme d'un conjugué dans la cuticule.

Chez *A. thaliana*, AtDCF conjugue efficacement le férulate et le 16-hydroxypalmitate *in vitro*, et la cuticule du mutant *Atdcf* montre une diminution de son contenu en férulate, suggérant que ce dernier serait incorporé au polymère cuticulaire sous forme d'ester d'acide gras. Néanmoins, le rôle de cet ester dans la structuration de la cuticule chez *A. thaliana* n'est pas encore défini, principalement en raison de l'absence de phénotype particulier chez *Atdcf*.

La cutine de *P. patens* est plus riche en composés phénoliques que la cuticule des plantes vasculaires. De plus, les phénotypes de fusion d'organes observés chez les mutants *Pphct1* et *Ppcyp98* confirment un rôle structurel important des composés phénoliques.

Notre objectif était donc d'identifier chez *P. patens* un homologue d'AtDCF, la seule protéine responsable de la synthèse d'esters d'acide hydroxycinnamique et d'acide gras probablement intégré au polymère cuticulaire.

Nous avons donné ici à ces enzymes le nom générique de Fatty acid/Hydroxycinnamoyl-CoA Transferase (FHT), qui regroupe toutes les protéines décrites ci-dessus.

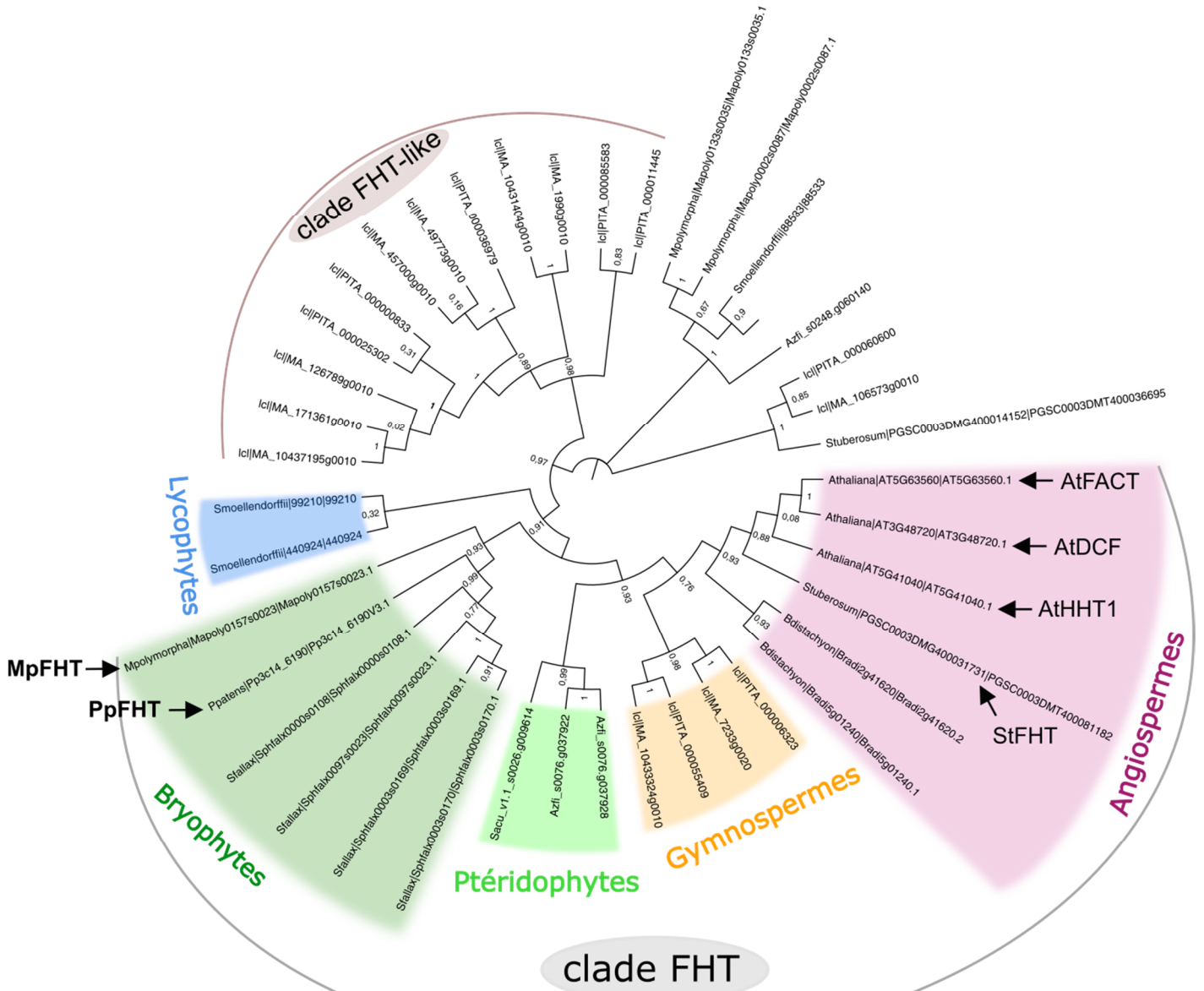


Figure 7 : Cladogramme des fatty ω -hydroxyacid/fatty alcohol hydroxycinnamoyl transferase (FHT).

Les protéines AtFACT, AtDCF, AtHHT1 et StFHT sont des FHT caractérisées. Les autres homologues FHT sont issus d'espèces représentatives de la lignée verte : *Physcomitrella patens* et *Sphagnum fallax* (bryophytes), *Marchantia polymorpha* (marchantiophytes), *Selaginella moellendorffii* (lycophytes), *Salvinia cucullata* et *Azolla filiculoides* (sous-division : Filicophytes = fougères vraies), *Picea abies* et *Picea teada* (Gymnospermes), *Brachypodium distachyon*, *Solanum tuberosum* et *Arabidopsis thaliana* (Angiospermes). Aucun homologue n'a pu être trouvé dans les espèces d'algues suivantes : *Ostreococcus lucimarinus* (chlorophytes), *Mesostigma viride* (Mesostigmatophyceae), *Chlorokybus atmophyticus* (Chlorokybophyceae), *Chara vulgaris* (Charophyceae) et *Klebsormidium subtile* (Klebsormidiophyceae), *Coelechoete irregularis* (Coelechoetophyceae), *Spirogyra sp.* (Zygnematophyceae).

RESULTATS

Une analyse phylogénétique met en évidence la présence d'homologues FHT chez les bryophytes

Des homologues d'AtDCF ont été recherchés par BLASTp chez diverses espèces représentatives de la lignée verte, des chlorophytes aux angiospermes. Par cette approche, j'ai pu identifier le plus souvent plusieurs séquences homologues dans les espèces considérées, excepté chez les algues vertes (i.e. charophytes et chlorophytes), chez lesquelles aucune séquence homologue n'a pu être identifiée. Cette observation a été corroborée par des BLAST réciproques, indiquant que les meilleurs hits du « BLAST DCF » chez ces espèces présentent en fait une homologie supérieure avec HCT. Ces observations suggèrent deux choses : (1) que les protéines FHT seraient apparues après la divergence des plantes terrestres, et (2) qu'elles auraient évolué à partir des protéines HCT, de manière concomitante avec l'apparition du polymère cuticulaire. Elles seraient donc spécifiques aux plantes terrestres.

Un arbre phylogénétique a ensuite été construit par une approche de maximum de vraisemblance (**Figure 7**). Le cladogramme obtenu met en évidence un clade majoritaire qui contient les FHT déjà caractérisées chez les Angiospermes : AtFACT, AtDCF et AtHHT1 chez *A. thaliana*, et StFHT chez *Solanum tuberosum* (clade FHT ; **Figure 7**). Les homologues FHT des bryophytes, ptéridophytes et Gymnospermes se placent dans le clade FHT selon une séquence évolutive qui respecte la position phylogénétique de ces groupes dans l'évolution du règne végétal. Seuls les homologues de *S. moellendorffii* (lycophytes) se placent à la base du clade FHT et montrent une évolution divergente qui peut correspondre à une spécialisation chez cette espèce. Une seule copie de FHT est présente chez *P. patens* (PpFHT) et *Marchantia polymorpha* (MpFHT). Plusieurs sont présentes chez la sphaigne *Sphagnum fallax* et les gymnospermes *Picea abies* et *Picea teada*. Chez ces derniers, les homologues FHT sont présents en de nombreuses copies, dont certaines se regroupent au niveau d'un clade défini comme « FHT-like ». Il comprend uniquement des séquences de gymnospermes qui sont fortement dupliquées pouvant avoir une fonction similaire aux FHT ou bien une fonction particulière due à une divergence fonctionnelle. Chez les Gymnospermes, l'épiderme est souvent remplacé par un périderme dont les cellules subérisées contiennent une forte proportion d'alkyl-hydroxycinnamate (Domergue et Kosma, 2017). Cette particularité pourrait être liée à la présence d'un nombre important d'homologues FHT chez ces deux espèces de gymnospermes.

L'analyse phylogénomique des gènes *FHT* met en lumière (1) leur apparition chez les plantes terrestres, suggérant un lien avec la terrestrialisation, et (2) la présence d'un candidat unique chez la mousse *P. patens* (*PpFHT*, *Pp3c14_6190*), ainsi que chez *M. polymorpha* (*MpFHT*, *Mapoly0157s0023*). L'analyse fonctionnelle de ces deux gènes offre donc l'opportunité de comprendre les fonctions originelles de cette famille de protéines et les modalités de la mise en place d'une cuticule chez les premières plantes terrestres.

Les protéines FHT de bryophytes catalysent *in vitro* la synthèse d'un ester phénolique d'acide gras

Les séquences codantes de *PpFHT* et de *MpFHT* ont été amplifiées à partir d'ADNc, puis insérées dans un vecteur d'expression destiné à *E. coli*, permettant la production de protéines recombinantes porteuses d'une étiquette 6-HIS à l'extrémité N-terminale.

Incubation in vitro de PpFHT : identification du produit

La protéine recombinante *PpFHT* a été incubée dans un premier temps dans les mêmes conditions que *PpHCT1* (Chapitre 1) avec du caféoyl-CoA comme donneur d'acyle et du 16-hydroxypalmitate en accepteur. En effet, selon les résultats obtenus chez les mutants $\Delta PpHCT$ et $\Delta PpCYP98$, il y avait une diminution drastique de la teneur en 16-hydroxypalmitate accompagnée d'une disparition du caféate, suggérant que les deux composés pourraient être intégrés sous forme d'un conjugué dans la cutine. D'autres acides gras montrent également une diminution chez les mutants, tels que le (9,10),16-dihydroxypalmitate (C16) ou le 1,9,18 trihydroxystéarate (C18), mais ces derniers ne peuvent pas être testés pour l'instant car ils ne sont pas disponibles au laboratoire ou commercialement. Après incubation de *PpFHT*, les produits enzymatiques ont été analysés dans un premier temps en UPLC-MS/MS. J'avais émis l'hypothèse que le caféate serait transféré par *PpFHT* à partir du caféoyl-CoA sur la fonction ω -hydroxyle du 16-hydroxypalmitate, et que le produit formé serait un ester de masse théorique de 434.56 g/mol (**Figure 8A**). La méthode de détection utilisée était du Single Ion Recording (SIR) correspondant à la masse théorique + 1 (ionisation electrospray en mode positif, ESI+). Cette analyse a montré que *PpFHT* est effectivement capable de produire une molécule ayant la masse attendue m/z 435.6 (**Figure 8B**). L'analyse des réactions contrôles réalisées avec l'enzyme bouillie et sans caféoyl-CoA a permis de confirmer la dépendance de cette réaction vis à vis de la protéine (**Figure 8B**). La protéine a été incubée en parallèle avec du 16-hydroxypalmitate et du caféate (à la place du caféoyl-coA). Cette réaction n'a pas conduit à l'apparition d'un produit, ce qui confirme l'utilisation d'un donneur d'acyle activé par du

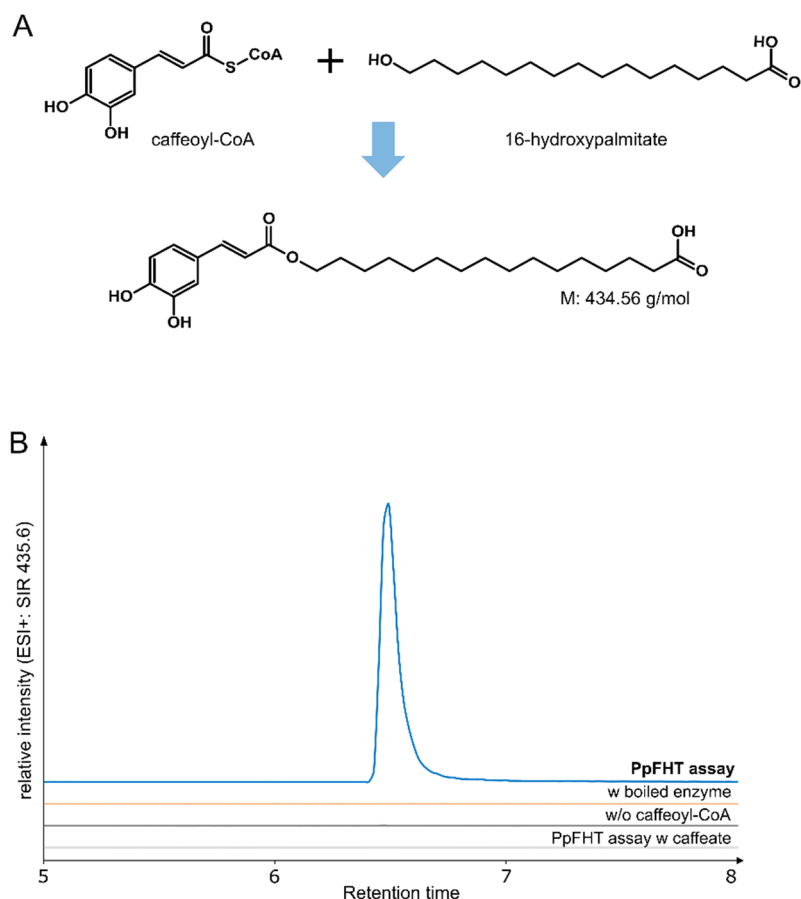


Figure 8: Incubation *in vitro* de PpFHT.

A: Réaction testée et produit théorique attendu. **B:** Conversion enzymatique du 16-hydroxypalmitate et du caféoyl-CoA en caféoyl-palmitate par PpFHT, analysée par UPLC-MS. Les incubations avec enzyme bouillie, sans caféoyl-CoA et avec caféate à la place de caféoyl-CoA sont utilisées comme contrôles négatifs.

Coenzyme A (typique des BAHD transférases). De plus, aucun produit n'est détecté lorsque le 16-hydroxypalmitate est remplacé par du palmitate (acide gras en C16 non hydroxylé en bout de chaîne), ce qui permet d'attester que l' ω -hydroxyle sert à la formation de la liaison ester avec la fonction carboxylique du caféate.

Optimisation des conditions d'incubation

L'incubation de PpFHT à 30°C a mené à la production d'un ester de caféoyl-palmitate. Cependant, il a été montré qu'AtDCF était plus active à 50°C (Rautengarten et al, 2012). Afin d'optimiser les conditions d'incubation de PpFHT, différentes températures ont été testées. Les produits d'incubation ont été analysés en HPLC-UV, et les aires de pics correspondants au caféoyl-palmitate ont été relevées à 330 nm (**Figure 9**). On observe une variation importante de la quantité d'ester produit en fonction de la température, avec une augmentation progressive de 25°C à 40°C, puis une activité stable entre 40 et 45°C, et enfin une inhibition de l'activité à

50°C. L'activité enzymatique optimale étant à 40°C, cette température a été utilisée pour les expériences suivantes.

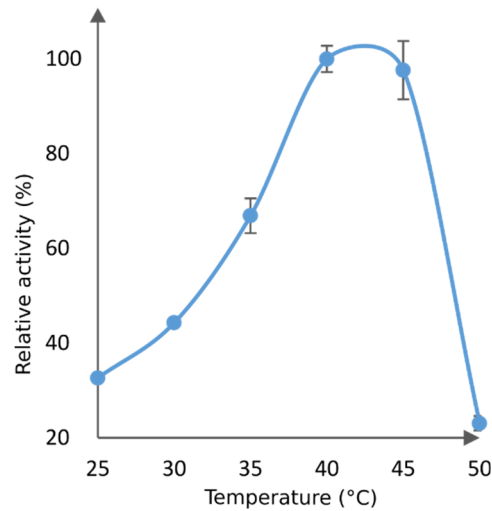


Figure 9: Influence de la température d'incubation sur l'activité enzymatique de PpFHT.
Les pourcentages d'activité relative ont été calculés par rapport à l'aire du produit obtenu en HPLC-UV à 330 nm.

Activités *in vitro* de MpFHT et PpFHT recombinantes

Les protéines recombinantes FHT de *P. patens* et de *M. polymorpha* ont été incubées avec différents donneurs d'acyle (*p*-coumaroyl-CoA, caféoyl-CoA, et féruloyl-CoA) en combinaison avec différents accepteurs à 16 carbones : ω -16-hydroxypalmitate, 1-hexadecanol, palmitate (Figure 10).

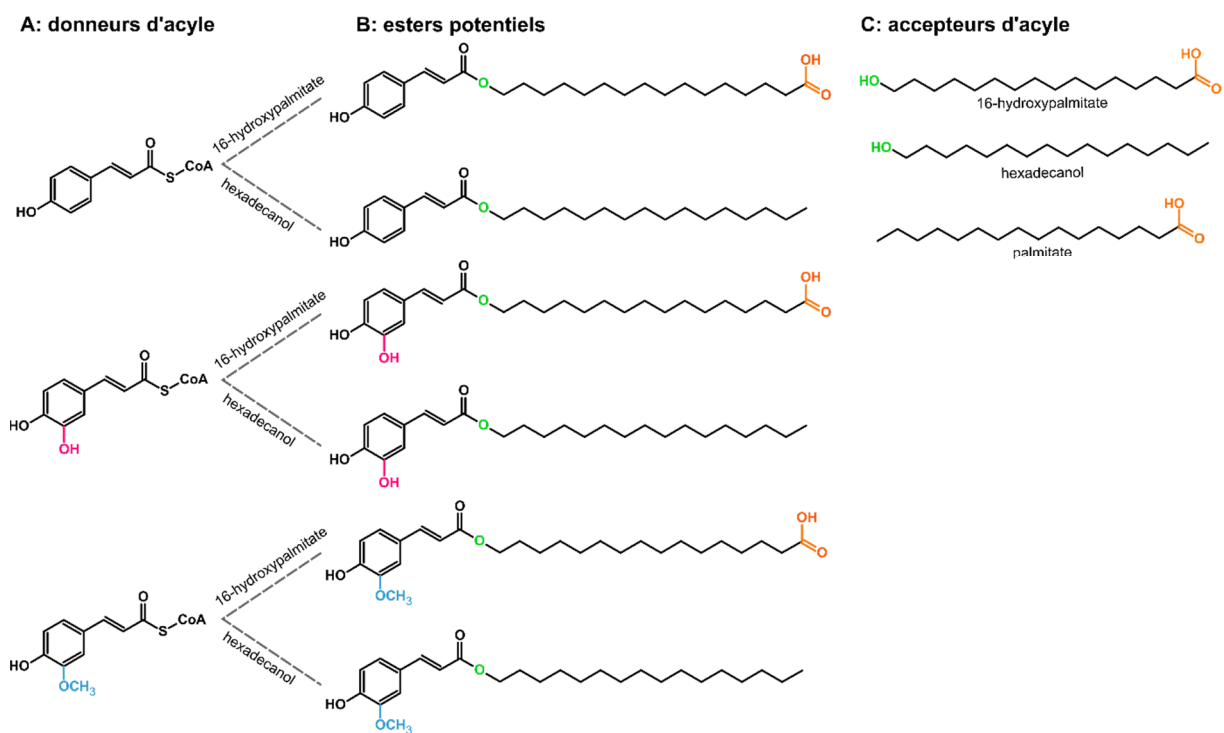


Figure 10 : Substrats et produits potentiels des activités de PpFHT et MpFHT.
A : donneurs d'acyle ; B : esters théoriquement formés par la réaction FHT ; C : accepteurs d'acyle.

Les standards des produits potentiellement formés n'étant pas disponibles, les produits de réactions ont été identifiés en analyse HPLC-UV par comparaison avec les essais contrôles (enzyme bouillie et essai sans acyl-CoA). L'absorbance des esters en UV dépend de l'acide hydroxycinnamique qui les compose : 310 nm pour le *p*-coumarate, 320 nm pour le férulate, 330 nm pour le caféate. La quantification des produits a été réalisée en « équivalent acide hydroxycinnamique » (i.e. *p*-coumarate, caféate, férulate) considérant que les coefficients d'extinction molaire des formes libres sont équivalents aux formes estérifiées. La quantité de produit formé en fonction de la quantité d'enzyme utilisée et du temps de réaction a permis d'obtenir une activité enzymatique en min^{-1} (pmoles de produit formé/pmoles d'enzyme/min). PpFHT montre une nette préférence pour le caféoyl-CoA utilisé avec du 16-hydroxypalmitate, tandis qu'aucun produit n'est formé avec le 1-hexadecanol ni avec les deux autres acyl-CoA (**Figure 11**). Lorsque le 16-hydroxypalmitate est utilisé comme accepteur, MpFHT produit des esters quel que soit l'acyl-CoA utilisé, bien que l'activité la plus importante soit celle enregistrée avec le féruloyl-CoA. L'activité enzymatique avec le caféoyl-CoA est la plus faible, et présente une valeur équivalente à celle de PpFHT.

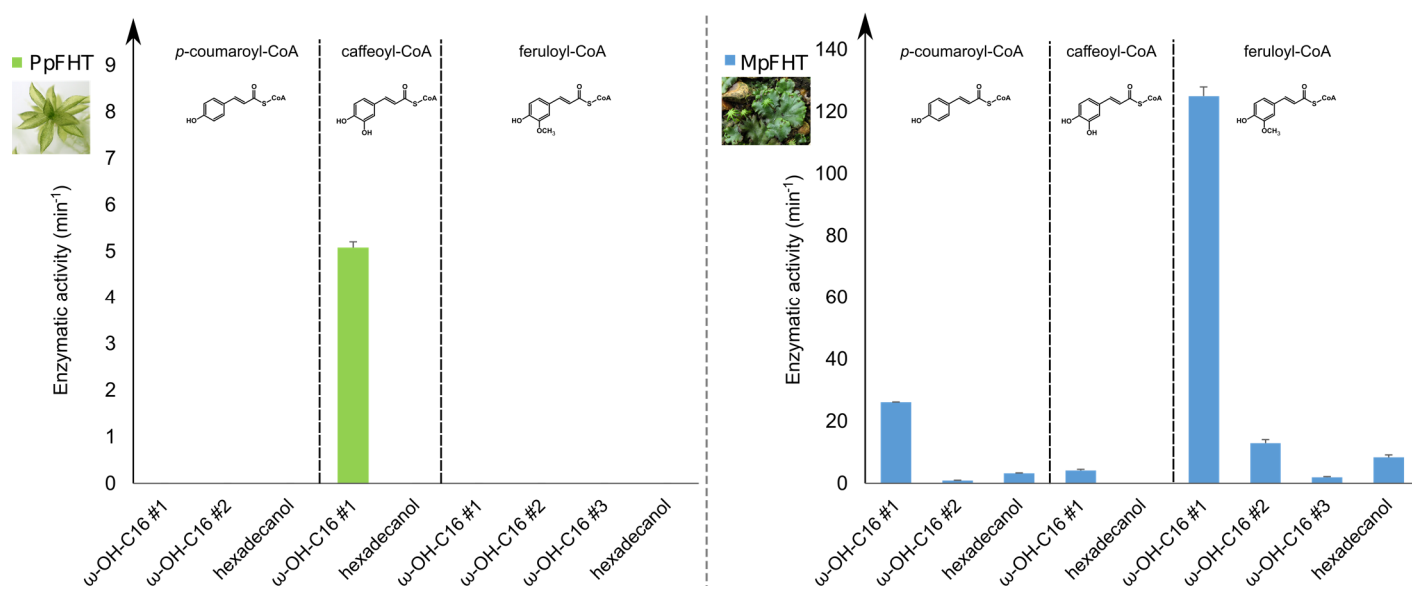


Figure 11 : Activités *in vitro* de PpFHT et MpFHT avec différents donneurs d'acyle (*p*-coumaroyl, caféoyl, féruloyl-CoA) et différents accepteurs (16-hydroxypalmitate ou hexadecanol).

Les incubations ont été analysées en HPLC-UV. Plusieurs pics de produits ont été observés pour certaines réactions et ont été numérotés (#1, #2, #3). L'activité exprimée en min^{-1} correspond à la moyenne de trois réplicats +/- 1'erreur standard. Aucune activité n'est observée avec le palmitate utilisé en accepteur.

Néanmoins, l'analyse en HPLC-UV ne permet pas de déterminer avec certitude la nature des produits formés. En collaboration avec Julie Zumsteg de la plateforme métabolomique de l'IBMP, nous avons développé une méthode de détection des esters en spectrométrie de masse

en tandem (MS/MS) permettant, d'une part de confirmer avec le spectre de fragmentation que la molécule formée est bien un ester, d'autre part d'avoir une détection spécifique et sensible (c.f Protocoles et Méthodologies générales).

Les analyses en MS/MS confirment les résultats obtenus : une métabolisation des trois acyl-CoA par MpFHT et du *p*-coumaroyl-CoA par PpFHT avec le 16-hydroxypalmitate (**Figure 12**). En revanche, la détection MRM pour l'incubation de PpFHT avec du féruloyl-CoA montre un léger signal, absent des contrôles négatifs, suggérant une faible production d'ester, qui n'avait pas été détecté en HPLC-UV.

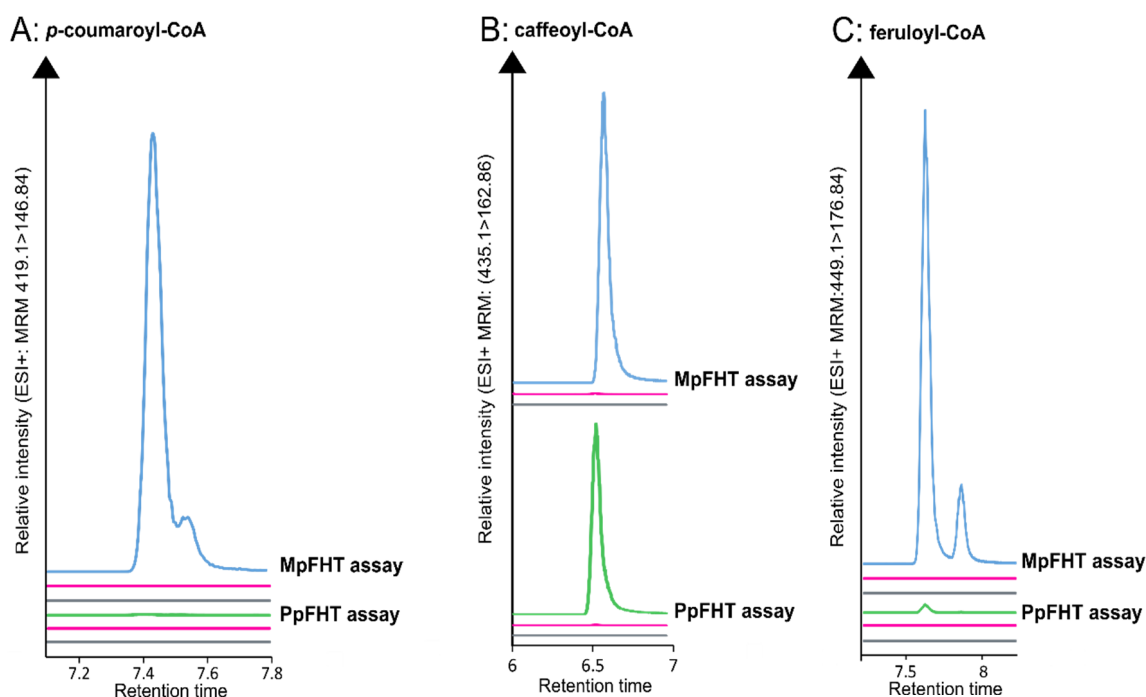


Figure 12: Conversion *in vitro* du 16-hydroxypalmitate et d'un donneur d'acyle (*p*-coumaroyl, caféoyl, féruloyl-CoA) par PpFHT et MpFHT, analysées par UPLC-MS/MS.

A: *p*-coumaroyl-CoA; B: caféoyl-CoA, C: féruloyl-CoA. Les incubations avec enzyme bouillie (ligne rose) et sans acyl-CoA (ligne grise) sont utilisées comme contrôles négatifs.

Lorsque l'hexadecanol est utilisé comme accepteur, l'activité est beaucoup moins efficace qu'avec le 16-hydroxypalmitate. En effet, l'activité est réduite d'environ 90% pour le *p*-coumaroyl-CoA et le féruloyl-CoA (**Figure 11B**), tandis qu'aucun produit n'est formé pour le couple caféoyl-CoA/hexadecanol (**Figure 13**). En effet, l'activité étant déjà relativement faible avec le caféoyl-CoA et le 16-hydroxypalmitate, on peut supposer que l'activité avec l'hexadecanol n'est pas visible dans ces conditions. Ces résultats suggèrent que la fonction acide carboxylique de l'acide est essentielle à l'activité de FHT, et joue peut-être un rôle dans

le positionnement du substrat dans le site actif, même si cette fonction n'est pas impliquée directement dans la réaction d'estérification.

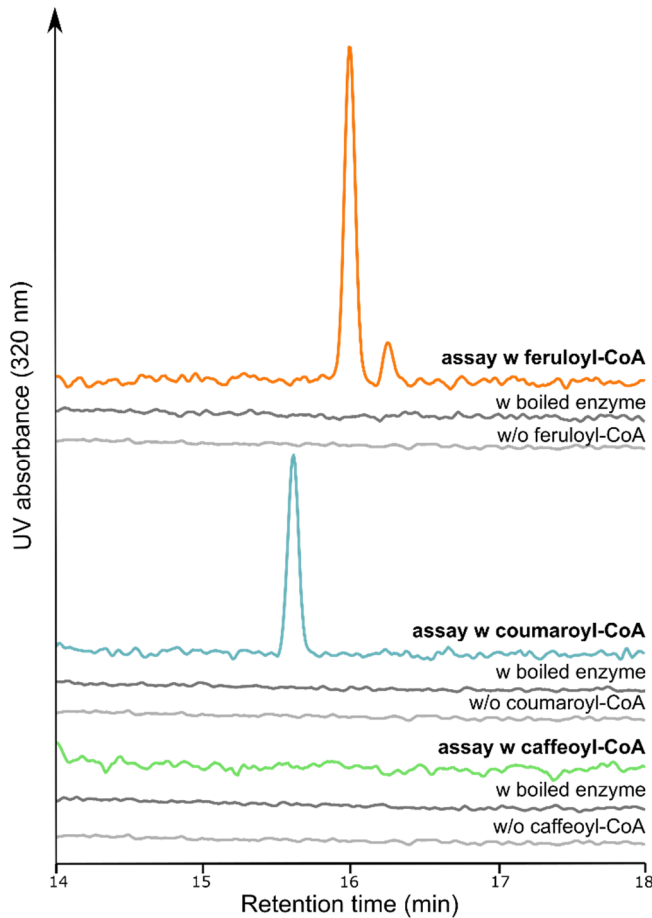


Figure 13: Conversions *in vitro* de l'hexadecanol et d'un donneur d'acyl (*p*-coumaroyl, caféoyl, feruloyl-CoA) par MpFHT, analysées en HPLC-UV à 320 nm. A: *p*-coumaroyl-CoA; B: caféoyl-CoA, C: féruloyl-CoA.

L'analyse des essais *in vitro* de PpFHT et MpFHT a montré que, dans ces conditions d'incubations :

- PpFHT métabolise le 16-hydroxypalmitate en présence de caféoyl-CoA (et très faiblement le féruloyl-CoA).
- MpFHT produit des esters de 16-hydroxypalmitate quel que soit le donneur d'acyle mais avec une préférence marquée pour le féruloyl-CoA, et produit des esters d'hexadecanol avec le *p*-coumaroyl-CoA et féruloyl-CoA.

Les essais *in vitro* ont montré que l'activité préférentielle de PpFHT porte sur le couple caféoyl-CoA/16-hydroxypalmitate, ce qui conforte l'hypothèse que le caféate peut être intégré au polymère de cutine sous forme d'un conjugué avec un acide gras ω -hydroxylé. Pour vérifier cette hypothèse, des lignées de *P. patens* modifiées génétiquement par CRISPR-cas9, nommées *Ppfht*, exprimant une PpFHT tronquée ont été générées (c.f Matériels et Méthodes).

Les lignées *Ppfht* de *P. patens* présentent une altération de la cuticule

Quelques filaments de protonema ont été cultivés *in vitro* sur milieu nutritif en boîte de Petri afin de générer des colonies de gamétophores et de comparer les phénotypes des lignées WT et mutantes (**Figure 14**). Une inspection visuelle rapide a permis de déceler une différence nette au niveau du développement des gamétophores. Les gamétophores mutants présentent en effet une réduction drastique de croissance, rappelant le phénotype des mutants $\Delta PpHCT$ et $\Delta PpCYP98$ (**Figure 14A**).

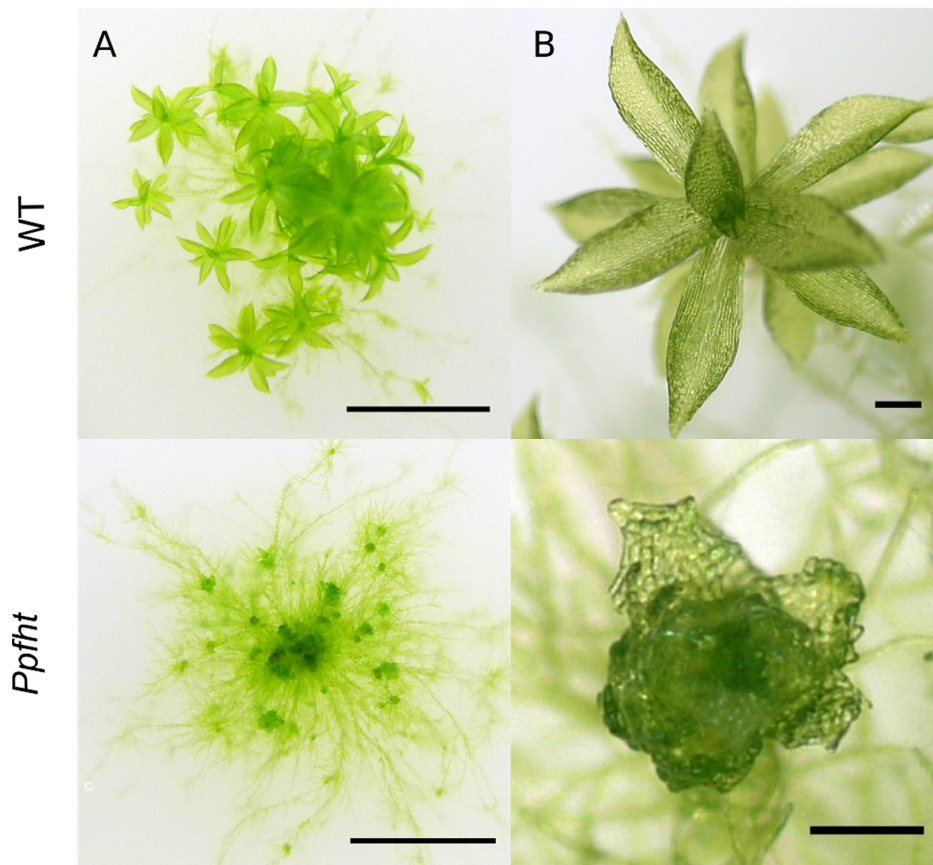


Figure 14 : Phénotype des lignées *Ppfht*.

A : Colonies de gamétophores âgés de 2 mois, échelle 0.5 cm. **B**: Gamétophores observés à la loupe binoculaire, échelle 0.2 mm.

Pour documenter plus en détails ces altérations développementales, une observation à la loupe binoculaire a été réalisée et a révélé un phénotype de fusion d'organes chez les gamétophores des mutants *Ppfht*, toutefois moins prononcé que chez $\Delta PpHCT$ (**Figure 14B**). Le recours à la microscopie électronique à balayage a apporté un degré de détails supplémentaire. Cette technique a en particulier mis en lumière des phyllides plus petites chez le mutant *Ppfht* que chez le sauvage, associé manifestement à un nombre réduit de cellules les composant (**Figure 15A**). De plus, les cellules constituant les phyllides de *Ppfht* sont désorganisées, mais semblent

avoir une taille similaire à celles du sauvage, bien qu'aucune mesure quantitative n'ait été effectuée pour étayer cette observation. Le gamétophore *Ppfht* montre un développement hétérogène des phyllides le long du gamétophore : les phyllides se situant à la base du gamétophore ont une forme lancéolée similaire aux phyllides du WT, alors que les phyllides se situant vers l'apex du gamétophore présentent une forme altérée et une désorganisation plus importante des cellules. De plus, les cellules des phyllides de *Ppfht* apparaissent moins turgescents que celles du sauvage (**Figure 15B**).

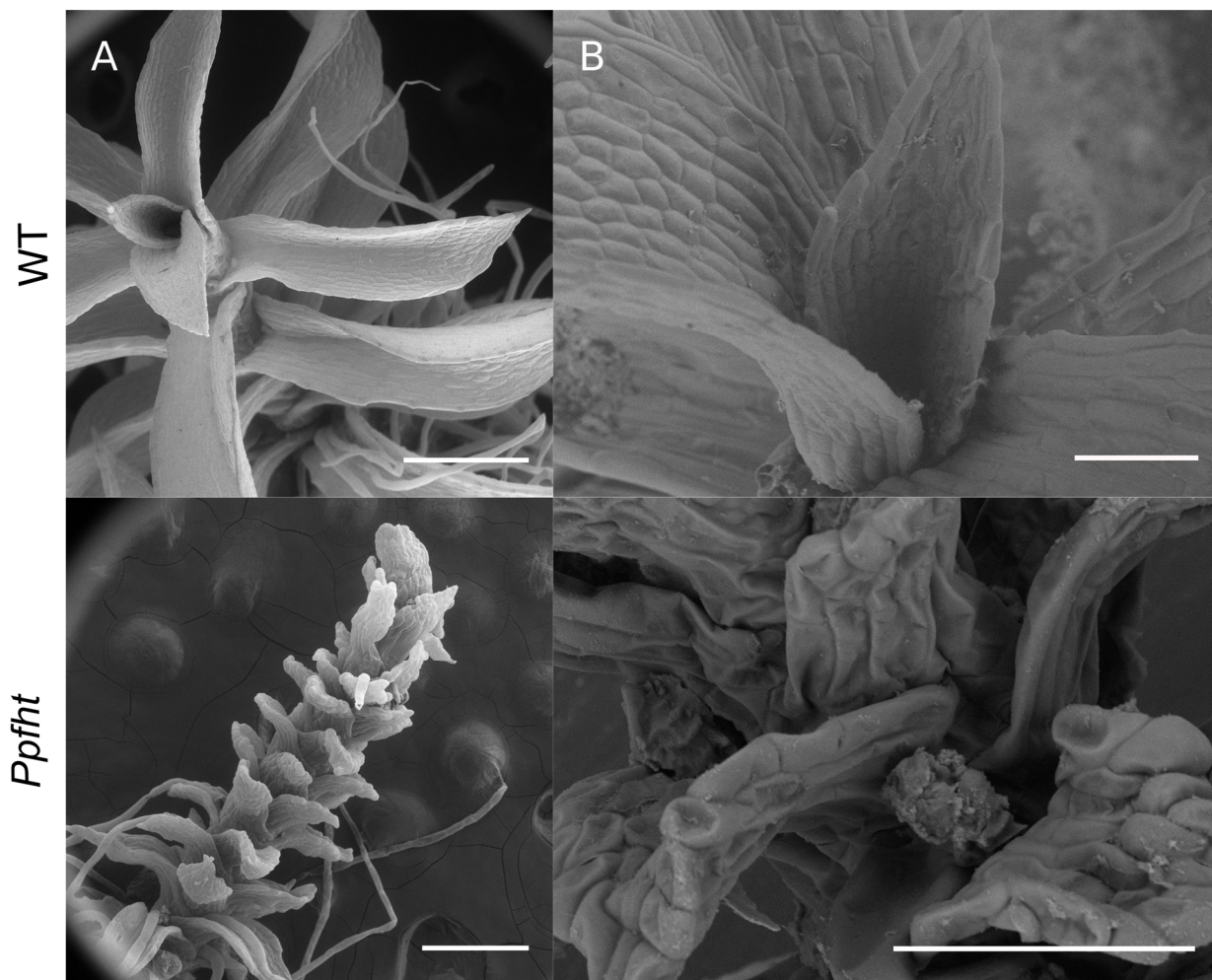


Figure 15 : Observation des gamétophores *Ppfht* au microscope électronique à balayage.

A : Vue globale d'un gamétophore, échelle 200 μ m, **B :** Observation des cellules de phyllides, échelle : 100 μ m.

Le phénotype du mutant *Ppfht* suggère une désorganisation de la cuticule. Pour confirmer cette hypothèse, un test de perméabilité tissulaire en utilisant une solution de bleu de toluidine, un colorant hydrophile incapable de traverser la cuticule, a été réalisé. Ce test montre une augmentation très nette de la perméabilité du gamétophore chez le mutant, matérialisée par un marquage bleu intense (**Figure 16**).

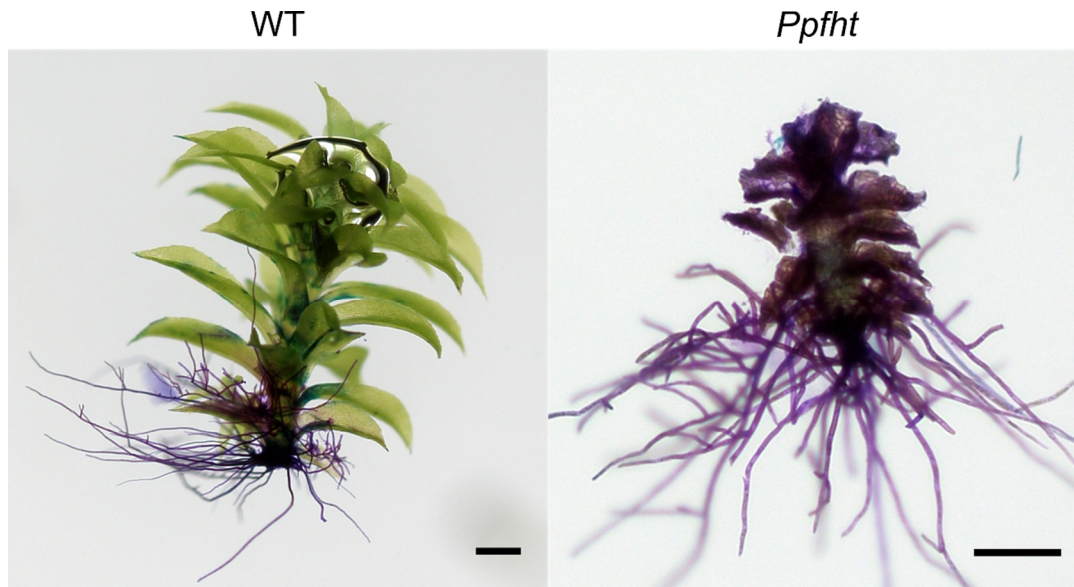


Figure 16 : Test de perméabilité des gamétophores *Ppfht* au bleu de toluidine. échelle 0,5 mm.

Toujours pour valider l'hypothèse d'un défaut de cuticule chez le mutant *fht*, j'ai cherché à observer directement cette couche par microscopie électronique à balayage, à partir de coupes transversales d'une cellule de phyllide.

Tout d'abord, nous avons pu identifier sur nos images les différentes structures décrites dans Buda et al, 2013 qui recouvrent les phyllides d'une plante sauvage: la paroi pectocellulosique (P), la couche cuticulaire (CL) plus foncée, puis la cuticule proprement dite (CP) constituant la couche la plus externe et qui apparaît plus claire (**Figure 17**). En revanche, toutes ces couches ne sont pas présentes chez le mutant *Ppfht*. En effet, sur la première image de *Ppfht*, on distingue la paroi pectocellulosique recouverte à l'extérieur par une fine couche claire pouvant correspondre à la cuticule, mais on ne distingue ni la CL, ni la CP (**Figure 17**). De plus, l'épaisseur de cette « cuticule » est hétérogène le long de la paroi pectocellulosique et est plus fine par endroit. Sur la deuxième image, la cuticule est absente et on ne distingue que la paroi pectocellulosique. Ces observations suggèrent une altération de la structure de la cuticule chez le mutant *Ppfht*, notamment une absence de la couche cuticulaire, qui est l'interface entre les composés polysaccharidiques pariétaux et les composés lipidiques de la cuticule à proprement dite.

Pour confirmer ces résultats, une analyse des constituants de la cuticule est nécessaire. Comme nous avons montré une métabolisation du caféoyl-CoA et du 16-hydroxypalmitate par PpFHT *in vitro*, une diminution de la teneur en caféate et en 16-hydroxypalmitate dans la cutine est attendue. Il est probable que la teneur d'autres monomères de cutine soit affectée. En effet, d'autres acides gras ω -hydroxylés tels que le (9,10),16-dihydroxypalmitate (C16) ou le 1,9,18-trihydroxystéarate (C18), présents dans la cutine de *P. patens* pourrait également y être intégrés sous forme d'ester de caféate ou de *p*-coumarate.

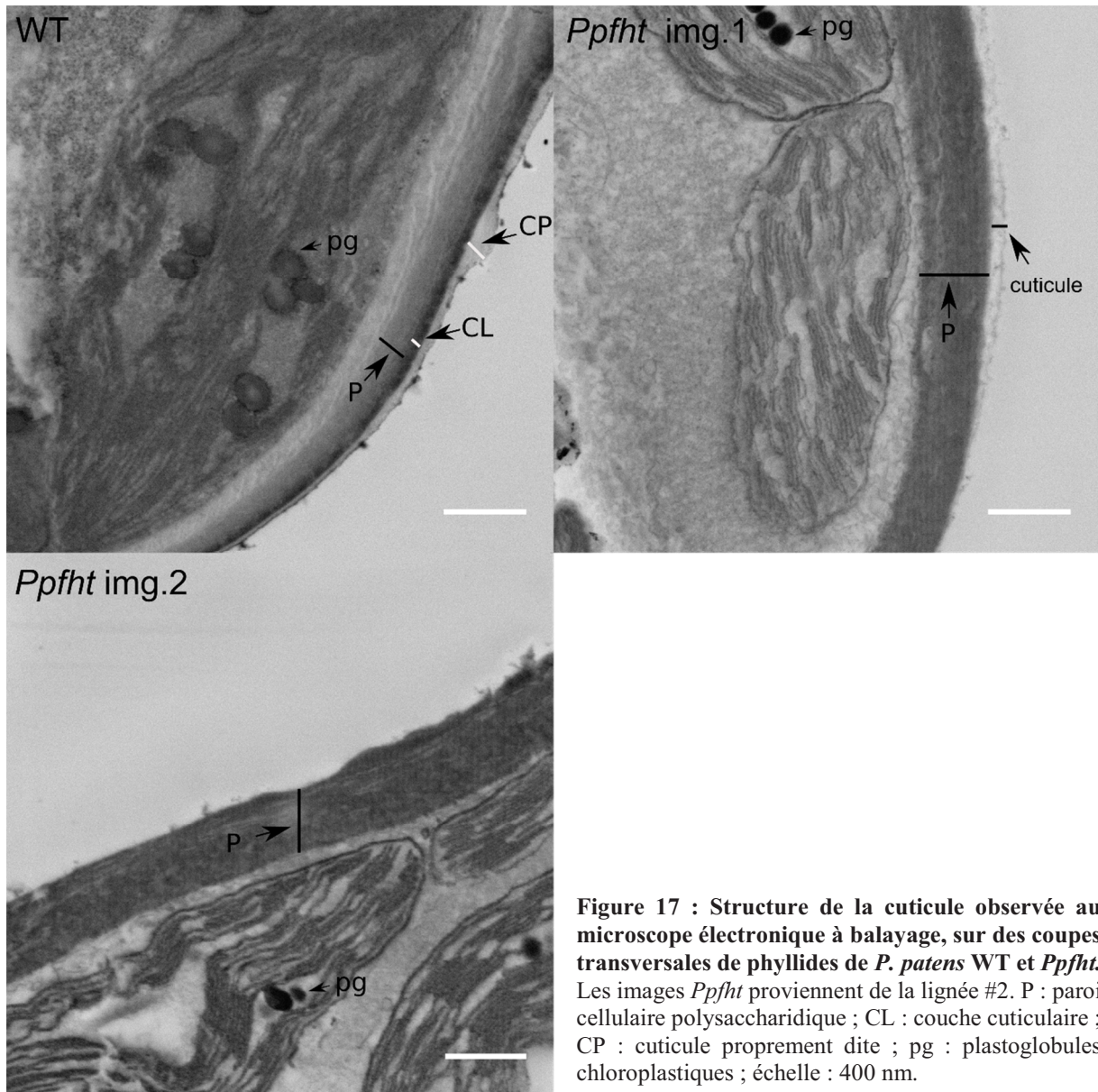


Figure 17 : Structure de la cuticule observée au microscope électronique à balayage, sur des coupes transversales de phyllides de *P. patens* WT et *Ppfht*. Les images *Ppfht* proviennent de la lignée #2. P : paroi cellulaire polysaccharidique ; CL : couche cuticulaire ; CP : cuticule proprement dite ; pg : plastoglobules chloroplastiques ; échelle : 400 nm.

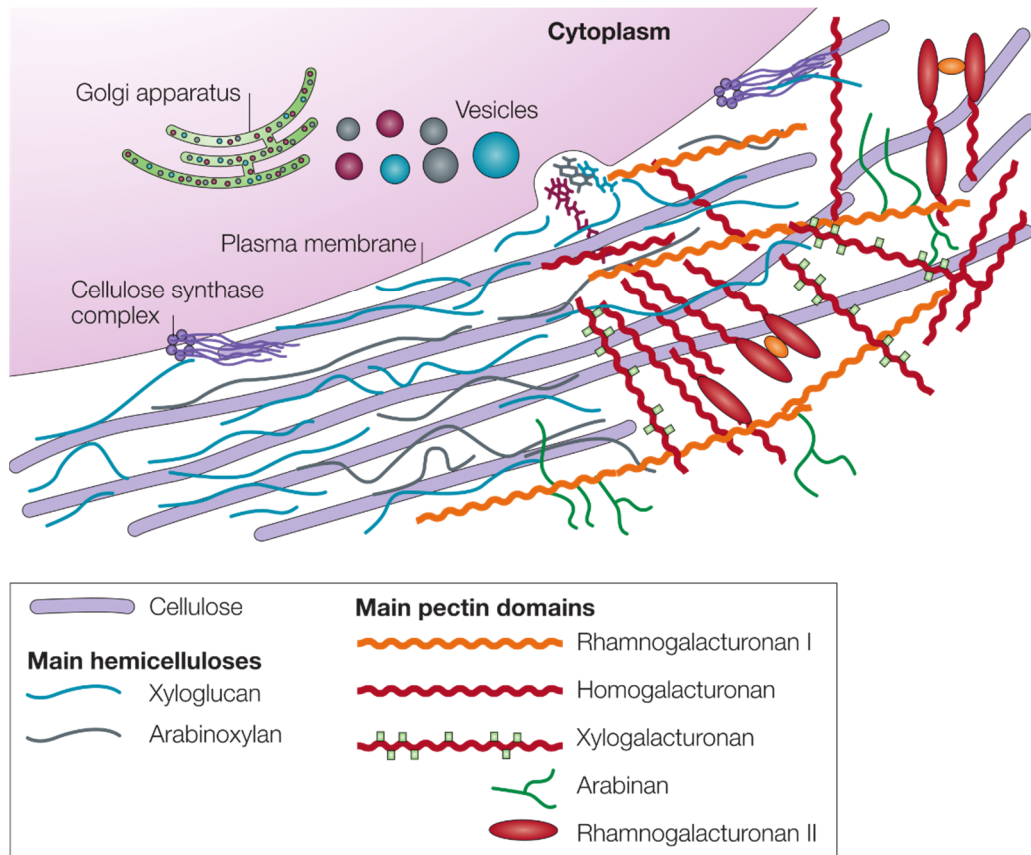


Figure 18 : Structure de la paroi cellulaire primaire végétale (Cosgrove, 2005).

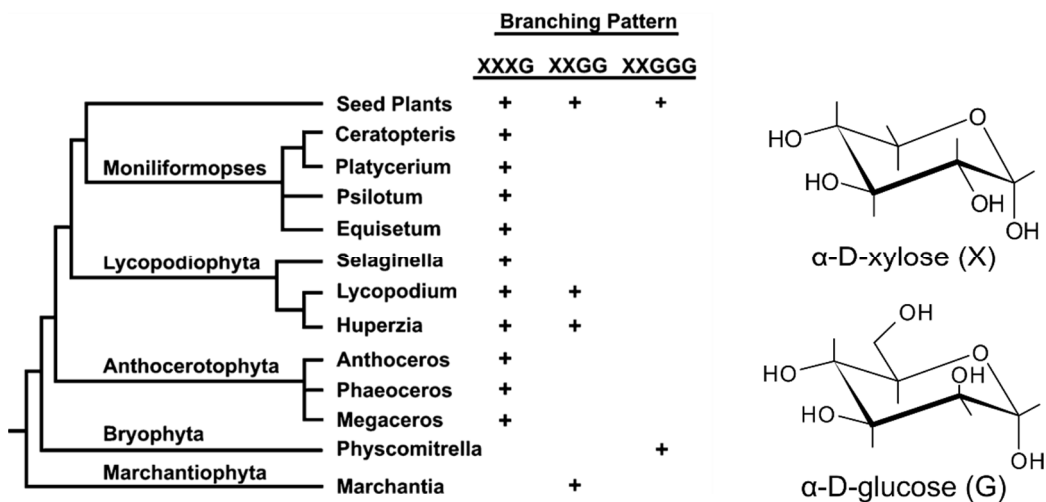


Figure 19 : Composition des xyloglucanes (XyG) dans les différents embranchements du règne végétal (Peña et al, 2008).

Les XyG sont des polymères de glucoses β -(1 \rightarrow 4) (motif **G**) décorés avec des xyloses en α -(1 \rightarrow 6) (motif **X**). *P. patens* a un motif particulier en XXGGG, retrouvé seulement chez les spermatophytes.

DISCUSSION

Notre étude de PpFHT a montré que cette protéine produit un ester de caféoyl-palmitate à partir de caféoyl-CoA et de 16-hydroxypalmitate, *in vitro*. Une très faible métabolisation du féruloïl-CoA a été observée, et aucune du *p*-coumaroyl-CoA, dans les conditions d'incubation utilisées. Bien que la température d'incubation enzymatique ait été optimisée, l'activité relativement faible de PpFHT par rapport à celle de MpFHT suggère que les conditions d'incubations de la protéine de *P. patens* pourraient être encore optimisées (pH, nature du tampon ...).

Les mutants *Ppfmt* montrent un phénotype de fusion d'organes, toutefois moins prononcé que les mutants $\Delta PpHCT$ et $\Delta PpCYP98$ (Renault et al, 2017), associé à une augmentation de la perméabilité tissulaire mise en évidence par une coloration au bleu de toluidine. L'observation de la cuticule en coupe transversale indique une altération de sa structure, et une absence à certains endroits. L'élément le plus notable est la disparition la CL (**Figure 17**), qui est l'interface entre les polysaccharides de la paroi et les composés lipidiques de la CP. L'absence de CL pourrait être confirmée en observant la cuticule de la capsule de sporophyte, chez qui cette interface est très visible (**Figure 2B-3,4**, Buda et al, 2013). Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse que cet ester pourrait être impliqué dans la mise en place de l'interface entre paroi et CP. En effet, cet ester étant de nature amphiphile grâce à sa double nature phénolique et aliphatique, il pourrait être un excellent lien entre la paroi (polaire) et la CP (apolaire).

La paroi est composée de microfibrilles de cellulose, incluses dans une matrice de polysaccharides complexes élaborée à partir de pectines et d'hémicellulose (**Figure 18**, Cosgrove, 2005). Les xyloglucanes (XyG) sont les composants hémicellulosiques majeurs de la paroi primaire des dicotylédones et des monocotylédones non graminées (Eckardt, 2008), et sont également présents chez les plantes basales (Popper et Fry, 2003). Les XyG sont des polymères de glucoses β -(1 \rightarrow 4) décorés avec des xyloses en α -(1 \rightarrow 6). *P. patens* possède des XyG de type XXGGG, retrouvés chez les spermatophytes, mais absents de tous les autres embranchements intermédiaires (**Figure 19**, Peña et al, 2008). Les autres types d'hémicellulose, particulièrement abondantes chez les céréales, sont des arabinoxylanes, des polymères de xyloses β -(1 \rightarrow 4) décorés avec des branches d'arabinoses. Les pectines sont quant à elles des polymères très variés, majoritairement composés d'acides galacturoniques. Ces pectines sont particulièrement intéressantes, car des analyses microscopiques ont suggéré la présence d'une couche riche en pectine à l'interface entre la cuticule et la paroi cellulaire (Jeffree, 2006). De

plus, l'utilisation de pectinases sur les feuilles de plusieurs espèces d'Angiospermes permet de séparer la cuticule de la paroi (Orgell, 1955). Fich et al (2016) ont proposé un modèle d'accrochage de la cuticule sur la paroi cellulaire, faisant intervenir des liaisons esters soit entre la fonction acide d'un acide gras et une fonction hydroxyle d'un des glucides de pectine, soit entre la fonction ω -hydroxyle d'un acide gras et la fonction acide carboxylique d'un acide galacturonique (**Figure 20**). Chez *P. patens*, les pectines détectées sont des homogalacturonanes, c'est-à-dire des polymères d'acides galacturoniques non décorés par d'autres glucides (Moller et al, 2007). Ce modèle ne fait cependant pas intervenir d'acides hydroxycinnamiques, pourtant présents dans la cuticule. De plus, ces derniers seraient probablement impliqués dans l'élaboration de ponts entre la subérine et la paroi (Kolattukudy, 2001 ; Bernards, 2002 ; Bernards et al, 1995). D'ailleurs chez les trachéophytes et principalement les plantes grasses, le férulate forme des ponts entre la paroi cellulaire et la lignine, par l'intermédiaire de liaisons ester avec des arabinoxylanes de la paroi et des liaisons ether avec la lignine (de O. Buanafina, 2009 ; de Oliveira, 2015).

Il serait possible que les esters d'acides hydroxycinnamiques et d'acides gras synthétisés par PpFHT interviennent dans l'élaboration de l'interface entre cuticule et paroi cellulaire, formant des ponts entre ces deux structures. Cette hypothèse est confortée par le fait que PpFHT soit co-exprimée avec plusieurs enzymes annotées comme impliquées dans la biosynthèse de la paroi. De plus, elle est très fortement co-exprimée avec une protéine (nommée PpFHT2), annotée comme « AtHHT1 ». La protéine PpFHT2 recombinante avait été produite et incubée avec les mêmes substrats que PpFHT mais n'avait pas donné de produits. En revanche, les mutants montraient le même phénotype que PpFHT (résultats non présentés). Cette enzyme semble donc, tout comme PpFHT, impliquée dans la structuration de la cuticule et offre des perspectives intéressantes pour la suite du projet. La génération d'un double mutant *Ppfht/Ppfht2* pourrait être intéressante, dans le cas d'un phénotype plus marqué, qui indiquerait alors que les deux enzymes ont un rôle complémentaire.

Les analyses phylogénétiques ont montré que les FHT semblent spécifiques des plantes terrestres, et qu'elles ont divergé à partir des HCT. Ces hypothèses sont confortées par l'absence de véritable cuticule chez les algues. Nous avons montré que le mutant *fht* de *P. patens* présente un phénotype de fusion d'organes associé à une augmentation de la perméabilité tissulaire, ce qui n'est pas le cas chez le mutant *Atdef*. De plus la cuticule de *P. patens* se distingue de la cuticule des autres trachéophytes par sa richesse en acides hydroxycinnamiques, notamment en caféate et en *p*-coumarate. Aucune expérience de stress n'a été effectuée sur *Ppfht*, mais on peut

s'attendre à une moindre résistance, notamment contre la perte d'eau puisqu'il a été montré que la cuticule joue un rôle essentiel dans la maintenance du statut hydrique des plantes (Kosma et al, 2009 ; Lü et al, 2012).

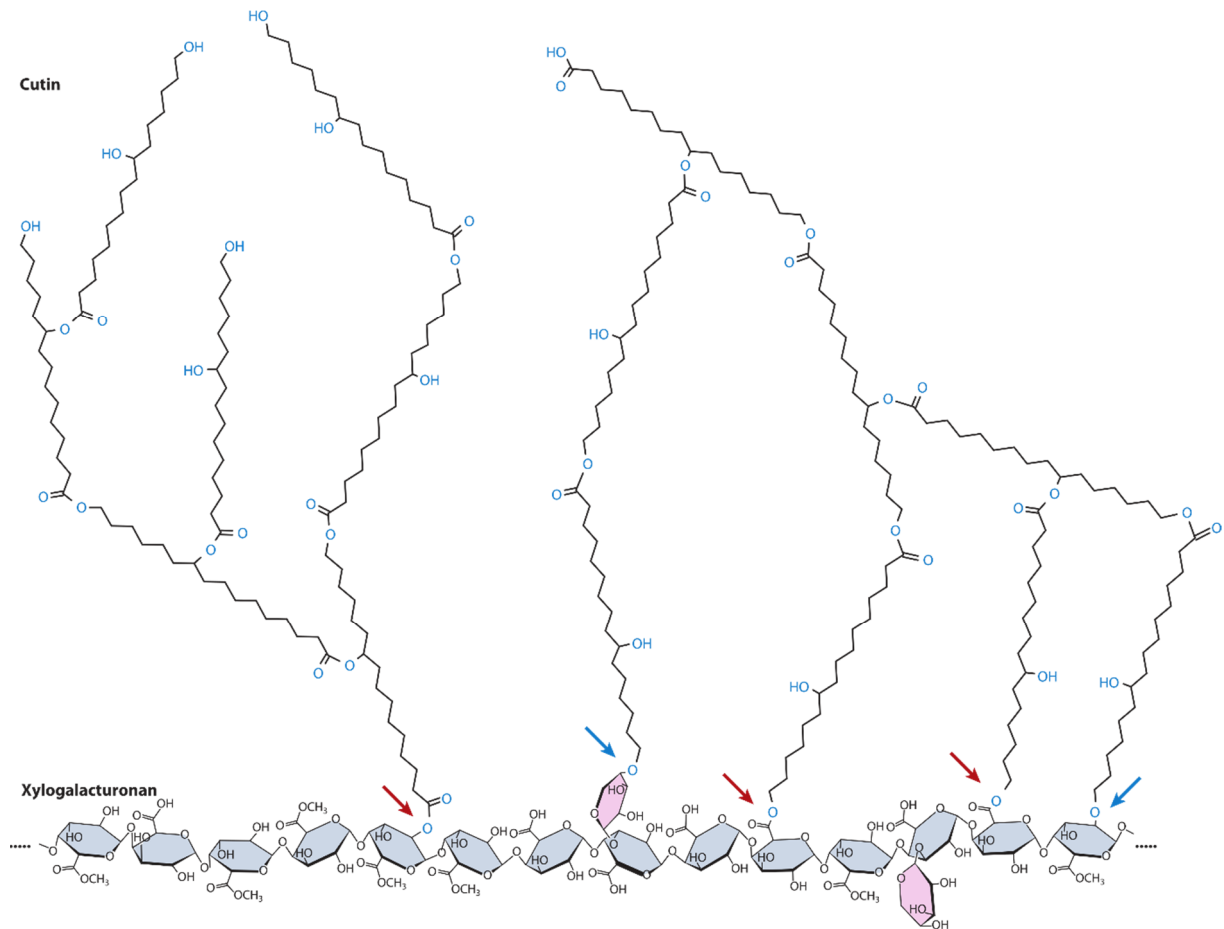


Figure 20 : Modèle d'ancrage de la cutine sur les pectines de la paroi (Fich et al, 2016).

Les xylogalacturonanes sont des pectines composées d'un polymère d'acides galacturoniques (bleu), dont la fonction acide est souvent méthylée, décoré de xyloses (rose). Les flèches bleues indiquent une liaison éther entre la fonction ω-hydroxyle d'un acide gras de cutine et une fonction hydroxyle d'un glucide de la paroi. Les flèches rouges indiquent une liaison ester soit entre la fonction acide d'un acide gras et une fonction hydroxyle d'un des glucides de paroi, soit entre la fonction ω-hydroxyle d'un acide gras et la fonction acide carboxylique d'un acide galacturonique.

MATERIELS ET METHODES

Analyses phylogénétiques

Afin d'identifier les orthologues potentiels du gène *AtDCF* (*At3g48720*) chez *Physcomitrella patens* et comprendre les modalités d'apparition de cette enzyme au cours de l'évolution, j'ai entrepris de reconstruire l'histoire évolutive de la famille des FHT dans la lignée verte. A cette fin, j'ai effectué des recherches par BLASTp de séquences homologues à *AtDCF* dans le génome de plantes représentatives des grands groupes phylogénétiques. La liste des espèces considérées lors de cette analyse est visible ci-après.

Espèces	Groupe phylogénétique	Bases de données utilisées
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Chlorophytes	https://phytozome.jgi.doe.gov
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophytes	https://phytozome.jgi.doe.gov
<i>Klebsormidium nitens</i>	Charophytes	http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp
<i>Chara braunii</i>	Charophytes	http://bioinformatics.psb.ugent.be
<i>Marchantia polymorpha</i>	Bryophytes	https://phytozome.jgi.doe.gov
<i>Physcomitrella patens</i>	Bryophytes	https://phytozome.jgi.doe.gov
<i>Sphagnum fallax</i>	Bryophytes	https://phytozome.jgi.doe.gov
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Lycophytes	https://phytozome.jgi.doe.gov
<i>Salvina cucullata</i>	Monilophytes	https://www.fernbase.org
<i>Azolla filiculoides</i>	Monilophytes	https://www.fernbase.org
<i>Picea abies</i>	Gymnospermes	http://congenie.org
<i>Pinus taeda</i>	Gymnospermes	http://congenie.org
<i>Brachypodium distachyon</i>	Angiospermes	https://phytozome.jgi.doe.gov
<i>Solanum tuberosum</i>	Angiospermes	https://phytozome.jgi.doe.gov
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Angiospermes	https://phytozome.jgi.doe.gov

La recherche de séquences homologues à *AtDCF* a été étendue aux données transcriptomiques du projet 1KP (www.onekp.com), en particulier aux espèces d'algues charophytes suivantes : *Chara vulgaris* et *Klebsormidium subtile* (Charophyceae), *Coelocheate irregularis* (Coleochaetophyceae), *Spirogyra sp.* (Zygnematophyceae).

Un seuil arbitraire de E-value de 5.1E-83 a été employé pour filtrer les candidats. Cette valeur correspond à la valeur obtenue pour le premier hit ne correspondant pas à une FHT lors du BLASTp du protéome d'*A. thaliana* avec la séquence d'*AtDCF*. Selon ces critères, 41 séquences homologues ont été identifiées. Les séquences protéiques ont été alignées grâce à l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004) et les sites ambigus (i.e. variables) ont été masqués grâce à l'approche Gblocks (Castresana, 2000). Un arbre phylogénétique a ensuite été généré grâce à l'alignement « GBlocks » selon l'approche de « maximum likelihood » en utilisant le logiciel PhyML 3.0 (Guindon et al, 2010) et le modèle d'évolution LG (Le and Gascuel, 2008). La

robustesse de la topologie de l'arbre a été testée par l'approche d'« approximate likelihood ratio test » (aLRT ; Anisimova et Gascuel, 2006). Les procédures phylogénétiques sont effectuées grâce au logiciel Seaview v4 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>). L'arbre phylogénétique est finalement exporté en format Newick vers le logiciel FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) pour mise en forme.

Matériel végétal et conditions de cultures

Physcomitrella patens (Hedw.) Bruch & Schimp., souche Gransden (Rensing et al, 2008), a été cultivée en milieu liquide ou solide Knop (**Annexe 1**; Reski and Abel ,1985) complété avec les microéléments suivants : 50 mmol.L⁻¹ H₃BO₃, 50mmol.L⁻¹ MnSO₄, 15mmol.L⁻¹ ZnSO₄, 2,5 mmol.L⁻¹ KI, 0,5 mmol.L⁻¹ Na₂MoO₄, 0,05 mmol.L⁻¹ CuSO₄ et 0,05 mmol.L⁻¹ CoCl₂. Le milieu a été solidifié avec de l'Agar à 12 g.L⁻¹ (OXOID, Thermo Scientific). Les plantes ont été maintenues à 23°C sous 16/8 h cycle jour/nuit, l'intensité lumineuse réglée à 70 mmol.m⁻².s⁻¹. Les gamétophores ont été propagés sur boîtes de pétri. Les cultures liquides ont été établies par inoculation et broyage de gamétophores à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra Turrax, IKA) et maintenues sous agitation constante pour une aération adéquate. Les cultures liquides de gamétophores s'obtiennent par broyage léger (≈ 15s), tandis que les cultures de protonema s'obtiennent par broyage plus important (≈ 1min30s). Le broyage s'effectue environ tous les quinze jours, avant le renouvellement du milieu qui consiste en la filtration du matériel broyé puis le transfert dans un nouvel erlenmeyer contenant le milieu Knop.

Pour la production de protoplastes, les cultures de protonema de *P. patens* sont broyées puis transférées dans un milieu Knop modifié contenant 1/10 de la concentration en Ca(NO₃)₂ du milieu standard. Le milieu de culture est renouvelé après quatre jours avec le milieu 1/10 Ca(NO₃)₂. Le matériel végétal est ensuite cultivé trois jours supplémentaires avant son utilisation pour l'isolation des protoplastes. Une faible concentration en calcium permet d'améliorer la production de protoplastes en favorisant le stade chloronema. (Rother and al, 1994).

Isolation et transformation des protoplastes de *P. patens*

Les protoplastes sont isolés à partir de 200 ml de culture liquide de protonema, selon le protocole décrit dans Hohe et al, 2004. Une solution de driselase à 4% est préparée dans 10mL de Mannitol (0.5 M, pH 5.8), incubée pendant 45 minutes sur une plateforme rotative puis centrifugée à 3500 rpm pendant 10 min. Le surnageant est ensuite filtré stérilement sur 0.22

µm. 200 ml de culture de protonema sont filtrés sur un filtre 100µm puis le matériel végétal est placé dans une boîte de Petri, auquel on ajoute 8mL de Mannitol 0.5 M et 8mL de la solution de driséase. La boîte est fermée hermétiquement par du parafilm, protégée de la lumière à l'aide d'une feuille d'aluminium et placée sur une plateforme rotative pendant 45 minutes. Les protoplastes générés par l'action de la driséase sur les polymères pariétaux sont isolés en passant la solution une première fois sur filtre nylon 100µm, puis une seconde fois sur filtre nylon 50µm. La boîte de Petri est rincée avec 3 ml de Mannitol 0.5 M. Enfin, le filtre 50µm est rincé également avec 3 ml de Mannitol 0.5 M. Le filtrat est transféré dans deux tubes en verre, centrifugés pendant 10 min à 500 rpm (accélération 3, décélération 3). Après avoir éliminé le surnageant, les culots de protoplastes sont délicatement lavés avec 10 ml de Mannitol 0.5 M - centrifugation 10 min à 500 rpm (accélération 3, décélération 3)- puis les culots sont repris dans 5 ml de Mannitol 0.5 M et sont combinés dans un seul tube. Les protoplastes sont comptés au microscope à partir d'un aliquot de 100 µL placés dans hémocytomètre. La solution de protoplastes est centrifugée puis le culot est repris dans un volume adéquat de solution de 3M afin d'ajuster la densité à 1.2×10^6 protoplastes/ml.

Pour chaque transfection, 100 µL de solution d'ADN dans 0.1 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sont mélangés délicatement avec 250 µl de la solution de protoplastes et 350 µl de solution de PEG 40%, et incubés pendant 30 min à température ambiante (avec mélange manuel toutes les 5 min). Le mélange est ensuite dilué progressivement avec le milieu 3M toutes les 5 minutes en ajoutant successivement 1, 2, 3 et 4 ml. Les protoplastes sont ensuite culottés et repris dans 3 ml de milieu de régénération (milieu Knop liquide supplémenté avec 5% glucose et 3% mannitol) puis transférés dans une plaque à 6 puits (2 puits par transformation : 1.5 ml + 1.5 ml). La plaque est parafilmée, puis incubée une nuit à 25°C dans le noir, suivie par une culture en conditions normales pendant 10 jours.

Les protoplastes régénérés sont transférés sur milieu gélosé Knop recouvert d'un film de cellophane stérile en déposant le contenu du puit avec une pipette. Après 3 jours, le film de cellophane est transféré sur milieu sélectif Knop + généticine (G418).

Production de mutants déficients *Ppfht* par CRISPR/Cas9

La technique CRISPR permet de sélectivement altérer un locus grâce à l'induction de cassures double brin par l'action de la protéine Cas9. Lors de la réparation de ces cassures de l'ADN, principalement selon le mécanisme de « non-homologous end-joining » (NHEJ), des erreurs peuvent être introduites et conduire à l'inactivation d'un gène (modification du cadre de lecture,

délétion de séquence). La sélectivité du système CRISPR repose sur l'expression d'ARN guide (ARNg) présentant un domaine de 20 nucléotides complémentaire d'une région génomique et formant un complexe avec la protéine Cas9. Ce sont ces ARNg qui vont guider la protéine Cas9 vers la région cible. Ce système a récemment été adapté à *P. patens* par l'équipe de Fabien Nogué (INRA Versailles ; Lopez-Obando et al, 2016).

Le protocole dans *P. patens* repose sur la co-transfection d'un plasmide permettant l'expression d'un ARNg sous le contrôle du promoteur *U6* de *P. patens* et d'un second plasmide permettant l'expression de la protéine Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (codons optimisés pour l'homme) sous le contrôle du promoteur de l'*ACTIN1* du riz (plasmide pAct-Cas9), connu pour être actif chez la mousse (Horstmann et al, 2004). Un troisième plasmide, contenant une cassette d'expression du gène de résistance *NPTII* (G418), est également co-transfecté pour aider à la sélection des protoplastes transformés (plasmide pRT101-NPTII). L'édition du génome selon ce protocole repose sur une expression transitoire de la protéine Cas9 et de l'ARNg, conduisant à des lignées mutantes non transgéniques *sensu stricto*, par opposition aux lignées produites par recombinaison homologue (c.f. Chapitre I).

La séquence codante de *PpFHT* (*Pp3c14_6190*) a été utilisée pour identifier une séquence d'ARN guide précédée par un PAM (protospacer adjacent motif) de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (NGG en brin positif) en utilisant le logiciel CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>, Haeussler et al, 2016). L'ARN guide choisi cible l'exon 1 de la séquence codante de *FHT*, ayant un score maximal de spécificité (100) avec une seule « off-target » prédite (4 bases non complémentaires). Une séquence d'ADN double brin contenant le promoteur PpU6 spécifique des petits ARN nucléaires, suivi de la séquence de l'ARN guide (une séquence de 20 nucléotides spécifique de la séquence cible, et une séquence de 92 nt commune à tous les ARNg), flanquée aux deux extrémités par les sites *attB1* et *attB2*, a été commandée chez la compagnie IDT (gBlocks® ; <https://eu.idtdna.com/>) (**Figure 21**). La séquence a été clonée dans le vecteur pDONR/Zeo (**Annexe 2**) en utilisant le système de recombinaison BP Gateway®, générant le plasmide pDONR-pU6-gRNA. La séquence clonée a été vérifiée par séquençage Sanger.

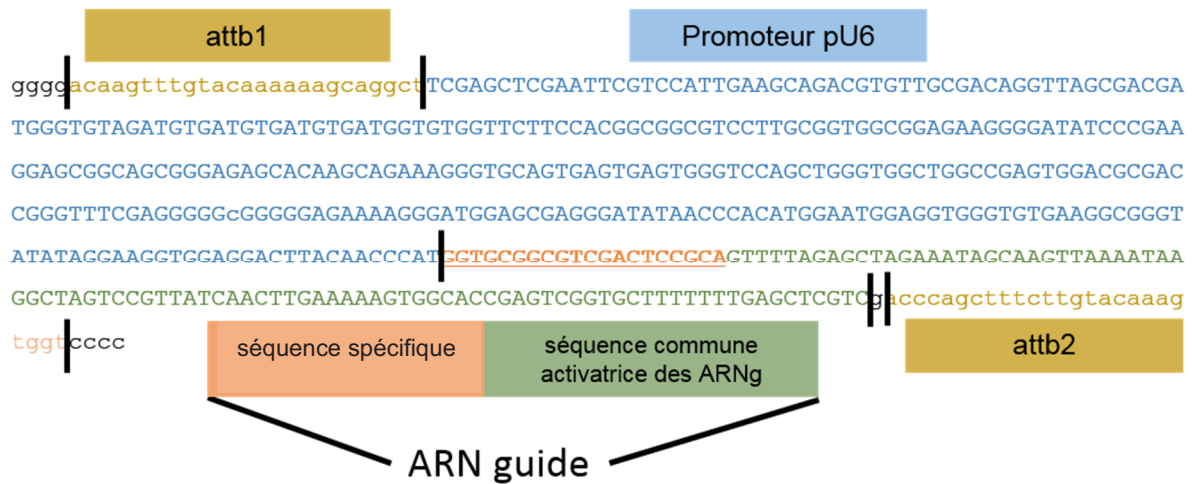


Figure 21 : Séquence utilisée pour l'expression de l'ARN guide ciblant le locus FHT (Pp3c14_6190).

Chaque plasmide est préalablement purifié à partir de Midi-prep (NucleoBond Xtra Macherey Nagel). Une solution stock de plasmide est préparée stérilement par précipitation : 0.04 volume de NaCl 5M et 2 volumes d'EtOH absolu sont ajoutés à un volume de solution plasmidique. Après agitation, la solution est stockée à -20°C pendant 2h puis centrifugée à 4°C à vitesse maximale pendant 30min. Le surnageant est éliminé, puis le culot est lavé avec 1ml d'EtOH 70%. Après centrifugation pendant 5 min à 4°C, puis après avoir retiré le maximum de surnageant sous hotte stérile, le culot est séché pendant 10 min à température ambiante, puis repris dans 30 µL d'H₂O stérile. 100µL de mix de transformation stérile est ensuite préparé et contient : 5 µg de chacun des trois plasmides dans 90µL d'H₂O stérile et 10µL de Ca(NO₃)₂ 1M.

Les plasmides pAct-Cas9, pDONR-pU6-gRNA et pRT101-NPTII (5 µg chaque) ont été co-transfectés dans des protoplastes de *P. patens* selon la méthode décrite ci-dessus. Après régénération des protoplastes, les transformants sont sélectionnés sur milieu Knop agar supplémenté avec 25 mg. L⁻¹ de généticine (G418) pendant deux semaines.

Caractérisation moléculaire des lignées CRISPR

Suite à l'étape de sélection, les transformants sont transférés sur un milieu Knop agar standard. Lorsque le développement des plantes est suffisant, un peu de tissu (protonema ou gamétophore) est prélevé à l'aide d'une pince stérile sous hotte à flux laminaire, introduit dans 100 µL de tampon d'extraction d'ADN (**Annexe 1**) et incubé pendant 15 min à 45°C sous agitation (1400 rpm). Alternativement, le matériel végétal est broyé à l'aide d'un micropilon dans 400µL de shorty buffer (**Annexe 1**). Après centrifugation à vitesse maximale pendant 10 min à température ambiante, 250 µL de surnageant sont transférés dans un nouveau tube,

auxquels sont ajoutés 250µL d’isopropanol. Les tubes sont inversés manuellement et centrifugés à vitesse maximale pendant 20 min à température ambiante. Après avoir retiré le maximum de surnageant, le culot est lavé avec 1 ml d’EtOH 70%. Le culot est séché à l’air libre pendant 10 min après avoir retiré l’EtOH 70%, puis repris dans 30 µL d’H₂O. Les échantillons d’ADN sont ensuite conservés à -20°C. 2µL d’ADNg sont utilisés pour la PCR de géotypage.

Afin de déterminer si une altération génétique a eu lieu dans le locus *FHT*, des fragments d’environ 800bp encadrant la séquence cible sont amplifiés à partir d’ADNg à l’aide de la polymérase Phire Hot Start DNA (Thermofisher) et des amorces décrites en **Annexe 3**, en utilisant le protocole décrit en **Annexe 4**. Les amplicons ont ensuite été séquencés par Sanger par la plateforme « Expression génique » de l’IBMP pour révéler la présence et la nature des modifications de séquence. La même procédure a été suivie pour évaluer la présence d’altération aspécifique au site « off target » prédit par le logiciel CRISPOR. Quatre lignées présentant des altérations significatives du locus *FHT* (changement du cadre de lecture, large délétion) sans présence d’« off target » ont été utilisées pour toutes les expériences aval (**Figure 22**).

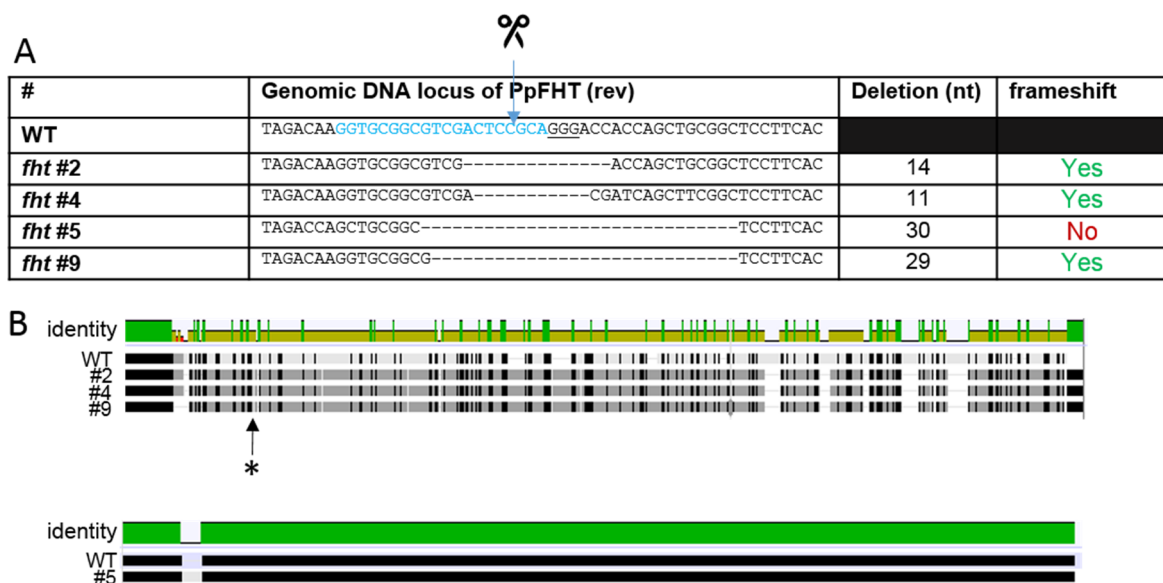


Figure 22 : Caractérisation moléculaire des lignées transgéniques *PpFht*.

A. Séquence génomique du locus PpFHT dans les lignées transgéniques modifiées par Crispr-Cas9. La séquence en bleu correspond à la séquence de l’ARN guide utilisé, la séquence soulignée au PAM, et les ciseaux correspondent au site de coupure de la cas9 qui se situe 3 nt en amont du PAM. **B.** Séquences des protéines résultantes dans les lignées. Trois lignées (#2; #4; #9) produisent une protéine avec un stop prématuré (*) dû à un décalage du cadre de lecture. La lignée #5 produit une protéine avec une délétion de 10 acides aminés.

Production de protéines recombinantes dans *Escherichia coli*

La séquence codante du gène *PpFHT* a été amplifiée par PCR à l'aide de la polymérase Phusion (Thermo Fisher) à partir d'ADNc issus d'ARN de protonema de *P. patens*, écotype Gransden (protocole en **Annexe 4**). Des extensions *attB* ont été ajoutées aux extrémités des amorces pour permettre un clonage aval avec le système de recombinaison Gateway® (Amorces #327 et #328, **Annexe 3**). Afin d'élargir l'analyse biochimique de la famille FHT chez les bryophytes, le gène orthologue de *Marchantia polymorpha* (accession Tak-1 ; Mapoly0157s0023) a été cloné en parallèle selon la même procédure (Amorces #1034 et #1035, Annexe 3). Chaque séquence a été clonée dans le pDONR/Zeo (**Annexe 2**) par « BP cloning », puis transférée par « LR cloning » dans le vecteur d'expression bactérien pHGWA (**Annexe 2**) permettant la production d'une protéine recombinante tagguée par 6HIS en extrémité N-terminale dans la bactérie *Escherichia coli*.

Les protéines ont été produites et purifiées par Laurence Herrgott sur la plateforme « Production et purification des protéines » de l'IBMP.

Analyse *in vitro* de l'activité enzymatique FHT

L'activité décrite des protéines FHT consiste en une acylation d'un accepteur aliphatique par un acide hydroxycinnamique, cette réaction de transfert nécessitant l'activation préalable de l'acyle par le coenzyme A. Les molécules aliphatiques acceptrices testées – 16-hydroxypalmitate, 1-hexadecanol et palmitate – ont été obtenues auprès de la compagnie Sigma-Aldrich et ont été préparées à 40mM dans de l'éthanol absolu. Les formes activées d'acides hydroxycinnamiques – *p*-coumaroyl-CoA, caféoyl-CoA et féruloyl-CoA – ont été achetées chez la compagnie Transmit et ont été préparées à 5 mM dans l'H₂O.

Les essais enzymatiques *in vitro* ont été réalisés dans 100 µL de tampon de phosphate de potassium 50 mM (KPi, pH 7,4) contenant 2 µg de protéines recombinantes, 1mM de dithiothréitol, 5 mM d'acyl-accepteur (16-hydroxypalmitate, 1-hexadecanol et palmitate) et 200 µM d'acyl-CoA (*p*-coumaroyl-CoA, caféoyl-CoA ou feruloyl-CoA). Les réactions ont été initiées par addition d'acyl-CoA, incubées à 40°C pendant 20 minutes, et arrêtées par addition de 100 µL d'acétonitrile. Parallèlement aux essais enzymatiques, des réactions contrôles ont été menées avec les enzymes préalablement incubées à 98°C pendant 5 minutes (même quantité d'enzymes utilisées).

Les réactions enzymatiques ont été analysées chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à une détection UV (barrette de diode) (**c.f. Protocoles et Méthodologies générales**). Les aires des produits formés ont été calculées grâce au logiciel Empower 3 à la longueur d'onde optimale selon le donneur d'acyle testé (310 nm : *p*-coumarate ; 320 nm : férulate ; 330 nm caféate). La concentration de produit dans l'échantillon a été calculée en « équivalent coumarate-férulate ou caféate » à l'aide d'une courbe étalon préalablement réalisée avec les acides libres. Cette valeur a été convertie en « activité enzymatique » (pmoles de produit/unité de temps/pmoles d'enzymes) dont l'unité est l'unité de temps⁻¹. La quantité de protéines en pmoles a été obtenue par division de la masse utilisée dans l'essai par la masse molaire de la protéine, qui peut être obtenue en utilisant l'outil en ligne suivant : <http://www.pomega.com/a/apps/biomath/?calc=dnaprotein>.

Techniques de microscopie électronique

Afin d'affiner la caractérisation phénotypique des mutants *Ppfht*, nous avons eu recours à la microscopie électronique. J'ai ainsi tiré bénéfice de l'acquisition récente à l'IBMP d'un microscope Zeiss Sigma VP300 équipé d'un module « serial-block-face » permettant l'automatisation des coupes d'échantillons. Ce système peut être opéré en mode balayage sur un échantillon entier ou sur des coupes d'échantillons. Dans cette dernière configuration, même si les électrons sont toujours rétro-diffusés, le rendu de l'image s'apparente davantage à ce qui est obtenu par microscopie à transmission.

Pour obtenir une vision globale du phénotype des mutants *Ppfht*, une observation sur spécimens entiers a été réalisée. Pour ce faire, des gamétophores individuels âgé d'un mois ont été fixés pendant la nuit à 4°C dans une solution contenant 2,5% de glutaraldéhyde (fixation des protéines) et 75 mM de tampon phosphate de potassium pH 7,2. Après lavage, les échantillons ont été post-fixés 2 heures avec 1% de tétraoxyde d'osmium (molécule permettant de donner du contraste en ME) et déshydratés successivement dans de l'éthanol 50%, 70%, 90% et 100% pendant 30 minutes à chaque fois. Les échantillons dans l'éthanol à 100 % ont été séchés selon la méthode du point critique avec du dioxyde de carbone. Les échantillons séchés ont été montés sur des porte-échantillons en aluminium avec des pattes adhésives en carbone et recouverts d'or. Les échantillons ont été observés avec le microscope électronique à balayage Zeiss Sigma VP300 à 10 kV et avec un détecteur d'électrons rétrodiffusé.

Pour l'observation de coupes d'échantillons permettant de visualiser les structures cellulaires, la cuticule en particulier, les gamétophores ont été fixés selon le protocole décrit ci-dessus, puis

selon le protocole « OTO-fixation » décrit dans (Deerinck et al, 2010). Les échantillons ont finalement été inclus dans une résine EPON. Les échantillons inclus ont ensuite été sectionnés à l'aide du module « serial-block-face » puis imagés par balayage avec le microscope Zeiss Sigma VP300 opéré à une tension de 4 kV.

Les expériences de microscopie ont été effectuées par Mathieu Erhardt de la plateforme Bioimage de l'IBMP.

Test de perméabilité au bleu de toluidine

Le test de perméabilité a été effectué par immersion des gamétophores dans une solution de bleu de toluidine à 0.05% pendant deux minutes. Les échantillons ont ensuite été rincés plusieurs fois dans l'eau jusqu'à ce que la solution devienne limpide.

REFERENCES

- Anisimova, M., and Gascuel, O.** (2006). Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Systematic Biology* 55, 539–552.
- Bakan, B., and Marion, D.** (2017). Assembly of the Cutin Polyester: From Cells to Extracellular Cell Walls. *Plants* 6, 57.
- Barrett, P.B., and Harwood, J.L.** (1998). Characterization of fatty acid elongase enzymes from germinating pea seeds. *Phytochemistry* 48, 1295–1304.
- Beisson, F., Li-Beisson, Y., and Pollard, M.** (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 329–337.
- Benveniste, I., Tijet, N., Adas, F., Philipps, G., Salaün, J.-P., and Durst, F.** (1998). CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* Encodes a Cytochrome P450-Dependent Fatty Acid Omega-Hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243, 688–693.
- Bernards, M.A.** (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80, 227–240.
- Bernards, M.A., Lopez, M.L., Zajicek, J., and Lewis, N.G.** (1995). Hydroxycinnamic Acid-derived Polymers Constitute the Polyaromatic Domain of Suberin. *Journal of Biological Chemistry* 270, 7382–7386.
- Boher, P., Serra, O., Soler, M., Molinas, M., and Figueras, M.** (2013). The potato suberin feruloyl transferase FHT which accumulates in the phellogen is induced by wounding and regulated by abscisic and salicylic acids. *Journal of Experimental Botany* 64, 3225–3236.
- Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M.E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T., Quesneville, H., Alseekh, S., Sørensen, I., Lichtenstein, G., et al.** (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics* 46, 1034–1038.
- Buda, G.J., Barnes, W.J., Fich, E.A., Park, S., Yeats, T.H., Zhao, L., Domozych, D.S., and Rose, J.K.C.** (2013). An ATP Binding Cassette Transporter Is Required for Cuticular Wax Deposition and Desiccation Tolerance in the Moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 25, 4000–4013.
- Castresana, J.** (2000). Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17, 540–552.
- Cheng, A.-X., Gou, J.-Y., Yu, X.-H., Yang, H., Fang, X., Chen, X.-Y., and Liu, C.-J.** (2013). Characterization and Ectopic Expression of a *Populus* Hydroxyacid Hydroxycinnamoyltransferase. *Molecular Plant* 6, 1889–1903.
- Cook, M.E., and Graham, L.E.** (1998). Structural Similarities between Surface Layers of Selected Charophycean Algae and Bryophytes and the Cuticles of Vascular Plants. *International Journal of Plant Sciences* 159, 780–787.
- Cosgrove, D.J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 850–861.
- Deerinck, T.J., Bushong, E.A., Thor, A. and Ellisman, M.H.** (2010). A new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis*. 16, 1138-9.

- Domergue, F., and Kosma, D.** (2017). Occurrence and Biosynthesis of Alkyl Hydroxycinnamates in Plant Lipid Barriers. *Plants* 6, 25.
- Eckardt, N.A.** (2008). Role of Xyloglucan in Primary Cell Walls. *The Plant Cell Online* 20, 1421–1422.
- Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.
- Edstam, M.M., Laurila, M., Höglund, A., Raman, A., Dahlström, K.M., Salminen, T.A., Edqvist, J., and Blomqvist, K.** (2014). Characterization of the GPI-anchored lipid transfer proteins in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology and Biochemistry* 75, 55–69.
- Espelie, K.E., Sadek, N.Z., and Kolattukudy, P.E.** (1980). Composition of suberin-associated waxes from the subterranean storage organs of seven plants: Parsnip, carrot, rutabaga, turnip, red beet, sweet potato and potato. *Planta* 148, 468–476.
- Fich, E.A., Segerson, N.A., and Rose, J.K.C.** (2016). The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annual Review of Plant Biology* 67, 207–233.
- Gou, J.-Y., Yu, X.-H., and Liu, C.-J.** (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 18855–18860.
- Graça, J.** (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry* 3:62.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O.** (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59, 307–321.
- Haessler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.-B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., et al.** (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology* 17.
- Haggitt, M.** (2016) Role of Fatty Acid omega-Hydroxylase 1 and Abscisic Acid in Potato Tuber Suberin Formation. Electronic Thesis and Dissertation Repository. 4074. <<https://ir.lib.uwo.ca/etd/4074>>
- Han, J., Clement, J.M., Li, J., King, A., Ng, S., and Jaworski, J.G.** (2010). The Cytochrome P450 CYP86A22 Is a Fatty Acyl-CoA ω -Hydroxylase Essential for Estolide Synthesis in the Stigma of *Petunia hybrida*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 3986–3996.
- Hohe, A., Egener, T., Lucht, J.M., Holtorf, H., Reinhard, C., Schween, G., and Reski, R.** (2004). An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss, *Physcomitrella patens*. *Current Genetics* 44, 339–347.
- Horstmann, V., Huether, C.M., Jost, W., Reski, R., and Decker, E.L.** (2004). Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude. *BMC Biotechnology* 13:4.
- Hunneman, D.H., and Eglinton, G.** (1972). The constituent acids of gymnosperm cutins. *Phytochemistry* 11, 1989–2001.

- Ingram, G., and Nawrath, C.** (2017). The roles of the cuticle in plant development: organ adhesions and beyond. *Journal of Experimental Botany* 68, 5307–5321.
- Isaacson, T., Kosma, D.K., Matas, A.J., Buda, G.J., He, Y., Yu, B., Pravitasari, A., Batteas, J.D., Stark, R.E., Jenks, M.A., et al.** (2009). Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *The Plant Journal* 60, 363–377.
- Jeffree, C. E.** (2006). “The fine structure of the plant cuticle,” in *Biology of the plant cuticle*, Annual Plant Reviews Vol. 23 eds Riederer M., Müller C., editors, (Oxford; Ames, Iowa: Blackwell Pub), 11–125.
- Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., and Lee, Y.** (2013). AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 773–778.
- Kolattukudy, P.E.** (2001). Polyesters in Higher Plants. In *Biopolyesters*, W. Babel, and A. Steinbüchel, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–49.
- Kondo, S., Hori, K., Sasaki-Sekimoto, Y., Kobayashi, A., Kato, T., Yuno-Ohta, N., Nobusawa, T., Ohtaka, K., Shimojima, M., and Ohta, H.** (2016). Primitive Extracellular Lipid Components on the Surface of the Charophytic Alga *Klebsormidium flaccidum* and Their Possible Biosynthetic Pathways as Deduced from the Genome Sequence. *Frontiers in Plant Science* 7:952.
- Koo, A.J.K., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2004). On the Export of Fatty Acids from the Chloroplast. *Journal of Biological Chemistry* 279, 16101–16110.
- Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lu, S., Joubes, J., and Jenks, M.A.** (2009). The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151, 1918–1929.
- Kosma, D.K., Molina, I., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2012). Identification of an *Arabidopsis* Fatty Alcohol:Caffeoyl-Coenzyme A Acyltransferase Required for the Synthesis of Alkyl Hydroxycinnamates in Root Waxes. *Plant Physiology* 160, 237–248.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., Bär, S., Voisin, D., Efremova, N., Franke, R., Schreiber, L., Saedler, H., Métraux, J.P., et al.** (2006). The Epidermis-Specific Extracellular BODYGUARD Controls Cuticle Development and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 18, 321–339.
- Le, S.Q., and Gascuel, O.** (2008). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1307–1320.
- 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: CYP94A5, a new cytochrome P450 from *Nicotiana tabacum*. *European Journal of Biochemistry* 268, 3083–3090.
- Leide, J., Hildebrandt, U., Reussing, K., Riederer, M., and Vogg, G.** (2007). The Developmental Pattern of Tomato Fruit Wax Accumulation and Its Impact on Cuticular Transpiration Barrier Properties: Effects of a Deficiency in a beta-Ketoacyl-Coenzyme A Synthase (LeCER6). *Plant Physiology* 144, 1667–1679.

- Li, Y., Beisson, F., Koo, A.J., Molina, I., Pollard, M., and Ohlrogge, J.** (2007a). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 18339–18344.
- Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J., and Pollard, M.** (2007b). Monoacylglycerols Are Components of Root Waxes and Can Be Produced in the Aerial Cuticle by Ectopic Expression of a Suberin-Associated Acyltransferase. *Plant Physiology* *144*, 1267–1277.
- Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J., and Beisson, F.** (2009). Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 22008–22013.
- Li-Beisson, Y., Neunzig, J., Lee, Y., and Philippar, K.** (2017). Plant membrane-protein mediated intracellular traffic of fatty acids and acyl lipids. *Current Opinion in Plant Biology* *40*, 138–146.
- Lopez-Obando, M., Hoffmann, B., Gery, C., Guyon-Debast, A., Teoule, E., Rameau, C., Bonhomme, S., and Nogue, F.** (2016). Simple and Efficient Targeting of Multiple Genes Through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* *6*, 3647–3653.
- Lü, S., Zhao, H., Des Marais, D.L., Parsons, E.P., Wen, X., Xu, X., Bangarusamy, D.K., Wang, G., Rowland, O., Juenger, T., et al.** (2012). *Arabidopsis* ECERIFERUM9 Involvement in Cuticle Formation and Maintenance of Plant Water Status. *Plant Physiology* *159*, 930–944.
- Molina, I., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2009). Identification of an *Arabidopsis* Feruloyl-Coenzyme A Transferase Required for Suberin Synthesis. *Plant Physiology* *151*, 1317–1328.
- Moller, I., Sørensen, I., Bernal, A.J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., et al.** (2007). High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays: Glycan microarrays for plant cell-wall analysis. *The Plant Journal* *50*, 1118–1128.
- de O. Buanafina, M.M.** (2009). Feruloylation in Grasses: Current and Future Perspectives. *Molecular Plant* *2*, 861–872.
- de Oliveira, D.M., Finger-Teixeira, A., Rodrigues Mota, T., Salvador, V.H., Moreira-Vilar, F.C., Correa Molinari, H.B., Craig Mitchell, R.A., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O., and Dantas dos Santos, W.** (2015). Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal* *13*, 1224–1232.
- Orgell, W.H.** (1955). The Isolation of Plant Cuticle with Pectic Enzymes. *Plant Physiology* *30*, 78–80.
- Park, J.-J., Jin, P., Yoon, J., Yang, J.-I., Jeong, H.J., Ranathunge, K., Schreiber, L., Franke, R., Lee, I.-J., and An, G.** (2010). Mutation in Wilted Dwarf and Lethal 1 (WDL1) causes abnormal cuticle formation and rapid water loss in rice. *Plant Molecular Biology* *74*, 91–103.
- Peña, M.J., Darvill, A.G., Eberhard, S., York, W.S., and O'Neill, M.A.** (2008). Moss and liverwort xyloglucans contain galacturonic acid and are structurally distinct from the xyloglucans synthesized by hornworts and vascular plants. *Glycobiology* *18*, 891–904.
- Philippe, G., Gaillard, C., Petit, J., Geneix, N., Dalgalarrodo, M., Bres, C., Mauxion, J.-P., Franke, R., Rothan, C., Schreiber, L., et al.** (2016). Ester Cross-Link Profiling of the

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

Pineau, E., Xu, L., Renault, H., Trolet, A., Navrot, N., Ullmann, P., Légeret, B., Verdier, G., Beisson, F., and Pinot, F. (2017). *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers. *New Phytologist* 215, 173–186.

Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J.B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* 13, 236–246.

Popper, Z.A., and Fry, S.C. (2003). Primary Cell Wall Composition of Bryophytes and Charophytes. *Annals of Botany* 91, 1–12.

Rautengarten, C., Ebert, B., Ouellet, M., Nafisi, M., Baidoo, E.E.K., Benke, P., Stranne, M., Mukhopadhyay, A., Keasling, J.D., Sakuragi, Y., et al. (2012). *Arabidopsis* Deficient in Cutin Ferulate Encodes a Transferase Required for Feruloylation of -Hydroxy Fatty Acids in Cutin Polyester. *Plant Physiology* 158, 654–665.

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

Rensing, S.A., Kissel, C., Laj, C., Ninnemann, U.S., Richter, T.O., and Cortijo, E. (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319, 60–64.

Reski, R., and Abel, W.O. (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354–358.

Rother, S., Hadeler, B., Orsini, J.M., Abel, W.O., and Reski, R. (1994). Fate of a Mutant Macrochloroplast in Somatic Hybrids. *Journal of Plant Physiology* 143, 72–77.

Sauveplane, V., Kandel, S., Kastner, P.-E., Ehlting, J., Compagnon, V., Werck-Reichhart, D., and Pinot, F. (2009). *Arabidopsis thaliana* CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants: CYP77A4, an epoxy fatty acid-forming enzyme. *FEBS Journal* 276, 719–735.

Schreiber, L. (2010). Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* 15, 546–553.

Serra, O., Hohn, C., Franke, R., Prat, S., Molinas, M., and Figueras, M. (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm: FHT function in potato periderm. *The Plant Journal* 62, 277–290.

Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P., Métraux, J.-P., and Nawrath, C. (2000). Transgenic *Arabidopsis* Plants Expressing a Fungal Cutinase Show Alterations in the Structure and Properties of the Cuticle and Postgenital Organ Fusions. *The Plant Cell* 12, 721–738.

Takahashi, K., Shimada, T., Kondo, M., Tamai, A., Mori, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2010). Ectopic Expression of an Esterase, Which is a Candidate for the Unidentified Plant Cutinase, Causes Cuticular Defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 51, 123–131.

- Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., and Yephremov, A.** (2001). Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid -hydroxylation in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 9694–9699.
- Wunderling, A., Ripper, D., Barra-Jimenez, A., Mahn, S., Sajak, K., Targem, M.B., and Ragni, L.** (2018). A molecular framework to study periderm formation in Arabidopsis. *New Phytologist* 219, 216–229.
- Yang, W., Simpson, J.P., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M., and Ohlrogge, J.B.** (2012). A Land-Plant-Specific Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Family in Arabidopsis: Substrate Specificity, sn-2 Preference, and Evolution. *Plant Physiology* 160, 638–652.
- Yeats, T.H., and Rose, J.K.C.** (2013). The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology* 163, 5–20.
- Yeats, T.H., Martin, L.B.B., Viart, H.M.-F., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., Matas, A.J., Buda, G.J., Domozych, D.S., Clausen, M.H., et al.** (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology* 8, 609–611.
- Yeats, T.H., Huang, W., Chatterjee, S., Viart, H.M.-F., Clausen, M.H., Stark, R.E., and Rose, J.K.C.** (2014). Tomato Cutin Deficient 1 (CD1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *The Plant Journal* 77, 667–675.

Chapitre 3:

Exploration et ingénierie de la voie des flavonoïdes chez *Physcomitrella patens*

Lucie Kriegshauser¹, Agnès Lesot¹, Loya Schoeffel¹, Arthur Muller¹, Desirée Gütle², Ralf Reski^{2,3}, Danièle Werck-Reichhart¹ and Hugues Renault¹

¹Institute of Plant Molecular Biology | CNRS, University of Strasbourg, France

²Plant Biotechnology, Faculty of Biology, University of Freiburg, Germany

³BIOSS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg, Germany

Sous chapitre I

Etude de la voie des flavonoïdes chez *P. patens*

INTRODUCTION

Les flavonoïdes sont des molécules cycliques polyhydroxylées et de puissants antioxydants capables de réduire certaines espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'ion superoxyde ou l'oxygène singulet, atténuant ainsi leurs effets délétères sur les structures cellulaires (Pietta, 2000 ; Zhang et al, 2012) (**Figure 1**). Ils sont également chélateurs d'ions métalliques divalents dont l'excès favorise l'apparition de ROS (Yu et al, 2008 ; Liu-Smith and Meyskens, 2016).

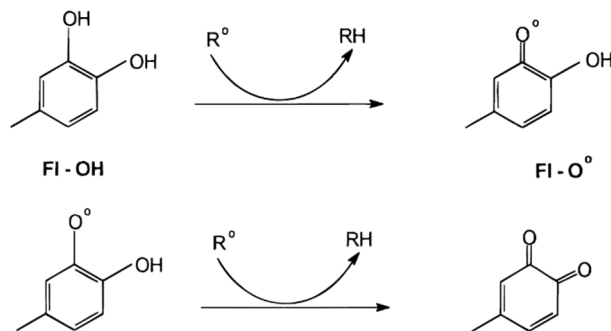


Figure 1: Piégeage des ROS par les flavonoïdes (Pietta, 2000). Une des fonctions hydroxyle du cycle B transfère un proton à l'espèce oxygénée réactive R°. Les électrons du cycle se délocalisent et se réarrangent ensuite.

Les rôles physiologiques des flavonoïdes chez les plantes

Chez les plantes, les flavonoïdes jouent le rôle d'antioxydants et d'écrans UV (Carletti et al, 2014). En effet, la teneur en flavonoïdes augmente après un stress UV, par exemple chez *Brassica napus* (Wilson et al, 1998) ou chez le maïs (Casati et al, 2011). De plus, il a été montré que des mutants d'*A. thaliana* ne produisant plus de flavonoïdes étaient plus sensibles aux UV-B que les plantes sauvages (Landry et al, 1995).

Les flavonoïdes impactent aussi directement ou indirectement la signalisation hormonale. Chez *A. thaliana*, le kaempferol-3-*O*-rhamnoside-7-*O*-rhamnoside est un flavonoïde diglycosylé inhibiteur du transport polaire de l'auxine (Yin et al, 2014). Chez le soja, les isoflavonoïdes sont essentiels à l'établissement d'une symbiose avec la bactérie *Bradyrhizobium japonicum*, notamment par l'induction des gènes *nod* (Subramanian et al, 2006 ; Kape et al, 1992).

En raison de leurs caractéristiques intéressantes, les flavonoïdes ont été largement étudiés d'une part pour identifier de nouvelles sources de flavonoïdes végétaux en recherche appliquée, mais

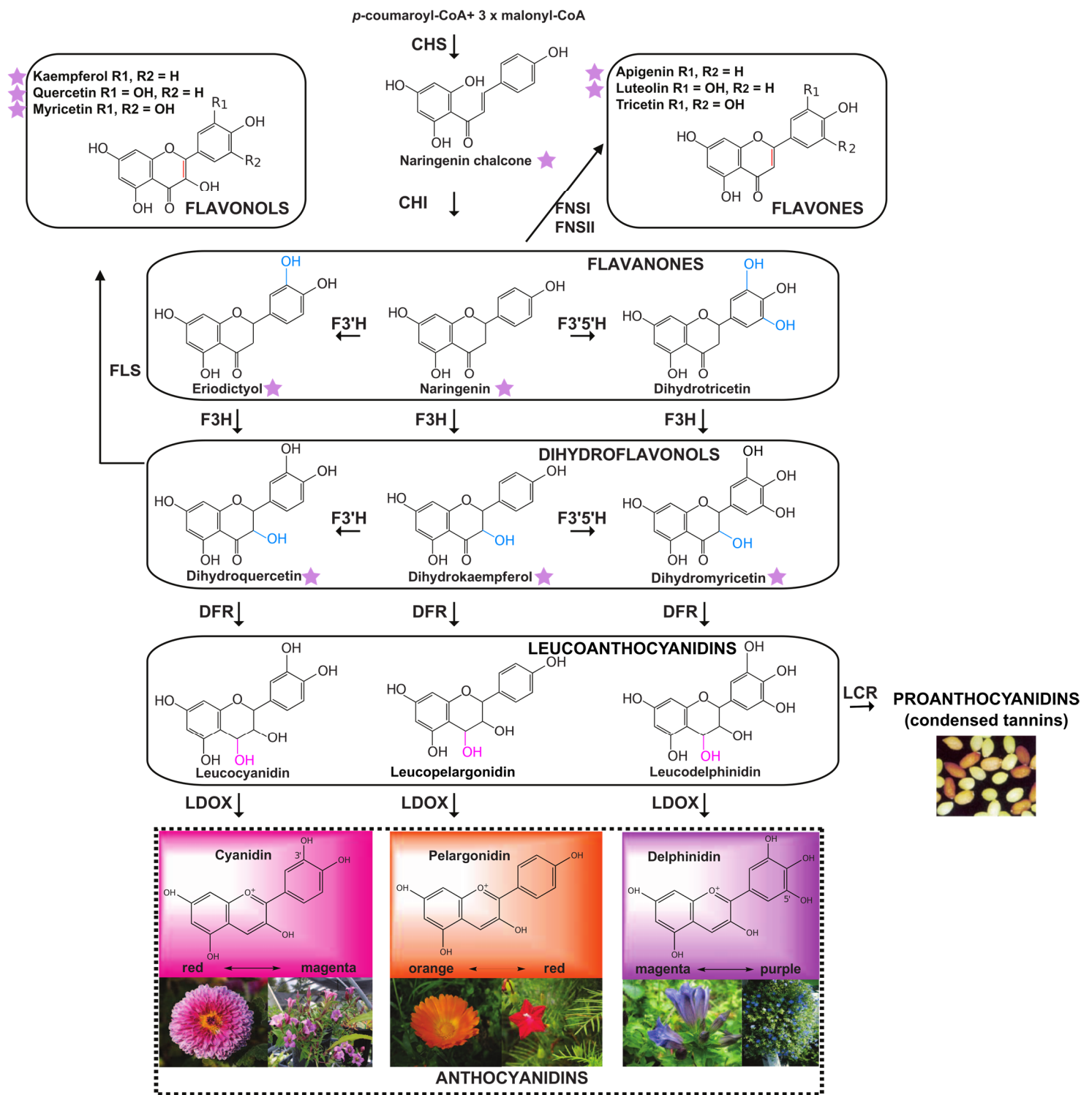


Figure 2 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes chez les plantes.

CHS : chalcone synthase; CHI: chalcone isomérase; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H: flavonoid 3',5'-hydroxylase; F3H: flavanone 3-hydroxylase; DFR: dihydroflavonol reductase; LDOX: leucoanthocyanidin dioxygenase; FLS: flavonol synthase; FNSI et FNSII: flavone synthase; LCR: leucocyanidin reductase. Les étoiles correspondent aux standards disponibles au laboratoire. Cette figure est adaptée de Falcone Ferreyra et al, 2012.

aussi pour mieux comprendre leurs effets physiologiques au niveau de la plante. L'élucidation de leur voie de biosynthèse permet par ailleurs des approches d'ingénierie métabolique, par exemple pour modifier la couleur des fleurs (Forkmann and Martens, 2001), ou la teneur en antioxydants de certains fruits comme la tomate (Muir et al, 2001 ; Verhoeven et al, 2002).

La voie de biosynthèse des flavonoïdes

La voie de biosynthèse des flavonoïdes a été en grande partie caractérisée (**Figure 2**), en particulier chez *A. thaliana*, *Zea mays* ou encore *Vitis vinifera* (Saito et al, 2013, Sparvoli et al, 1994). Elle est initiée par la chalcone synthase (CHS), enzyme responsable de la condensation de trois molécules de malonyl-CoA et d'une molécule de *p*-coumaroyl-CoA, conduisant à la formation d'une chalcone à 15 atomes de carbone (Austin and Noel, 2003). La voie classique conduit à la formation d'une 6'-hydroxychalcone, couramment appelée naringénine chalcone. Néanmoins, il existe chez les légumineuses, et en particulier le soja, des dérivés de 6'-deoxychalcone, aussi appelée isoliquirigétine (Welle et al, 1991). Cette chalcone particulière est à l'origine des isoflavones.

La chalcone isomérase (CHI) contribue ensuite à la cyclisation des chalcones, produisant une flavanone nommée naringénine (Nishihara et al, 2005). L'oxydation de ce dernier composé par la flavanone 3-hydroxylase (F3H), une 2-oxoglutarate-dépendante dioxygénase (ODD), génère le dihydrokaempférol (Cheng et al, 2014). Ce dernier peut être ensuite hydroxylé en position 3' ou 5' du cycle B, par la flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) ou flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H), produisant, respectivement, la dihydroquercétine ou la dihydromyricétine. Ces deux flavonoïdes hydroxylases sont des cytochromes P450 appartenant à la famille CYP75. Les membres de la famille CYP75B sont répandus chez de nombreuses espèces végétales telles que *A. thaliana*, le riz ou le pin. Certaines espèces ont en plus des CYP75A comme le pétunia, la vigne ou la pervenche de madagascar et sont donc capables de synthétiser d'autres types d'anthocyanes (Tanaka and Brugliera, 2013). Deux membres sont caractérisés : le CYP75B1 d'*A. thaliana* (F3'H) et le CYP75A1 du pétunia (F3'5'H) (Schoenbohm et al, 2000 ; Holton et al, 1993a). La naringénine peut également être directement hydroxylée par les F3'H ou F3'5'H pour donner, respectivement, l'ériodictyol et la dihydrotricétine. Ces derniers sont à nouveau hydroxylés sur le cycle C par la F3H en dihydroquercétine et dihydromyricétine. Les trois dihydroflavonols ainsi synthétisés – dihydrokaempférol, dihydroquercétine et dihydromyricétine – sont ensuite transformés en leucoanthocyanidines (pigments colorés mais instables) par la dihydroflavonol reductase (DFR). La DFR convertit la dihydroquercétine, le

dihydrokaempférol et la dihydromyricétine en leucoanthocyanidine, leucopélargonidine et leucodelphinidine respectivement. Par la suite, la leucoanthocyanidin dioxygénase LDOX (ODD) catalyse l'oxydation des leucoanthocyanidines en anthocyanidines. La dernière étape de la production des anthocyanes implique la glycosylation des anthocyanidines par l'enzyme UDP-glucose: flavonoïde 3-*O*-glucosyl transférase (UFGT) (Petrucci et al, 2013). Ces anthocyanes sont des composés stables et colorés stockés dans la vacuole. Selon le degré d'hydroxylation du cycle B et du pH vacuolaire, chaque anthocyane est associée à une couleur propre : cyanidine (monohydroxylée, rouge-magenta), pélargonidine (dihydroxylée, orange) et delphinidine (trihydroxylée, violet-mauve) (Falcone Ferreyra et al, 2012 ; Tanaka et Brugliera, 2013). Cette coloration est impliquée dans l'attraction spécifique de pollinisateurs (Bradshaw and Schemske, 2003).

Un degré supplémentaire de diversité est apporté par l'action d'enzymes capable d'introduire une double liaison dans le cycle C des flavonoïdes. C'est notamment le cas de la flavonol synthase (FLS) qui produit des flavonols tels que la quercétine, le kaempférol ou la myricétine à partir de dihydroflavonols (**Figure 2**). Le même type de réaction est également effectué par les flavone synthases FNSI et FNSII à partir des flavanones. La FNSII est un CYP93B, répandue chez toutes les plantes produisant des flavones, tandis que la FNSI est une ODD et n'est connue que chez le riz et quelques espèces de la famille des Apiacées (Wang et al, 2018).

Les leucoanthocyanidines peuvent être transformées en proanthocyanidines par la leucoanthocyanidine reductase (LCR). Ces dernières peuvent ensuite être polymérisées pour former des tanins condensés, responsables de la coloration brune du manteau de la graine (Debeaujon et al, 2001 ; Debeaujon et al, 2003).

La voie de biosynthèse des flavonoïdes est principalement régulée par une association de facteurs de transcription (FT) possédant des domaines MYB ou des domaines « basic helix-loop-helix » (bHLH) avec la protéine WD40 (Koes et al, 2005). Les facteurs de transcription MYB (myeloblastosis) existent chez tous les eucaryotes et représentent la famille de FT la plus diversifiée chez les plantes (Riechmann et al, 2000). Parmi les trois sous-familles de MYB (MYB-like ; MYB-R2R3 et MYB3R), MYB-R2R3 est la plus répandue chez *A. thaliana* (Stracke et al, 2001). Il existe selon les espèces végétales plusieurs types de FT MYB et bHLH, chacun déterminant l'expression spatiale et temporelle des gènes de la voie des flavonoïdes (Falcone Ferreyra et al, 2012). Par exemple, MYB12, MYB11 et MYB111 régulent l'expression spatiale de *FLS1* chez *A. thaliana*, tandis que les MYB PAP1 ou PAP2 activent les gènes menant à la biosynthèse d'anthocyanes (Stracke et al, 2007 ; Feller et al, 2011). De

nombreux facteurs de transcription MYB ont déjà été caractérisés, notamment chez *Vitis vinifera* où ils régulent la production différentielle d'anthocyanes au cours du développement ou de la maturation des baies de raisin (Deluc et al, 2008 ; Falcone Ferreyra et al, 2012).

Les flavonoïdes chez les plantes terrestres basales

Il a été longtemps admis que les flavonoïdes étaient une innovation spécifique des plantes terrestres, permettant une adaptation aux irradiations UV. Cependant, il existe des homologues de *CHS* chez la chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (May et al, 2008) ou *CHI* et *DFR* chez l'algue brune *Ectocarpus siliculosus* (Cock et al, 2010). De plus, une analyse métabolomique par spectrométrie de masse a démontré que des espèces d'algues rouges, brunes et vertes synthétisent de l'apigénine et parfois même d'autres flavonoïdes (Goiris et al, 2014). Chez les bryophytes, certaines études montrent la présence de flavonoïdes. Le genre *Plagiomnium* contient des glycosides de flavones (apigénine, lutéoline) (Harris, 2009). Chez *Marchantia polymorpha*, des dérivés glucuronides d'apigénine et de lutéoline ont été identifiés par chromatographie sur couche mince (Markham and Porter, 1974). La production de ces composés est d'ailleurs sous le contrôle du facteur de transcription MpMYB14, dont la surexpression conduit à une augmentation de la production de flavones et d'anthocyanidines rouges appelées riccionidine (Albert et al, 2018). Chez les 61 espèces de bryophytes sauvages récoltées dans la province de Zhejiang en Chine, on trouve un contenu total en flavonoïdes compris entre 1.8 et 22.3 mg/g de masse sèche (Wang et al, 2017b). La lycophyte *Selaginella uncinata*, par exemple, synthétise un dérivé de flavone particulier appelé uncinataflavone (Zou et al, 2013).

Ces résultats sont confortés par la caractérisation de gènes de la voie des flavonoïdes chez des bryophytes. Il existe chez *Marchantia paleacea* un gène *CHS* qui est photorégulé comme chez les plantes vasculaires. La protéine correspondante produit de la naringénine chalcone *in vitro* (Harashima et al, 2004, Yu et al, 2015). La même activité a été observée pour une *CHS* de l'hépatique *Plagiochasma appendiculatum* (Yu et al, 2015).

Chez *P. patens*, 17 gènes appartenant à la famille des *CHS* ont été identifiés sur la base de résidus protéiques conservés : Cys¹⁷⁰-His³⁰⁹-Asn³⁴², les sites actifs Phe²²¹ et Phe²⁷¹, et la boucle GFGPG (Koduri et al, 2010). Parmi ces gènes, Pp3c24_13120 code pour une enzyme nommée PpCHS1 capable de produire de la naringénine chalcone *in vitro* (Jiang et al, 2006).

La famille des *CHS* appartient à la superfamille des polykétides synthases de type III (PKS de type III). Les autres classes de PKS de type III sont souvent nommées *CHS-like* (Austin et

Noel, 2003). Il s'agit par exemple des stilbenes synthases (STS), qui utilisent également du *p*-coumaroyl-CoA et trois molécules de malonyl-CoA pour produire du resvératrol, un stilbène (Yu et al, 2012). D'autres PKS de type III catalysent la condensation d'un acide gras hydroxylé activé par du Coenzyme A et des molécules de malonyl-CoA pour former la tétrakétide- α -pyrone, précurseur de l'écotine chez *A. thaliana* ou *P. patens* (Kim et al, 2010; Daku et al, 2016).

La caractérisation *in vitro* de protéines CHI chez *Selaginella moellendorffii* et *Marchantia paleacea* a montré que ces dernières sont capables de métaboliser la naringénine chalcone (CHI de type I) et l'isoliquiritigénine, substrat des CHI de légumineuses (CHI de type II) (Cheng et al, 2018).

Des analyses transcriptomiques ont montré que l'expression des homologues des gènes *PAL*, *4CL*, *CHS* et *CHI*, est induite chez *P. patens* après exposition aux UV-B, suggérant ainsi la présence d'une voie des flavonoïdes (Wolf et al, 2010). Cependant, aucune étude n'a pu mettre en évidence la présence de flavonoïdes chez *P. patens*.

Objectifs :

Grâce à leur pouvoir antioxydant et écran UV, les flavonoïdes ont pu jouer un rôle déterminant dans l'adaptation des premières plantes terrestres. Bien que quelques études montrent la présence de flavonoïdes chez les bryophytes, la connaissance de ce métabolisme reste limitée, notamment au niveau de la caractérisation des enzymes. En effet, si les deux étapes initiatrices *CHS* et *CHI* ont été étudiées *in vitro* chez quelques bryophytes, aucune étude n'a été réalisée sur les autres étapes de la voie (*F3H*, *CYP75*, *DFR*, *LDOX*, *FLS*, *FNSII*). Chez *P. patens*, seule une protéine *CHS* a été caractérisée *in vitro* (Jiang et al, 2006).

Ce chapitre a pour objectif d'étudier la voie des flavonoïdes chez *P. patens* afin d'apporter des éléments de réponses aux questions suivantes :

- des flavonoïdes sont-ils présents chez *P. patens* ?
- Si oui : quelle est leur diversité structurale ?
- Des homologues de la voie des flavonoïdes sont-ils présents et fonctionnels ?

RESULTATS

Recherche de flavonoïdes par UPLC-MS/MS dans les extraits de *P. patens*

Une première approche a consisté à analyser le contenu métabolique de *P. patens* par spectrométrie de masse. Les extraits méthanoliques ont été analysés par UPLC-MS/MS en utilisant un mode de détection MRM préalablement développé sur les flavonoïdes standards disponibles au laboratoire (marqués d'une étoile dans la **Figure 2**). Cette analyse n'a malheureusement pas permis de détecter de flavonoïdes dans les conditions utilisées. Ce résultat peut être expliqué par l'absence de flavonoïdes chez *P. patens*, par une absence dans nos conditions de culture, ou par une concentration des molécules dans l'échantillon en dessous du seuil de détection du système UPLC-MS/MS utilisé. Des analyses sont en cours, utilisant l'UHPLC-EVOQ (Brüker) qui devrait apporter une sensibilité en moyenne dix fois supérieure au spectromètre de masse (Waters) utilisé précédemment.

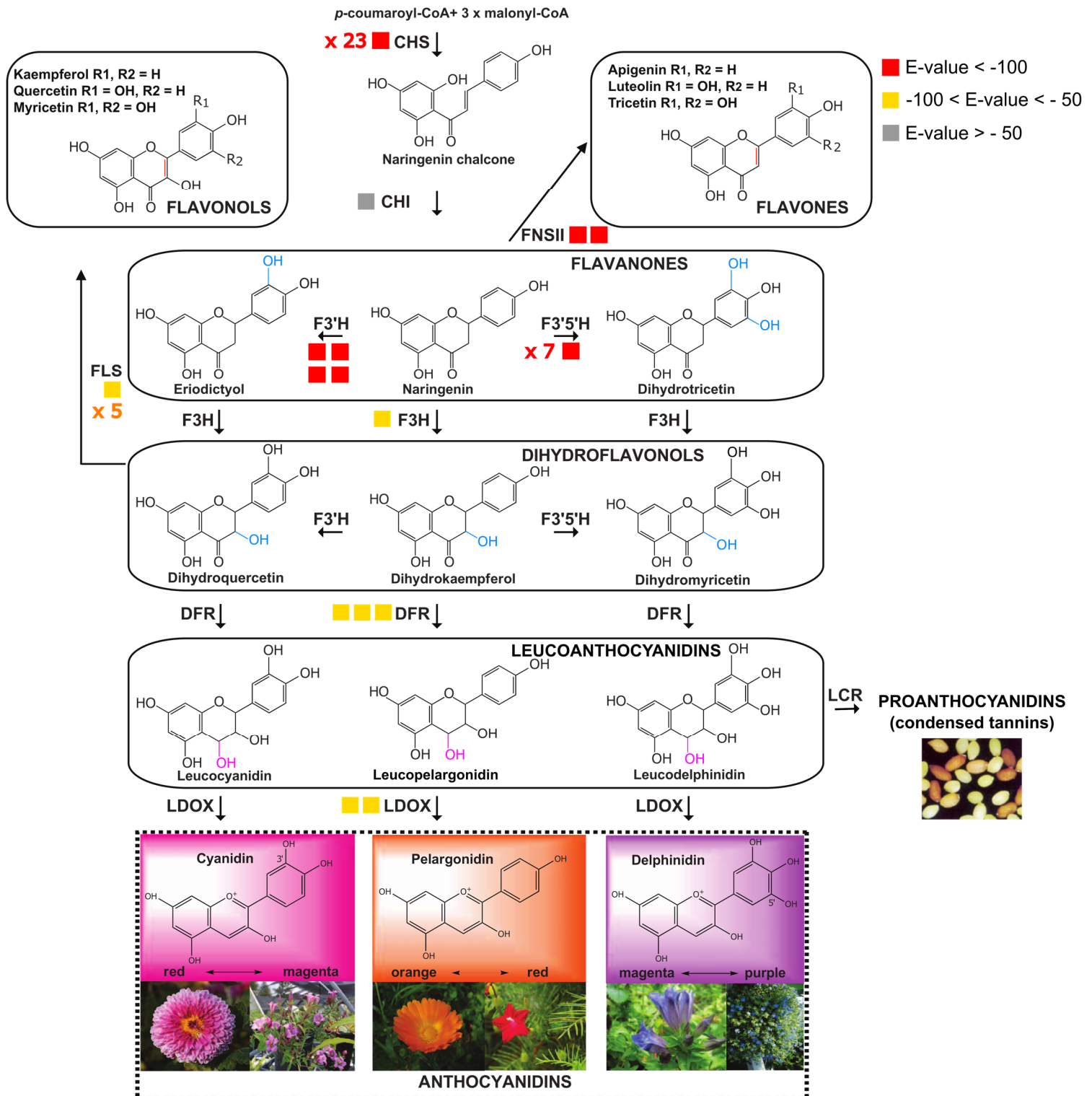
L'approche métabolomique n'ayant pas pour le moment pu démontrer l'existence d'une voie des flavonoïdes chez *P. patens*, nous avons choisi une approche génétique, dans un premier temps par la recherche de gènes homologues.

Identification de gènes homologues de la voie des flavonoïdes chez *P. patens*

Les gènes caractérisés de la voie des flavonoïdes chez *A. thaliana* (*CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*, *DFR*, *LDOX*), *Petunia hybrida* (F3'5'H), et *Scutellaria baicalensis* (FNSII) (Saito et al, 2013 ; Holton et al, 1993b ; Zhao et al, 2016) ont été utilisés comme référence pour rechercher des gènes homologues chez *P. patens*. Un BLASTp des séquences protéiques correspondantes contre le protéome de *P. patens* nous a permis d'obtenir une liste de protéines intéressantes avec une E-value inférieure à E-100. Les gènes correspondants sont symbolisés par des carrés rouges dans la **Figure 3**.

Nous avons identifié un nombre important de gènes homologues de *CHS*, comme décrit précédemment par Koduri et al (2010). Ces protéines partagent une identité de séquence comprise entre 59 et 64 % avec la CHS d'*A. thaliana* (*AT5G13930*).

En revanche, aucun gène homologue satisfaisant n'a été trouvé pour l'étape *CHI*, catalysant la cyclisation des chalcones. Le meilleur hit obtenu avec la *CHI* d'*Arabidopsis* (*AT3G55120*) ne partage que 29 % d'identité de séquence avec cette dernière.



→ **LCR** **PROANTHOCYANIDINS**
(condensed tannins)

FLS ■ ■ ■ x 5

↑

■ E-value < -100
 ■ -100 < E-value < -50
 ■ E-value > -50

Figure 3 : Recherche de gènes homologues chez *P. patens* par BLASTp des séquences protéiques caractérisées suivantes : AT5G13930.1 pour CHS ; AT3G55120.1 pour CHI ; AT3G51240.1 pour F3H ; AT5G07990.1 pour F3'H ; AT5G42800.1 pour DFR ; AT4G22880.1 pour LDOX pour *A. thaliana*, ACV65037.1 pour FNSII chez *S. baicalensis* et P48418.1 pour F3'5'H chez *P. hybrida*. Les carrés correspondent aux gènes homologues. Les couleurs dépendent des E-value correspondantes : les rouges sont considérés comme les meilleurs gènes candidats. Cette figure est adaptée de Falcone Ferreyra et al, 2012.

Enfin, nous avons mis en évidence 4 gènes candidats intéressants pour l'étape F3'H (CYP75B1), qui catalyse l'hydroxylation en 3' de la naringénine notamment. Pour l'étape F3'5'H (CYP75A1 du *Pétunia*), nous avons obtenu 7 candidats intéressants, dont les deux premiers hits sont les mêmes que ceux obtenus pour CYP75B1. Ces deux mêmes candidats sont également obtenus en BLASTp avec la séquence de FNSII. Pour les étapes F3H, LDOX, et FLS, le premier hit obtenu est le même, et présente la meilleure identité de séquence avec AtF3H (40,8% contre 37,8% avec AtFLS et 34,2% avec AtLDOX).

En résumé, la recherche de gènes homologues a permis d'identifier :

- 23 gènes de *CHS* avec une forte identité de séquence protéique avec AtCHS.
- 4 gènes pour F3'H, dont deux sont communs avec F3'5'H et FNSII. Le BLASTp de ces 4 gènes contre le protéome d'*A. thaliana* renvoie comme meilleur homologue AtCYP75B1. Ils ont donc été considérés comme des homologues de CYP75B1 en première approche.
- 1 gène commun à LDOX, FLS et F3H dont le BLASTp réciproque permet d'obtenir AT4G16330, qui code une protéine de la même famille des oxidoreductases dioxygénases. Les protéines LDOX, FLS et F3H arrivent respectivement en 11, 12 et 13^{ème} rang de ce BLAST réciproque.
- 1 gène pour l'étape CHI. En BLASTp réciproque, on obtient le meilleur score pour AT5G05270, une CHI-like connue comme « enhancer » de la voie des flavonoïdes, mais qui n'a pas d'activité de cyclisation des chalcones (Jiang et al, 2015). AtCHI (AT3G55120) est obtenu avec le second meilleur score.

Pour élucider la fonction de ces gènes, trois démarches complémentaires peuvent être mises en œuvre :

1. Étudier les mutants des gènes chez *P. patens*
2. Tester l'activité des protéines recombinantes *in vitro*
3. Complémenter des mutants d'*A. thaliana* avec les gènes de *P. patens*

En raison du grand nombre de gènes homologues identifiés et de la disponibilité au laboratoire de mutants d'*A. thaliana* pour toutes les étapes ciblées, nous avons choisi l'approche génétique de transcomplémentation avec les gènes de *P. patens*.

Arabidopsis thaliana, un excellent modèle pour étudier la voie des flavonoïdes

La collection de mutants d'insertion ADN-T GABI-KAT d'*A. thaliana* comprend plusieurs mutants de la voie des flavonoïdes nommés « *transparent testa* » (*tt*) en raison de la couleur de leurs graines (Kleinboelting et al, 2012). En effet, étant affectés dans la production de flavonoïdes et plus particulièrement de proanthocyanidines, leurs graines sont plus claires que celles des plantes sauvages. Ces mutants *tt* (*tt4*: *AtCHS* ; *tt5* : *AtCHI* ; *tt6* : *AtF3H* ; *tt7*: *AtF3'H*) accumulent des flavonoïdes différents en fonction du locus muté (Peer et al, 2001) (**Tableau 1**).

Lignée	Enzyme mutée	Flavonoïde accumulé	Couleur des graines <i>tt</i>	Couleur des graines Col-0
TT4	AtCHS	Non détecté	Jaune	Marron
TT5	AtCHI	Naringénine chalcone	Jaune	Marron
TT6	AtF3H	Naringénine	Orange	Marron
TT7	AtF3'H	Kaempférol	Marron	Marron

Tableau 1 : Caractéristiques des lignées « *transparent testa* » d'*A. thaliana* : enzymes déficientes, flavonoïdes aglycones accumulés (Peer et al, 2001) et couleurs des graines correspondantes.

La complémentation de mutants *tt* par des gènes homologues de même fonction permet donc de restaurer la voie des flavonoïdes, et par conséquent de restaurer la couleur des graines des sauvages Col-0. L'observation des graines permet donc un repérage rapide des lignées ayant restauré la voie des flavonoïdes. La complémentation de mutants *tt* a été utilisée pour la caractérisation de plusieurs enzymes comme par exemple la F3'H de pomme (Han et al, 2010), ou les CHS et CHI de maïs (Dong et al, 2001).

Outre la couleur des graines, les mutants *tt* ont un profil métabolique différent du Col-0. *A. thaliana* accumule naturellement un dérivé de cyanidine dans les feuilles (Bloor and Abrahams, 2002 ; Kovinich et al, 2015), et également le kaempférol 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-rhamnoside (K1), nommé kaempféritrine (Yin et al, 2014 ; Tohge et al, 2005) (**Figure 4**). Le composé K1 est un composé qui peut être utilisé pour discriminer une plante sauvage des mutants *tt4*, *tt5* et *tt6* qui ne synthétisent plus de kaempférol.

Transformation des mutants *transparent testa* d'*A. thaliana*

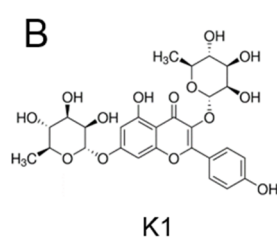
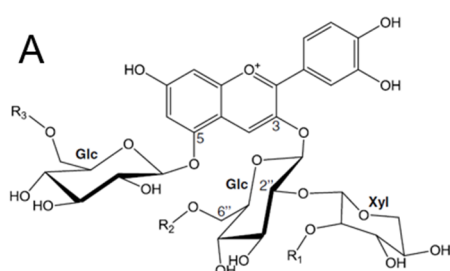


Figure 4 : Flavonoïdes et anthocyanes accumulés dans les feuilles d'*A. thaliana*. A : Anthocyanine accumulée dans les feuilles d'*A. thaliana* Col-0 ; R1= -sinapoyl, R2= -*p*-coumaroyl-glucose, R3= -malonyl (Kovinich et al, 2015) B : Structure de la kaempféritrine = kaempferol 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-rhamnoside (Cas 482-38-2, Sigma).

Nous avons choisi de nous concentrer en priorité sur les étapes du début de la voie des flavonoïdes, c'est-à-dire les enzymes CHS, CHI, F3H et F3'H. Les gènes de *P. patens* choisis pour la complémententation sont les uniques candidats pour les étapes CHI et F3H et les quatre candidats pour l'étape F3'H.

Parmi les 23 CHS candidates, plusieurs étaient des gènes dupliqués. Les données d'expression (RNAseq) disponibles sur Phytozome ont permis d'éliminer les copies qui n'étaient pas ou très peu exprimées. Enfin, la recherche de sites conservés des CHS au niveau des séquences protéiques (Koduri et al, 2010) a permis de sélectionner 9 candidats. Leurs séquences codantes étant très proches, il était impossible de concevoir des amorces spécifiques à chacun de ces gènes. Pour 8 d'entre eux, les séquences codantes ont été amplifiées à partir d'ADNg car ces gènes ne contenaient pas d'introns. De plus, des amorces ont été choisies sur des séquences non codantes au-delà des 5' et 3'UTR. Finalement, 4 amplicons ont pu être clonés. *Pp3c2_36290* contenant des introns, il a été amplifié à partir d'ADNc de *P. patens*.

Le numéro d'accèsion des gènes homologues, ainsi que les mutants *tt* transformés correspondants sont résumés dans le **Tableau 2**. La séquence codante de chaque gène de *P. patens* a été introduite dans un vecteur binaire, sous le contrôle du promoteur du gène codant la cinnamate-4-hydroxylase d'*A. thaliana* (C4H) qui catalyse une étape précoce et obligatoire de la voie des phénylpropanoïdes. Nous avons généré en parallèle des lignées contrôles transformées pour chaque mutant avec le gène sauvage correspondant d'*A. thaliana* : *AtCHS* dans *tt4*, *AtCHI* dans *tt5*, *AtF3H* dans *tt6* et *AtCYP75B1* dans *tt7*. Ces gènes sont censés compléter la fonction manquante et restaurer la voie des flavonoïdes, validant ainsi notre système expérimental.

Les lignées transformées ont été sélectionnées selon le protocole décrit dans le **Matériel et Méthodes**, visant à obtenir idéalement deux lignées à insertion unique et homozygotes pour chaque gène introduit (**Tableau 2**). Au total, 30 lignées de plantes ont été générées. Toutes présentent une insertion unique de l'ADN-T, sauf la lignée *AtF3H* #1. En revanche, il a été plus difficile d'obtenir des lignées homozygotes pour tous les génotypes dans le temps imparti. En effet, 10 plantes à insertion unique (homozygote et hétérozygote) étaient repiquées en terre afin de générer des graines T3, plus tard sélectionnées sur milieu contenant du glufosinate (agent sélectif du Basta®). Si 100% des plantules étaient résistantes, alors elles étaient issues d'une plante homozygote.

Complémentation mutant *tt4*

Gène	Identifiant	#lignée	Insertion unique	Homozygote	Génération
<i>AtCHS</i>	T2-1-2	#1	✓		T3
<i>AtCHS</i>	T2-3-2	#2	✓		T3
<i>Pp3c24_13120</i>	T2-2-1	#1	✓		T3
<i>Pp3c24_13120</i>	T2-1-3	#2	✓	✓	T3
<i>Pp3c2_32400</i>	T2-2-1	#1	✓		T3
<i>Pp3c2_32400</i>	T2-8-2	#2	✓	✓	T3
<i>Pp3c19_6330</i>	T2-3-5	#1	✓		T3
<i>Pp3c19_6330</i>	T2-2-2	#2	✓	✓	T3
<i>Pp3c2_36290</i>	T2-3-4	#1	✓		T3
<i>Pp3c2_36290</i>	T2-2-1	#2	✓	✓	T3
<i>Pp3c24_18010</i>	T2-1-1	#1	✓		T3
<i>Pp3c24_18010</i>	T2-2-1	#2	✓	✓	T3

Complémentation mutant *tt5*

Gène	Identifiant	#lignée	Insertion unique	Homozygote	Génération
<i>AtCHI</i>	T2-7-5	#1	✓	✓	T4
<i>AtCHI</i>	T2-9-4	#2	✓	✓	T4
<i>Pp3c26_4040</i>	T2-10-1	#1	✓	✓	T3
<i>Pp3c26_4040</i>	T2-13-4	#2	✓	✓	T3

Complémentation mutant *tt6*

Gène	Identifiant	#lignée	Insertion unique	Homozygote	Génération
<i>AtF3H</i>	T2-4-4	#1			T4
<i>AtF3H</i>	T2-5-4	#2	✓	✓	T4
<i>Pp3c4_3410</i>	T2-1-1	#1	✓	✓	T3
<i>Pp3c4_3410</i>	T2-2-2	#2	✓	✓	T3

Complémentation mutant *tt7*

Gène	Identifiant	#lignée	Insertion unique	Homozygote	Génération
<i>AtCYP75</i>	T2-5-7-3	#1	✓		T4
<i>AtCYP75</i>	T2-8-7-1	#2	✓		T4
<i>Pp1s1_111V6</i>	T2-3-1	#1	✓	✓	T3
<i>Pp1s1_111V6</i>	T2-4-4	#2	✓	✓	T3
<i>Pp1s98_58V6</i>	T2-9-1	#1	✓	✓	T3
<i>Pp1s98_58V6</i>	T2-10-2	#2	✓	✓	T3
<i>Pp1s54_35V6</i>	T2-9-1	#1	✓	✓	T3
<i>Pp1s54_35V6</i>	T2-2-5	#2	✓		T3
<i>Pp1s54_38V6</i>	T2-1-4	#1	✓	✓	T3
<i>Pp1s54_38V6</i>	T2-2-4	#2	✓		T3

Tableau 2 : Lignées « *transparent testa* » d'*A. thaliana* transformées par des gènes homologues de *P. patens*.

Toutes les générations de plantes ont été sélectionnées sur BASTA. Les lignées à insertion unique présentaient une ségrégation $\frac{3}{4}$ - $\frac{1}{4}$ de plantes résistantes/sensibles sur milieu MS BASTA en génération T2. Les descendants de T2 (T3) homozygotes présentaient 100% de plantes résistantes sur BASTA. Les gènes d'*A. thaliana* ont été utilisés comme contrôle positif de l'expérience.

Si $\frac{3}{4}$ des plantules était résistantes et $\frac{1}{4}$ sensibles, alors elles étaient issues d'une plante hétérozygote. Dans le cas où aucun de ces 10 lots de graines n'était issu de plante homozygote, il fallait repiquer d'autres plantes T2 afin de d'obtenir de nouveaux lots de graines, nécessitant environ 3 mois supplémentaires.

Analyse des mutants *tt* transformés

Chacune des lignées a été semée en terre, en trois pots indépendants, chaque pot contenant 4 plantes et constituant une répétition biologique. Pour chacune des expériences, un triplicat biologique de Col-0 et un triplicat biologique du mutant *tt* correspondant ont été cultivés en parallèle des lignées transformées. Les plantes au stade rosette, âgées de 19 jours après semis, ont été récoltées, lyophilisées, broyées et extraites au MeOH 80%.

Le contenu en flavonoïdes des mutants *tt* transformés a été analysé par HPLC-UV. J'ai choisi de rechercher le kaempférol 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-rhamnoside (K1, kaempféritrine) comme marqueur dans les extraits métaboliques des lignées *tt4*, *tt5* et *tt6* transformées. En effet, ce composé est le flavonoïde majoritaire dans les feuilles d'*A. thaliana* (Kovinich et al, 2015), et est virtuellement absent dans ces mutants, il constitue donc un excellent marqueur de complémentation.

Chez les mutants *tt7*, le kaempférol est toujours synthétisé, alors que la quercétine (le dérivé 3' hydroxylé du kaempférol) ne l'est plus. La forme glycosylée de quercétine la plus abondante dans les feuilles est la quercétine-3-*O*-rhamnoside-7-*O*-rhamnoside (Tohge et al, 2005), mais ce composé n'était pas disponible commercialement. J'ai donc choisi de réaliser une hydrolyse acide des extraits de *tt7* transformés, afin de libérer les flavonoïdes aglycones et pouvoir détecter la quercétine.

Complémentation du mutant *tt4 chs*

Par comparaison du profil UV à 265 nm des plantes Col-0 et des mutants *tt4*, on observe une absence de pic au temps de rétention 10,81 minutes correspondant à la kaempféritrine (K1) chez le mutant *tt4* (**Figure 5**). Les mutants *tt4* transformés avec les gènes homologues de *PpCHS* ont le même profil UV que *tt4* non transformé, bien qu'on observe un faible signal au temps de rétention 10.81 minutes pour certaines lignées. Cependant, l'observation du profil UV de la lignée contrôle (mutant *tt4* transformé avec le gène *AtCHS*) indique qu'il ne produit pas de K1, ce qui signifie que le contrôle positif de l'expérimentation n'a pas fonctionné dans le cas présent.

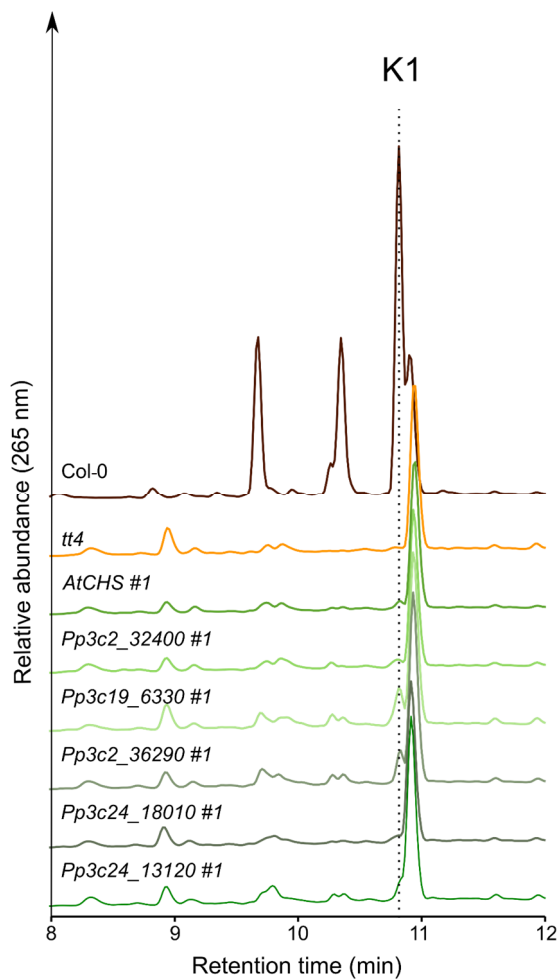


Figure 5 : Analyse HPLC-UV à 265 nm de feuilles de lignées *tt4* transformées. K1 : kaempféritrine.

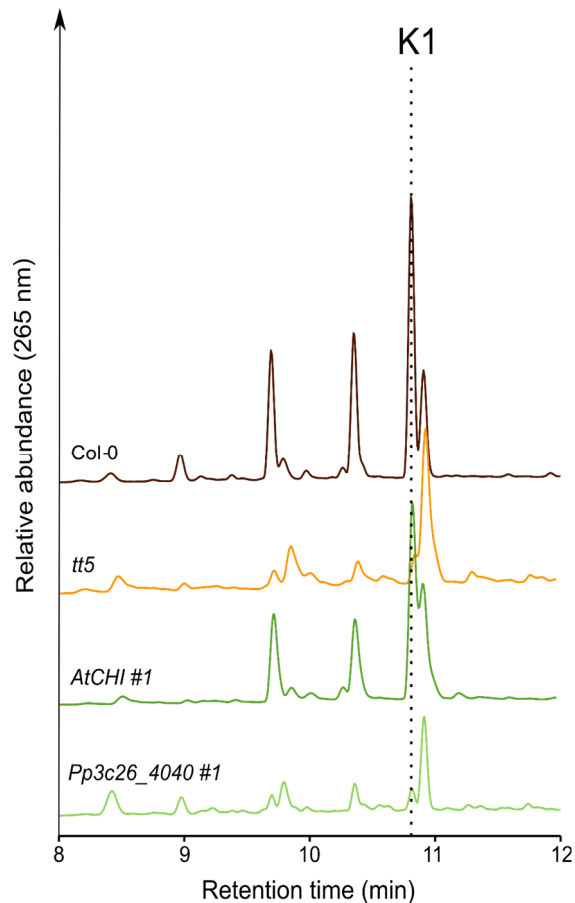


Figure 6 : Analyse HPLC-UV à 265 nm de feuilles de lignées *tt5* transformées. K1 : kaempféritrine.

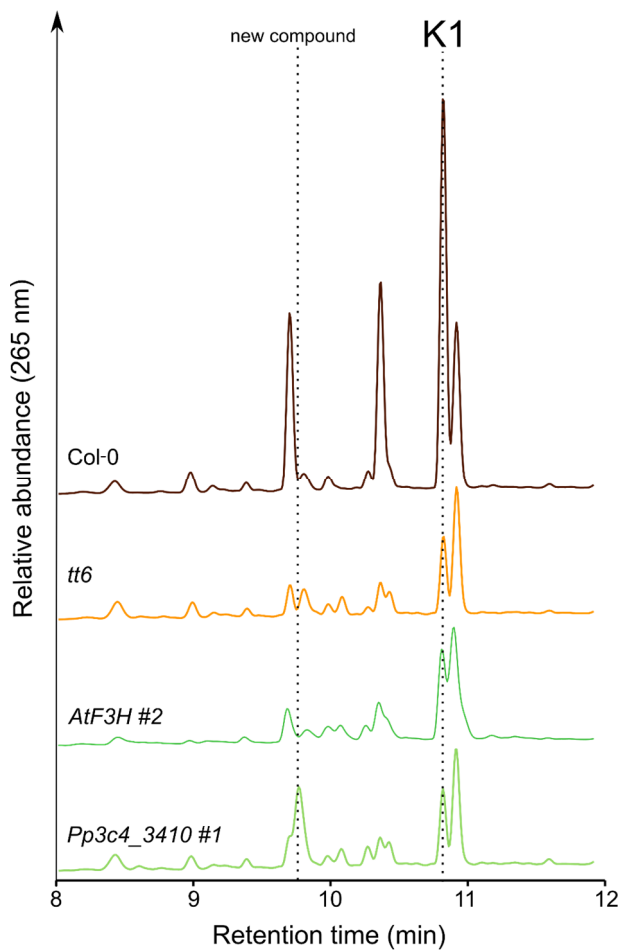


Figure 7 : Analyse HPLC-UV à 265 nm des extraits de feuilles des lignées *tt6* transformées.

De même, le gène *Pp3c24_13120* dont la fonction CHS a été caractérisée *in vitro* (Jiang et al, 2006) ne complémente pas le mutant. Une absence de complémentation a été observée pour toutes les lignées (*AtCHS* et *PpCHS*). La couleur des graines des lignées transformées est restée en outre identique à celle des *tt4*. Aucune conclusion ne peut être tirée de ces résultats.

Complémentation du mutant *tt5 chi*

La réintroduction du gène *AtCHI* dans le mutant a permis la restauration d'une couleur brune des graines, identique à celle de Col-0, ce qui démontre une complémentation efficace de ces lignées. En revanche, les lignées *tt5* transformées avec le gène *PpCHI* ont des graines jaunes, identiques à celles de *tt5*.

La comparaison des profils UV confirme que la lignée *AtCHI* #1 produit le composé K1 (λ_{\max} : 265-342 nm) et possède un profil métabolique comparable à celui de Col-0 (**Figure 6**). On observe un léger épaulement chez *tt5* et un pic de faible intensité chez *Pp3c26_4040* #1 (*PpCHI*) au temps de rétention 10.81 min, mais sans que le spectre d'absorbance UV ne corresponde à celui de K1 (λ_{\max} : 328 nm). Ce résultat, confirmé dans la lignée #2, semble indiquer que *PpCHI* n'est pas en mesure de complémenter le mutant *tt5* et que ce gène n'a pas de fonction chalcone isomérase.

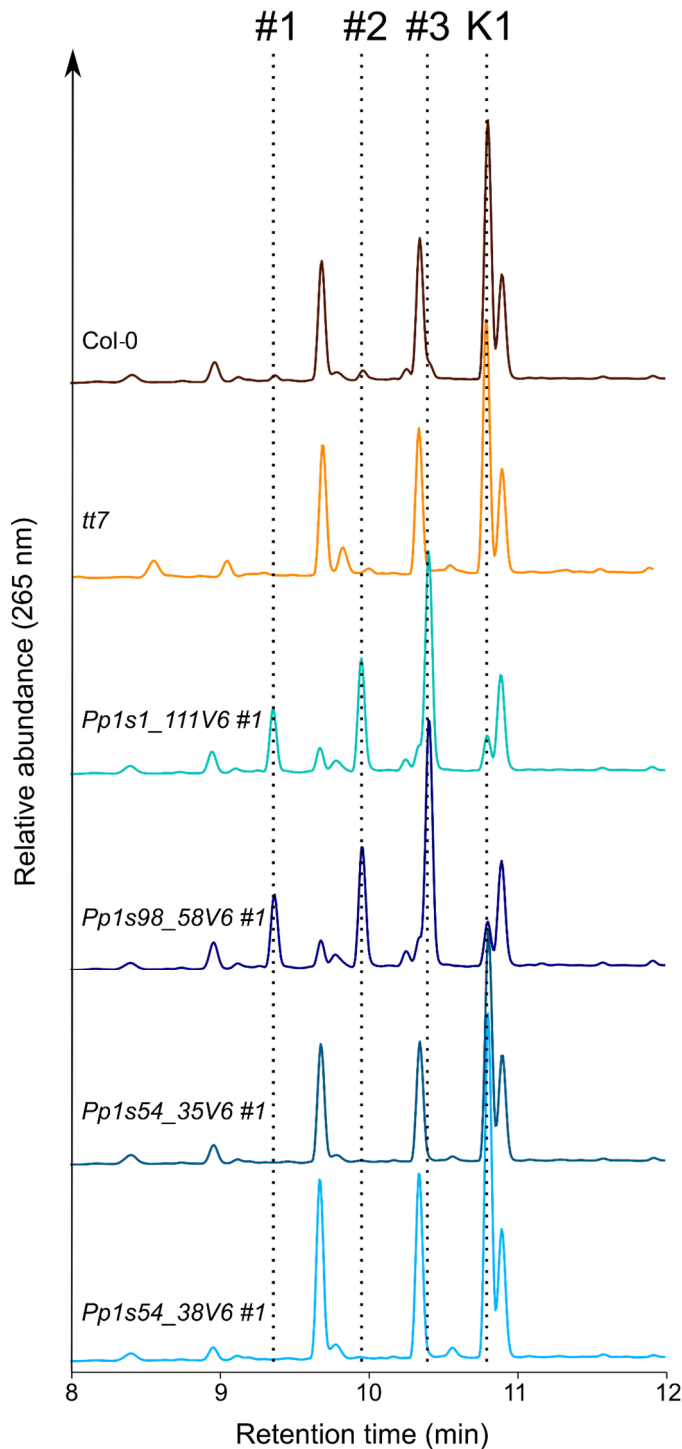
Une analyse en UPLC-MS/MS permettant de détecter spécifiquement la kaempféritrine pourra confirmer ce résultat.

Complémentation du mutant *tt6 (f3h)*

La couleur des graines du mutant *tt6* et des lignées transformées semble identique, c'est-à-dire plus claire que les graines de plantes Col-0. L'analyse HPLC des extraits de *tt6* montre la présence un composé qui coélué avec K1 au temps de rétention 10.81 dont le spectre d'absorbance UV est différent (λ_{\max} : 265-334 nm) (**Figure 7**). Ce composé est retrouvé chez *AtF3H* #2 et *PpF3H* #1. Une analyse en UPLC-MS/MS permettant de détecter précisément K1 pourrait permettre de confirmer que ni *AtF3H* ni *PpF3H* ne le produit. Ces résultats suggèrent néanmoins que les lignées *tt6* ne sont pas complémentées, y compris pour le contrôle positif. Néanmoins, on observe dans la lignée *PpF3H* un nouveau pic produit à 9.8 minutes, qui est dû à l'activité de *PpF3H* puisqu'il est absent dans les autres lignées.

Complémentation du mutant *tt7* (*f3'h*)

Les lignées *tt7* transformées ont été analysées en deux lots de plantes. Le premier comprend les lignées #1 des quatre gènes candidats de *P. patens* et la lignée #2 de *Pp1s1_111V6* et *Pp1s98_58V6*. Le deuxième comprend les lignées #2 de *Pp1s54_35V6* et *Pp1s54_38V6* et également les deux lignées transformées avec le gène *AtCYP75B1*, le contrôle positif.



La variation de la couleur des graines du mutant *tt7* par rapport à Col-0 est subtile, ce critère n'a donc pas été retenu pour déterminer si la complémentation était opérante. J'ai tout d'abord analysé les extraits du 1^{er} lot de plantes en HPLC-UV à 265 nm (**Figure 8**). Comme attendu, K1 est présent dans toutes les lignées, y compris dans *tt7*. En revanche, la taille du pic est plus importante dans Col-0, *tt7*, *Pp1s54_35V6* #1 et *Pp1s56_38V6* #1 que dans les lignées *Pp1s1_111V6* #1 et *Pp1s98_58V6* #1. De plus, dans ces dernières, on observe trois nouveaux pics (#1 ; #2 ; #3) aux temps de rétention respectifs de 9.38, 9.97 et 10.42 minutes. Le spectre d'absorbance de ces composés montre une λ_{max} à 255 et 350, typique des flavonoïdes glycosylés (Negri et al, 2013). J'ai donc effectué une hydrolyse acide de ces extraits afin de libérer les aglycones et être en mesure de rechercher la quercétine et le kaempférol (**Figure 9A**).

Figure 8 : Analyse HPLC-UV à 265 nm de feuilles de lignées *tt7* transformées.

K1 : kaempfétrine. Les composés #1, #2 et #3 sont présents spécifiquement dans les lignées *Pp1s1_111V6* #1 et *Pp1s98_58V6* #1.

Tout d'abord, le kaempférol est détecté dans tous les échantillons au temps de rétention 13.28 minutes, mais en quantité plus faible dans les lignées *Pp1s1_111V6* #1 et *Pp1s98_58V6* #1. Dans ces dernières, on détecte de la quercétine au temps de rétention 12.58 minutes, ce qui indique que ces gènes sont responsables de la conversion du kaempférol en quercétine. En plus d'une quantité accrue de quercétine, les lignées *Pp1s1_111V6* #1 et *Pp1s98_58V6* #1 présentent un pic supplémentaire à 13 minutes (#1) et sont dépourvues du pic à 14.75 minutes (#2) qui est présent dans Col-0 et *tt7*.

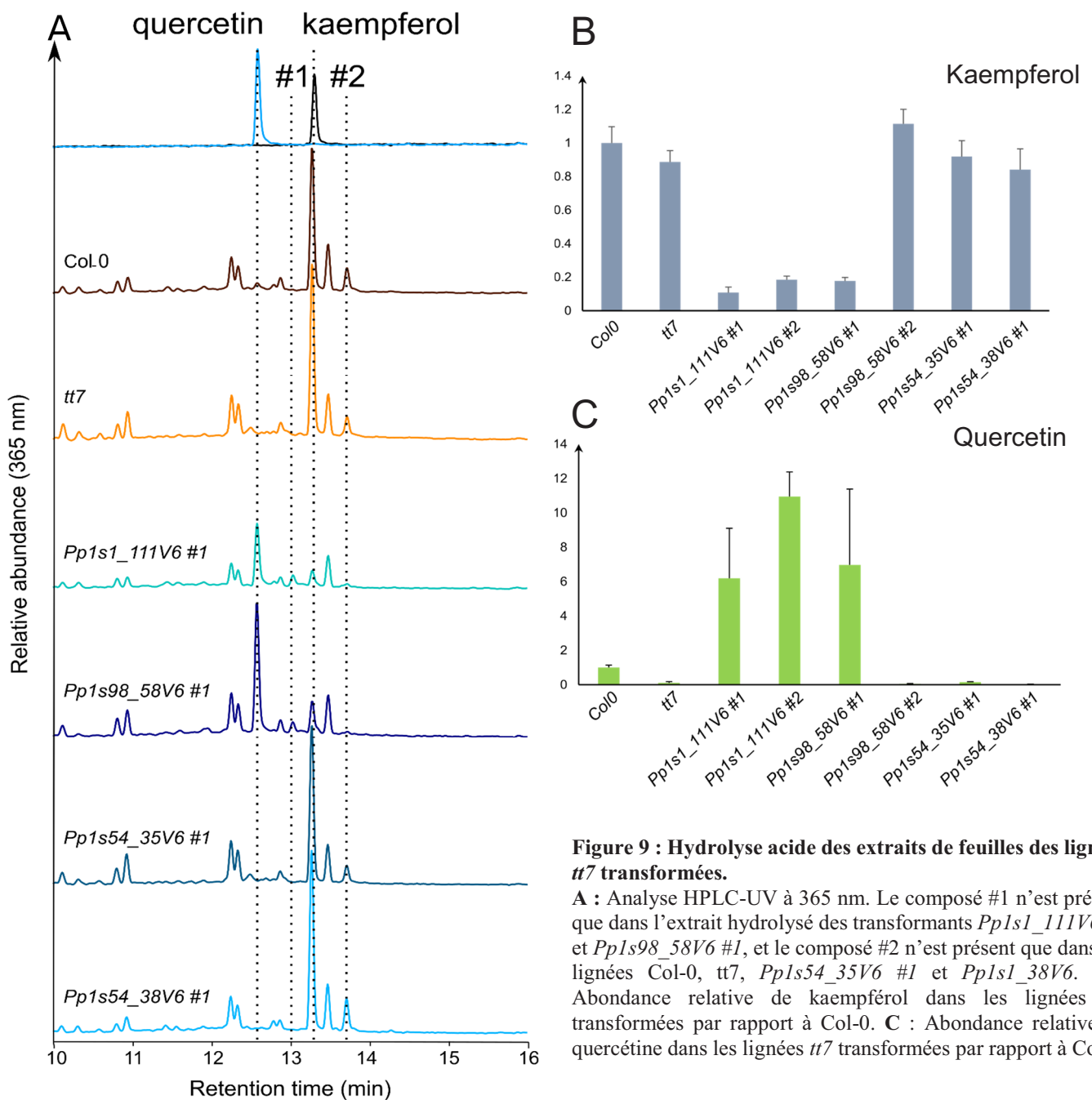


Figure 9 : Hydrolyse acide des extraits de feuilles des lignées *tt7* transformées.

A : Analyse HPLC-UV à 365 nm. Le composé #1 n'est présent que dans l'extrait hydrolysé des transformants *Pp1s1_111V6* #1 et *Pp1s98_58V6* #1, et le composé #2 n'est présent que dans les lignées Col-0, *tt7*, *Pp1s54_35V6* #1 et *Pp1s1_38V6*. **B** : Abondance relative de kaempférol dans les lignées *tt7* transformées par rapport à Col-0. **C** : Abondance relative de quercétine dans les lignées *tt7* transformées par rapport à Col-0.

Bien que non identifiés, ces composés pourraient correspondre à d'autres dérivés flavonoïdes, et le composé #1, plus polaire, pourrait être la version hydroxylée du composé #2. De plus, une activité F3'5'H ou FNSII de ces protéines est envisageable. En effet, ces deux gènes de *P. patens* présentent également une bonne homologie avec PiCYP75A1 et SbFNSII. Le composé #1 pourrait en effet correspondre à l'apigénine qui, d'après des analyses effectuées en UPLC, a un temps de rétention compris entre le kaempférol et la quercétine. Si de l'apigénine est produite spécifiquement dans les lignées *Pp1s1_111V6* #1 et *Pp1s98_58V6* #1, alors nous pourrions mettre en évidence une activité FNSII des protéines correspondantes.

Une co-injection de ces échantillons avec les standards de myricétine et d'apigénine est nécessaire pour confirmer ces hypothèses, de même qu'une analyse ciblée en UPLC-MS/MS.

Les aires des pics correspondant au kaempférol et à la quercétine ont été relevées dans les extraits hydrolysés du lot 1 de plantes (**Figure 9B**) et nous permet de quantifier l'accumulation de quercétine dans les deux lignées de *Pp1s1_111V6* et la lignée *Pp1s98_58V6* #1. Cette accumulation n'a néanmoins pas pu être confirmée dans la seconde lignée *Pp1s98_58V6* #2 (**Figure 9B**). Une caractérisation moléculaire de cette lignée pourrait renseigner sur la présence de l'ADN-T dans le génome ou indiquer si le transgène s'exprime convenablement.

Le deuxième lot de plantes *tt7* transformées a été analysé de la même manière mais l'hydrolyse acide n'a pas permis d'obtenir de résultats exploitables. J'ai donc uniquement relevé les aires de pic de K1 dans toutes les lignées transformées, que j'ai normalisées par rapport à la quantité de K1 présente chez Col-0 (**Figure 10**). Ceci permet de voir que :

- 1) les deux lignées *Pp1s1_111V6* contiennent la même quantité de K1, qui est 80% plus faible que celle mesurée dans Col-0, allant de pair avec une conversion du kaempférol en quercétine.
- 2) la lignée *Pp1s98_58V6* #2, contrairement à la lignée #1, accumule le composé K1, expliquant ainsi l'absence de quercétine observée précédemment (**Figure 9C**).
- 3) le résultat est également assez variable pour le contrôle positif *AtCYP75B1*, même si la lignée #1 montre une quantité de K1 similaire aux lignées *Pp1s1_111V6*, suggérant une métabolisation du kaempférol en quercétine.
- 4) les gènes *Pp1s54_35V6* et *Pp1s54_38V6* ne semblent pas compléter la fonction F3'H.

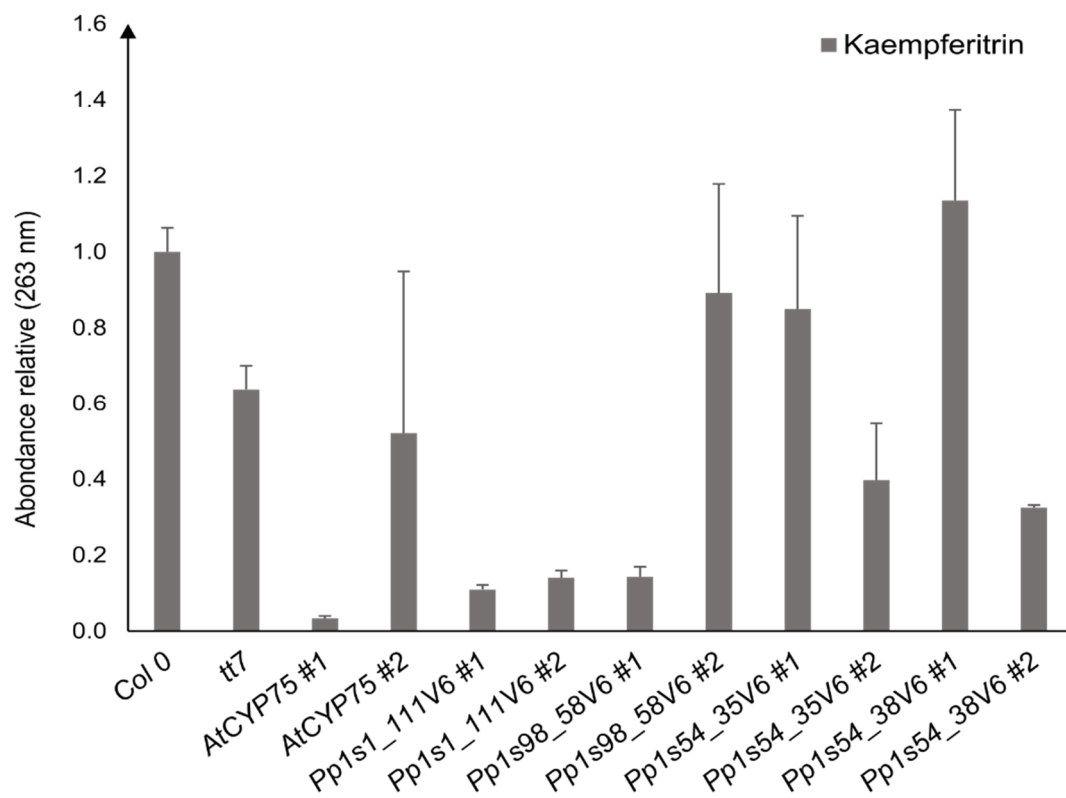


Figure 10 : Abondance relative de K1 dans les extraits des lignées *tt7* complétées par rapport à Col 0.

Sous-chapitre 2

Ingénierie de la voie des flavonoïdes chez *P. patens*

Les flavonoïdes sont considérés comme des nutraceutiques, car ils sont présents naturellement dans de nombreuses sources alimentaires, telles que les fruits (pomme, citron, orange) et leurs dérivés (cidre, vin rouge), le soja ou le thé (Erlund, 2004 ; Gattuso et al, 2006 ; Wang et al, 2017a), et ont des effets bénéfiques pour la santé humaine. Le principal flavonoïde présent dans l'alimentation est la quercétine, dont l'absorption est estimée à 16 mg/jour (Hertog et al, 1993).

Des études montrent que les flavonoïdes auraient des activités prophylactiques contre les mélanomes, et notamment la formation de métastases (Piantelli et al, 2006 ; Liu-Smith and Meyskens, 2016). Les isoflavonoïdes, composés particuliers des légumineuses et notamment du soja, pourraient avoir un effet préventif contre le cancer du sein, en raison de leur similarité structurale avec les œstrogènes humains (Ziaei and Halaby, 2017).

En outre, les flavonoïdes auraient un effet bénéfique sur la cognition (Bell et al, 2015), et pourraient même retarder les effets de la maladie d'Alzheimer (Vauzour, 2014).

Enfin, les flavonoïdes stimulent la production de mélanines, les pigments épidermiques animaux (Liu-Smith and Meyskens, 2016). D'ailleurs, on peut voir ici une analogie entre la biosynthèse de mélanine chez les animaux et de flavonoïdes chez les plantes, dérivant toutes deux d'un acide aminé aromatique et ayant pour vocation la protection des tissus contre les rayons ultra-violets (Carletti et al, 2014). Les mélanines se trouvent à l'intérieur de cellules spécialisées appelées mélanocytes et localisées au niveau de l'épiderme des mammifères, les flavonoïdes sont stockés dans la vacuole des cellules épidermiques des végétaux (Petrucci et al, 2013). Utilisées dans des crèmes solaires, la quercétine et la rutine procurent une photoprotection non négligeable contre les UVA (Choquenot et al, 2008).

En raison de leurs nombreuses caractéristiques intéressantes, les flavonoïdes sont des composés d'intérêt utilisés en industrie. La teneur de ces molécules peut être augmentée en élicitant leur production (Papoutsis et al, 2016) ou en modifiant la voie de biosynthèse par ingénierie métabolique (Verhoeyen et al, 2002). Dans une optique de recherche appliquée, nous avons pour objectif de reconstruire une voie métabolique chez *P. patens* permettant la biosynthèse de dihydromyricétine, en introduisant des séquences codantes des enzymes de la voie des flavonoïdes provenant de *Petunia inflata*, chez qui cette voie est caractérisée et très active. Nous

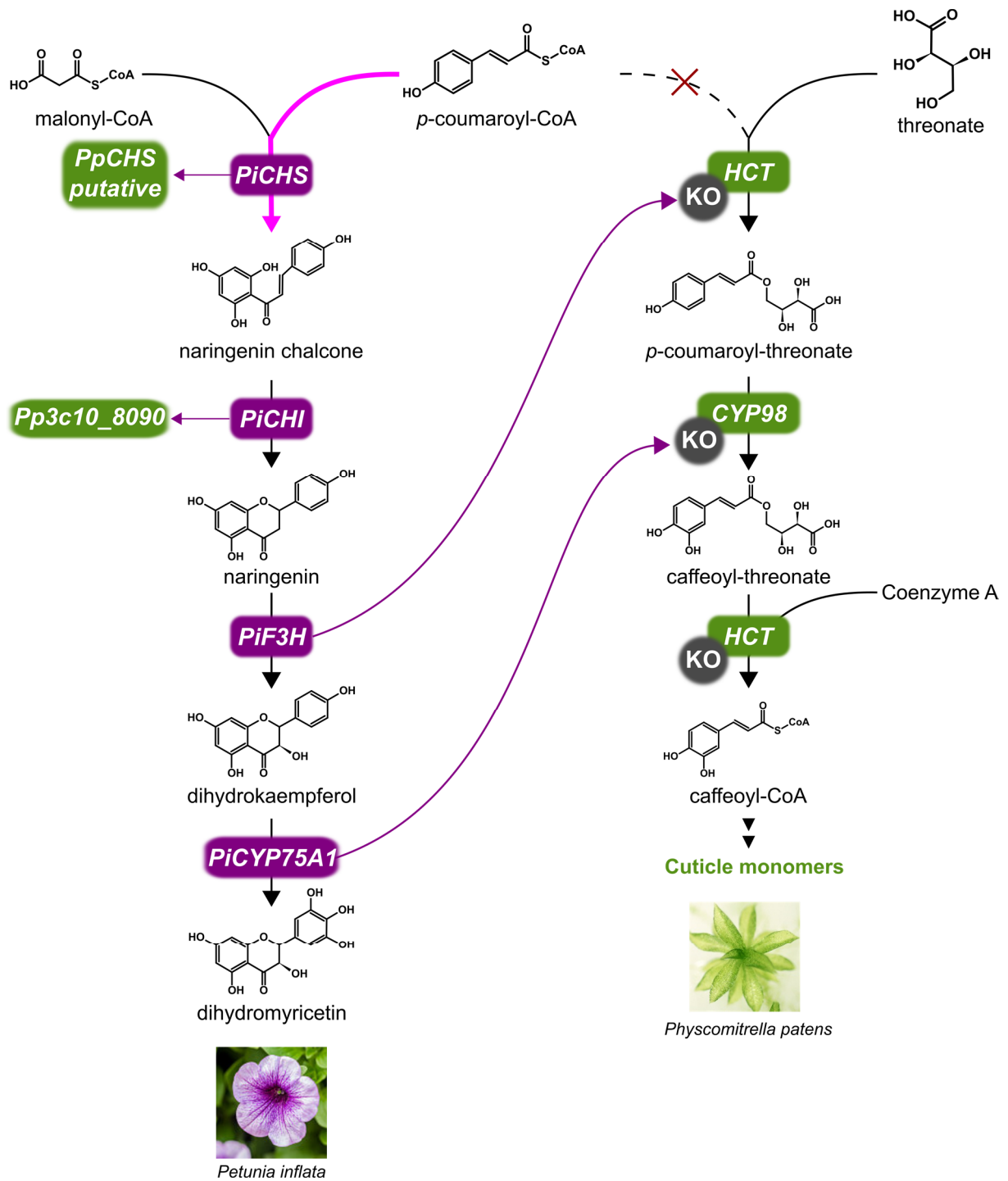


Figure 11 : Stratégie de knock-in/knock-out pour l'ingénierie de la voie des flavonoïdes chez *P. patens*.
 La reconstruction de la voie des flavonoïdes s'effectue par transformation de la mousse avec des gènes de *Petunia inflata*, dont *PiF3H* et *PiCYP75A1* qui ciblent respectivement les locus *PpHCT* et *PpCYP98*, permettant l'inactivation de ces gènes après recombinaison homologue.

n'avons pas pu conclure sur la présence de CHS fonctionnelles chez la mousse, dans la mesure où nous n'avons pas observé de complémentation claire, y compris pour le contrôle positif *AtCHS*. Néanmoins, les données obtenues au sous chapitre 1 indiquent que la candidate PpCHI ne semble pas capable de réaliser la biosynthèse de naringénine, autrement dit que la voie des flavonoïdes chez la mousse n'existe pas telle qu'on la connaît chez les plantes vasculaires. De ce fait, nous ne pouvions pas compléter une voie des flavonoïdes préexistante chez *P. patens*.

Des cassettes d'expression permettant l'expression des gènes *CHS*, *CHI*, *F3H* et *CYP75A1* (*F3'5'H*) de *P. inflata* sous le contrôle du promoteur *PpACTIN5* ont été introduites par recombinaison homologe dans le génome de *P. patens*. Elles ciblaient respectivement les locus suivants : *Pp3c24_13120* (*PpCHS* putative), *Pp3c10_8090* (*large subunit ribosomal protein*, locus dont l'inactivation n'a pas d'effet délétère sur *P. patens* selon Kubo et al, 2013), *Pp3c2_29140* (*PpHCT*) et *Pp3c22_19010* (*PpCYP98*). L'introduction de *PiF3H* et *PiCYP75B1* dans les deux premiers loci de la voie des esters phénoliques avait pour objectif de couper complètement le flux métabolique dans cette voie, afin d'augmenter la disponibilité du substrat (le *p*-coumaroyl-CoA) et d'induire une redirection du flux métabolique vers la voie des flavonoïdes (**Figure 11**). Cette redirection du flux métabolique a été observée chez *A. thaliana* où le « silencing » d'*AtHCT* induit une accumulation de flavonoïdes (Besseau et al, 2007). Cette démarche expérimentale avait été initiée au début de ma thèse, bien avant que l'on sache que la biosynthèse de *p*-coumaroyl-thréonate n'était pas seulement due à l'activité de PpHCT mais également à une deuxième transférase.

Des protoplastes ont été co-transformés avec les quatre constructions génétiques simultanément. J'ai remarqué que quelques transformants avaient le même phénotype que $\Delta PpHCT$ et $\Delta PpCYP98$, ce qui indiquait que l'un ou l'autre de ces loci était probablement inactivé dans ces lignées.

Dans un premier temps, j'ai choisi une caractérisation métabolique des lignées en recherchant les flavonoïdes potentiellement produits par détection UV dans les lignées transgéniques : naringénine chalcone, naringénine, dihydrokaempférol, dihydromyricétine. Pour 4 des lignées produites, un pic éluant au temps de rétention du dihydrokaempférol (DHK) était présent dans les extraits métaboliques (**Figure 12**). L'identité de cette molécule a été confirmée par analyse UPLC-MS/MS. Néanmoins, le signal présent dans les extraits était très faible, ce qui signifie que le DHK était produit en petite quantité dans les lignées transgéniques.

Pour confirmer que la production de DHK était corrélée à une intégration des cassettes d'expression dans le génome, j'ai entrepris une caractérisation moléculaire des lignées transgéniques en utilisant la même procédure que pour la caractérisation de $\Delta PpHCT$ (Chapitre 1, Supplemental Figure 5B). J'ai pu mettre en évidence par PCR l'intégration complète d'une seule cassette d'expression (*PiF3H*) dans le locus *PpHCT* dans une seule des lignées (#5). La présence des autres cassettes d'expression a été vérifiée par PCR, mais elles n'étaient pas intégrées dans les loci ciblés. Il est possible que ces cassettes d'expression se soient intégrées de manière illégitime dans le génome (en dehors du locus ciblé) ou bien qu'elles ne se soient pas intégrées et qu'elles soient exprimées de manière épisomale à partir du plasmide utilisé pour la transformation.

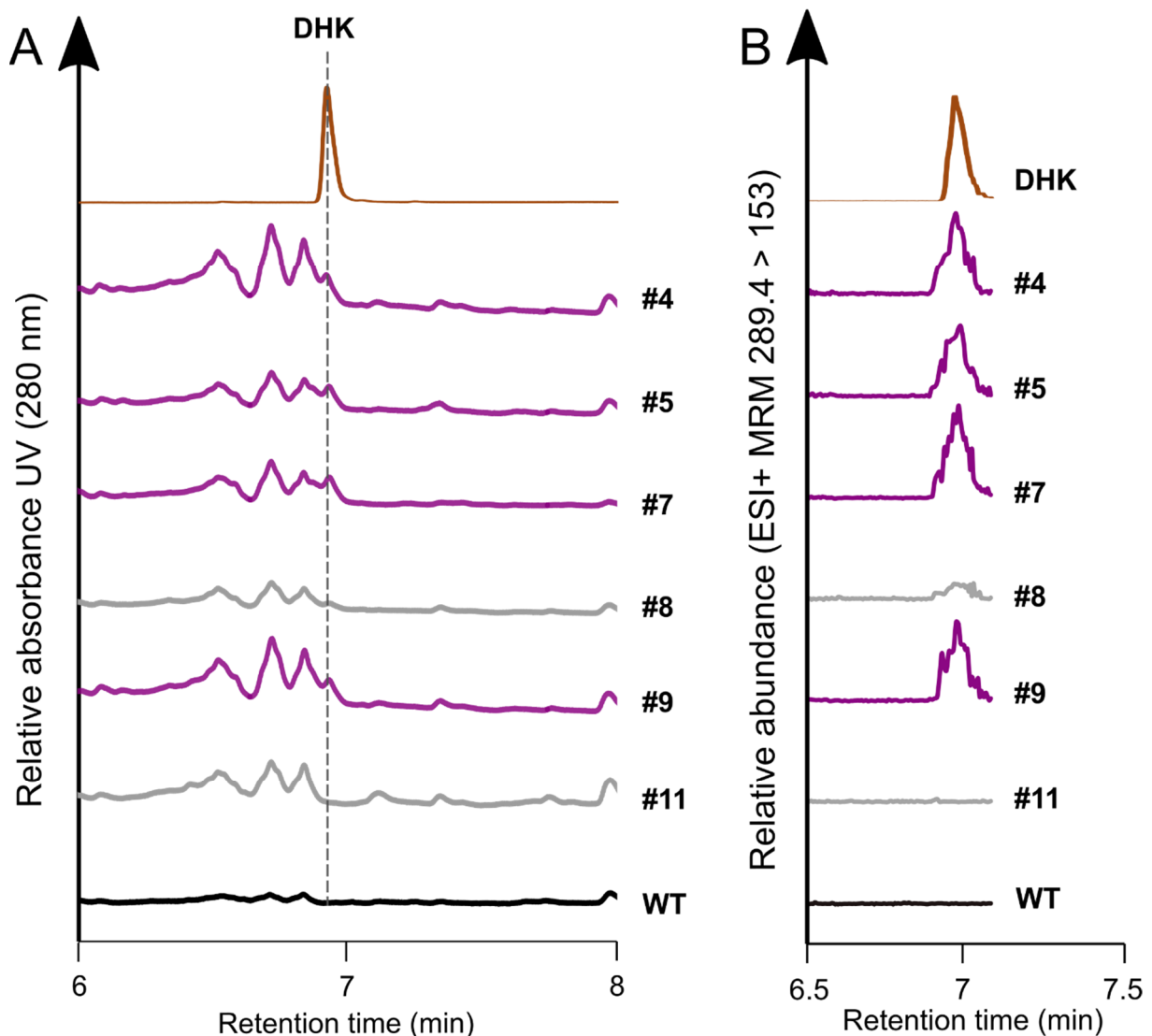


Figure 12 : Profilage métabolique des lignées transgéniques transformées avec les gènes de *P. inflata*.

A : Analyse UPLC-UV à 280 nm d'extraits méthanoliques. **B :** Analyse UPLC-MS/MS basée sur la transition MRM 289.4>153 du DHK. DHK : dihydrokaempférol.

DISCUSSION

La recherche de gènes homologues de la voie des flavonoïdes chez *P. patens* a permis de mettre en évidence 23 candidats *CHS*, 1 candidat *CHI*, 1 candidat *F3H* et 4 candidats *F3'H* (*CYP75B*).

Les candidats *CHS* étaient prometteurs en raison de leur fort pourcentage d'identité de leurs séquences protéiques (entre 59 et 64 %) avec la *CHS* d'*A. thaliana* (AT5G13930.1) et de la présence de sites catalytiques conservés : Cys¹⁷⁰-His³⁰⁹-Asn³⁴², les résidus catalytiques Phe²²¹ et Phe²⁷¹, et la boucle GFGPG dans leurs séquences protéiques (Koduri et al, 2010). De plus, l'activité *CHS* du candidat *Pp3c24_13120*, inclus dans notre analyse, avait déjà été démontrée *in vitro* (Jiang et al, 2006). Par conséquent, ce dernier constituait, tout comme le gène *AtCHS*, un excellent contrôle positif pour la complémentation du mutant *tt4*. Néanmoins, la complémentation des mutants *tt4* n'a pas fonctionné, y compris pour les contrôles positifs (dont *AtCHS*). Bien que l'insertion de l'ADN-T ait été confirmée par la sélection des lignées sur BASTA, une caractérisation supplémentaire par génotypage et recherche des transcrits des gènes introduits est donc nécessaire pour expliquer ce résultat et détecter notamment une éventuelle extinction des transgènes (RNA silencing). Cette absence de complémentation, observée également pour *AtF3H*, peut s'expliquer par l'insertion de l'ADN-T dans une région « silencieuse » du génome. Il semble exister une corrélation entre une expression silencieuse de l'ADN-T et l'hyperméthylation de la région d'intégration (Mirza, 2005).

L'absence d'expression a peu de chances d'être due à l'utilisation du promoteur *pC4H* d'*A. thaliana*, qui a été utilisé avec succès dans de nombreux travaux pour l'expression hétérologue ou la surexpression de gènes de la voie des phénylpropanoïdes dans notre équipe et d'autres laboratoires (Meyer et al, 1998 ; Weng et al, 2008 ; Liu et al, 2016). Un promoteur fort et moins spécifique aurait peut-être pu améliorer les résultats de complémentation : le gène *F3'H* de pomme (Han et al, 2010), et les gènes *CHS* et *CHI* de maïs (Dong et al, 2001) avaient été exprimés sous le contrôle du promoteur CaMV 35S dans les mutants *tt* correspondants et avaient donné des résultats concluants. Cependant, la *C4H* étant codée par un gène unique chez *A. thaliana*, son promoteur devrait conduire à une expression suffisante pour alimenter toute la voie aval.

Les analyses métaboliques ont montré que *PpCHI* (*Pp3c26_4040*) ne complémente pas la fonction *tt5*, contrairement au contrôle positif *AtCHI*. *Pp3c26_4040* ne semble donc pas coder pour une chalcone isomérase. L'homologue le plus proche de *PpCHI* chez *A. thaliana* est la protéine codée par AT5G05270, une *CHI*-like décrite comme promotrice de la voie des

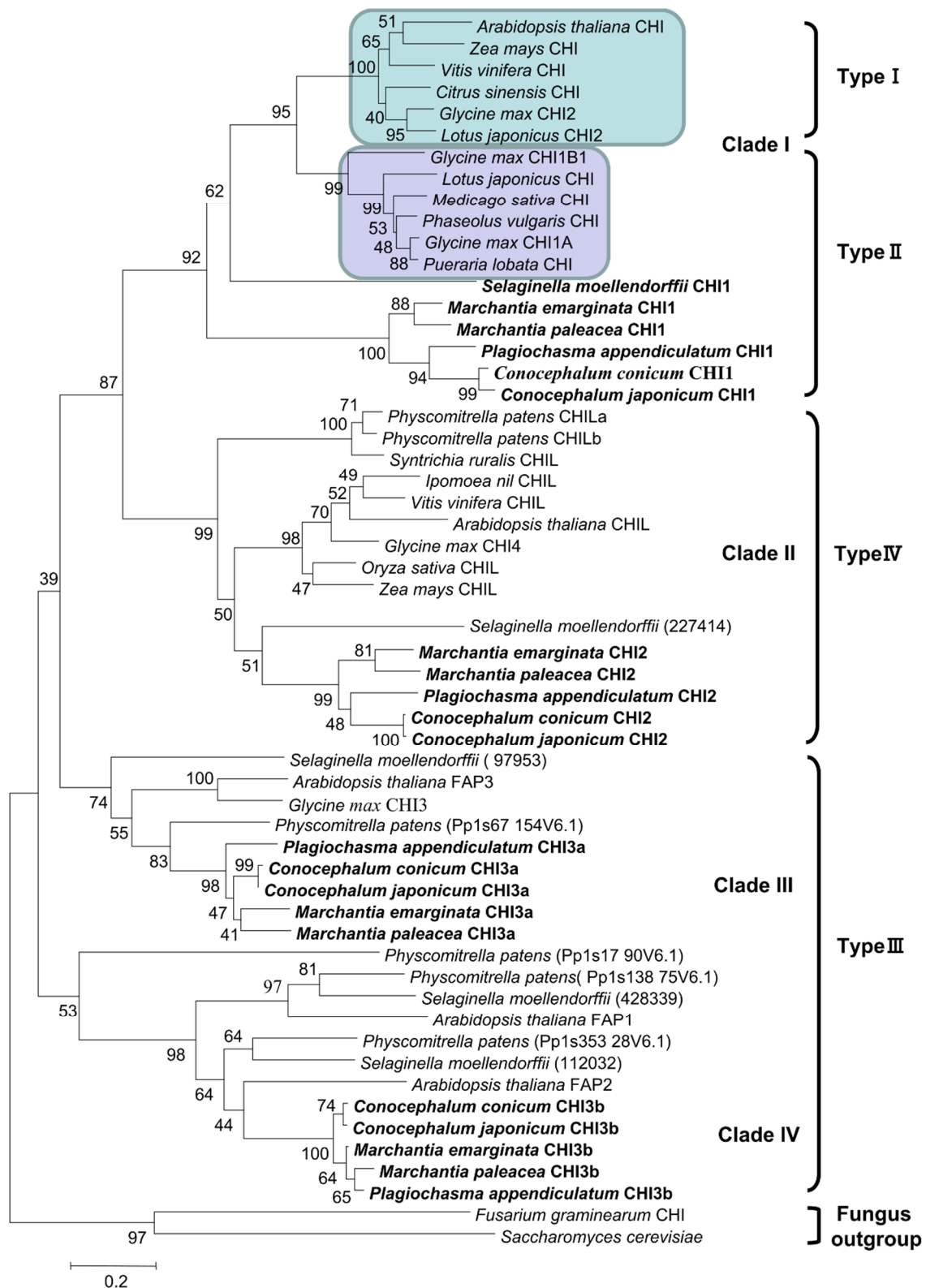


Figure 13 : Arbre phylogénétique des homologues protéiques de chalcone isomérases présentes chez plusieurs espèces représentatives de la lignée verte (Cheng et al, 2018). Les CHI de type I et II ont une activité chalcone isomérase, type IV sont des « enhanceur » de la voie des flavonoïdes, et le type III sont des « fatty acid binding protein » dont l'activité est inconnue.

flavonoïdes, mais sans activité de cyclisation des chalcones (Jiang et al, 2015). AtCHI (codée par *AT3G55120*) est seulement le deuxième homologue le plus proche. D'après une analyse phylogénétique, aucune CHI de type I (qui métabolise la naringénine chalcone) ou de type II (qui métabolise l'isoliquiritigénine) n'avait pu être mise en évidence chez *P. patens*, contrairement à *S. moellendorffii*, et *Marchantia paleacea* dont les CHI complètent le mutant *tt5* (**Figure 13** ; Cheng et al, 2018). *Pp3c26_4040* (*CHILa*), et *Pp3c4_25770V3* (*CHILb*) codent des CHI de type IV, des stimulants de la voie des flavonoïdes ayant été caractérisés chez l'ipomée, le pétunia et chez *Torenia hybrida* (Morita et al, 2014). Ces protéines n'ont pas d'activité catalytique et ne complètent pas le mutant *tt4* d'*A. thaliana*. En revanche, la mutation ou la réduction de l'expression du gène correspondant régule négativement la voie des flavonoïdes, avec comme effet une coloration moins importante des pétales (**Figure 14**). Toutefois, la mutation n'affecte pas la régulation génétique des gènes de la voie des flavonoïdes chez l'ipomée, indiquant que CHI IV n'est pas un facteur de transcription. Par conséquent le mécanisme par lequel CHI IV active la production de flavonoïde n'est pas encore élucidé. La surexpression du gène *PpCHILa* chez *A. thaliana* Col-0 ou chez le pétunia, ainsi que chez les mutants correspondants, pourrait indiquer si cette protéine a une activité CHI de type IV dans le cas où la voie des flavonoïdes serait stimulée.

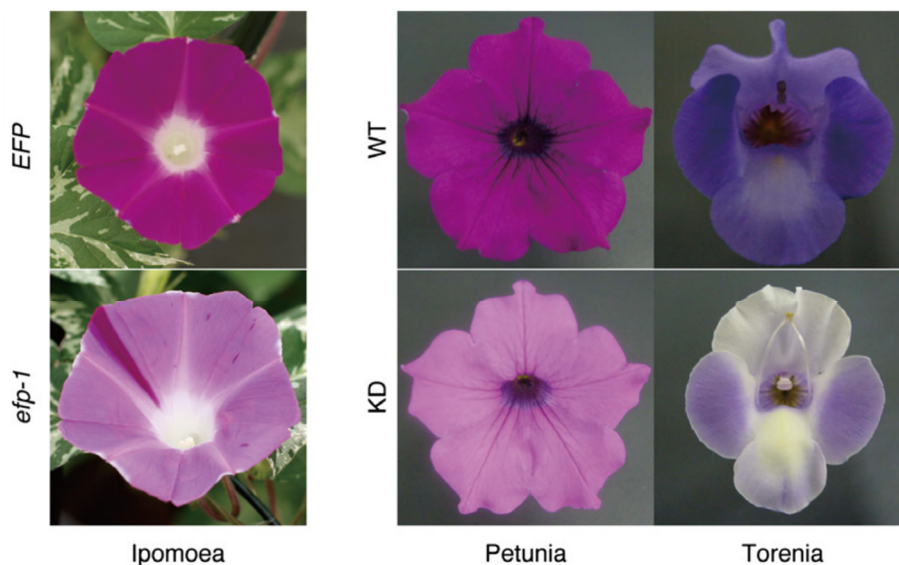


Figure 14 : Lignée Knock-out de CHI IV (EFP) d'ipomée et lignées Knock-down de CHI IV de pétunia et de torenia (Morita et al, 2014).

L'analyse phylogénétique de Cheng et al (2018) met également en évidence quatre CHI de type III chez *P. patens* (Pp3c10_20100V3, Pp3c18_4460V3, Pp3c11_25580V3 et Pp3c21_9340V3). Chez *A. thaliana*, les CHI de type III sont des « fatty acid binding proteins » localisées dans les chloroplastes, mais dont l'activité est inconnue (Ngaki et al, 2012). Les CHI de type III sont présentes chez les eucaryotes (sauf chez les animaux) et même chez les bactéries, tandis que les CHI de type IV apparaissent chez les mousses et constituent la version ancestrale des CHI de type I et II présentes chez les plantes vasculaires (Ngaki et al, 2012).

Ces résultats suggèrent que, si la voie des flavonoïdes existe chez *P. patens*, la cyclisation des chalcones ne serait pas enzymatique mais spontanée, comme précédemment évoqué par Cheng et al, 2018.

L'expression d'*AtF3H* et de *PpF3H* n'a pas complété les lignées *tt6*. Même si aucune conclusion ne peut être établie concernant l'activité de *PpF3H*, plusieurs explications peuvent être proposées pour justifier l'absence de F3H. D'une part, il n'existe pas d'activité chalcone isomérase chez *P. patens*, et la naringénine n'a pas été détectée dans les extraits. D'autre part, les flavonoïdes décrits chez les bryophytes sont des flavones comme l'apigénine et la lutéoline dans le genre *Plagiomnium* et l'espèce *Marchantia polymorpha* (Harris, 2009 ; Albert et al, 2018), dont la production ne dépend pas de l'activité F3H.

Les complémentations des lignées *tt7* avec les gènes candidats F3'H ont permis d'identifier deux gènes *Pp1s1_111V6* et *Pp1s98_58V6* (sous réserve de confirmer les résultats avec une deuxième lignée) capables de convertir le kaempférol en quercétine. De plus, d'autres produits non identifiés ont été détectés dans les lignées *tt7* complémentées avec ces deux gènes.

L'ensemble de ces données indique que la voie des flavonoïdes, telle qu'on la connaît chez les plantes vasculaires, ne semble pas exister chez *P. patens*. En revanche, plusieurs études suggèrent la présence de chalcones chez *P. patens* et la présence d'une famille multigénique de CHS (Jiang et al, 2006 ; Koduri et al, 2010). Il est ainsi raisonnable de penser que *Pp1s1_111V6* et *Pp1s98_58V6* métabolisent non pas des flavonoïdes, mais des chalcones *in vivo*. Une activité chalcone 3-hydroxylase (CH3H) a été montrée chez *Cosmos sulphureus*, qui produit la butéine, la version 3-hydroxylée de l'isoliquiritigénine. La CsCH3H partage 84% d'identité avec la CsF3'H, qui hydroxyle la naringénine, mais les deux enzymes ont des activités spécialisées *in vitro*. En effet, la CsCH3H hydroxyle 7 fois plus efficacement l'isoliquiritigénine que la naringénine, tandis que la CsF3'H n'est capable d'hydroxyle que les flavonoïdes (Schlangen et al, 2010).

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétal et conditions de culture

Arabidopsis thaliana

Toutes les lignées, sauvages et mutantes, utilisées lors de l'étude dérivent de l'accession Col-0. Pour la culture d'*A. thaliana* sur sol, les graines sont semées dans des pots de 7cm de côté contenant du terreau et placées en logette de culture [photopériode 16h jour (19°C)/ 8h nuit (17 °C)] dont l'hygrométrie est de 80%. Lorsque les hampes florales se développent, les plantes sont tutorées. Peu après l'apparition des premières siliques, les plantes sont recouvertes d'un sachet en papier afin de faciliter la future récolte des graines. Après récolte, les graines sont laissées à sécher pendant minimum deux semaines. Il est possible également de les sécher à 37°C pendant quelques jours.

Pour la culture d'*A. thaliana in vitro*, les graines sont préalablement stérilisées. Pour ce faire, quelques mg de graines sont incubés dans un microtube dans une solution de 70% d'éthanol et 0.05% de triton X-100 pendant 5 min sous agitation (1400 rpm). Le surnageant est ensuite retiré et les graines sont lavées 2 fois avec 1 mL d'EtOH 70%, puis 1 fois avec 1 mL d'EtOH absolu, sous hotte stérile. Les graines sont ensuite séchées à l'air libre pendant 20 minutes, sous hotte stérile. Les graines ainsi stérilisées sont semées dans des boîtes de Petri à l'aide d'un cure-dent autoclavé sur un milieu Murashige and Skoog incluant vitamines et MES (**Annexe 1** ; Duchefa #MS0255), pH ajusté à pH 5.8 avec KOH. Le milieu est solidifié avec 1% d'agar agar. Les boîtes contenant les graines sont placées une nuit à 4°C pour synchroniser la germination puis placées en logette de culture *in vitro*.

Complémentation génétique des mutants *transparent testa*

Mutants transparent testa

Les expériences de complémentation génétique de mutants *transparent testa* d'*A. thaliana* ont été réalisées avec les lignées d'insertion suivantes : *tt4-15* (GK-545DO4), *tt5-2* (GK-176HO3), *tt6-2* (GK-292EO8), *tt7-7* (GK-629C11). Ces lignées sont toutes issues de la collection GABI, possèdent le même fond génétique (Col-0) et ont été précédemment caractérisées (Rosso et al, 2003 ; Kleinboelting et al, 2012 ; Appelhagen et al, 2014 ; Kleinboelting et al, 2015). Les graines ont été obtenues auprès du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

Production des constructions génétiques

Les séquences codantes des gènes de *P. patens* choisis pour la complémentation des mutants *transparent testa* d'*A. thaliana* ont été amplifiés par PCR à partir d'ADNc ou d'ADNg (amorces visibles en **Annexe 3**), sauf pour PiCHI et PiF3H dont la séquence codante flanquée aux deux extrémités par les sites *attB1* et *attB2*, a été commandée chez la compagnie IDT (gBlocks® ; <https://eu.idtdna.com/>). Les séquences codantes ont été clonées par « BP cloning » dans le vecteur pDONR/Zeo comme décrit dans la partie **Protocoles et Méthodologies générales**. Le plasmide d'expression du gène Pp1s54_38V6 a été obtenu par mutagenèse dirigée (transition T>A en position 843 de la séquence codante) en utilisant les amorces #916 et #917 à partir du plasmide contenant le gène Pp1s54_35V6. Les séquences codantes ont ensuite été transférées par « LR cloning » dans le vecteur d'expression binaire pCC0996, qui contient un fragment promoteur de 3kb de la *CINNAMATE 4-HYDROXYLASE (C4H)* d'*A. thaliana* (**Annexe 2** ; Weng et al, 2010).

Transformation d'Agrobacterium tumefaciens

La bactérie *A. tumefaciens* possède la propriété de pouvoir transférer un fragment d'ADN dans le génome de la plante *via* un ADN de transfert (ADN-T) sous forme de plasmide. Les vecteurs d'expression permettant l'expression des gènes de *P. patens* sous le contrôle du promoteur *AtC4H* ont donc été introduits dans *A. tumefaciens* (souche C58C1). La transformation s'effectue par électroporation : 20ng de plasmide purifié sont mélangés à 100 µL de bactéries électrocompétentes puis transférés dans une cuve d'électroporation de 2mm et laissés reposer sur glace pendant 15 minutes. La transformation s'opère dans un électroporateur réglé à 2,4 kV, capacité 25 µF, résistance 200 ohms. Une fois le choc électrique réalisé, les bactéries sont transférées dans un autre tube où est ajouté 1mL de LB et sont incubées à 28°C pendant 1h30. 100 µL de bactéries transformées sont ensuite étalées en stries épuisantes sur boîte rifampicine (50mg/L)-gentamycine (25mg/L)-kanamycine (50mg/L) (RGK) sachant que cette souche résiste naturellement à RG et que le plasmide confère une résistance à la kanamycine. Des colonies sont visibles deux jours après étalement.

Transformation d'Arabidopsis thaliana

La transformation d'*A. thaliana* par *A. tumefaciens* a été réalisée selon le protocole du « floral dipping » (Clough and Bent, 1998). Deux ou trois colonies sont prélevées et mises en culture liquide dans 50 mL + RGK (25-12.5-25mg/L) et incubées à 28°C sur la nuit. Après mesure de la DO, les bactéries sont culottées et reprises dans un volume approprié de solution de transformation (5% de saccharose et 0.05 % de silwet, un détergent) pour avoir un volume final

de 50ml à une DO de 0.8. Les hampes florales d'*A. thaliana* sont trempées 10 secondes dans la solution bactérienne. Les plantes sont ensuite placées en mini-serre humide et placées à l'obscurité pendant 24h. A l'issue de cette période, les plantes sont re-placées dans les conditions habituelles de culture jusqu'à l'obtention de graines T1.

Sélection des transformants

Le plasmide binaire pCC0996 utilisé pour la transformation d'*A. thaliana* confère une résistance au glufosinate, le principe actif du Basta®. Les plantes T1 transformées, i.e. qui ont intégré un ADN-T dans leur génome, ont été sélectionnées par traitement avec une solution de Basta® (25 mg/L) une semaine après semis. Le traitement est renouvelé la semaine suivante. Les plantes résistantes sont repiquées individuellement sur terre et cultivées jusqu'à l'obtention de graines T2.

Les graines T2 sont stérilisées puis semées sur milieu agar MS 255 contenant du glufosinate d'ammonium à 25 mg/L. Au bout de deux semaines, le nombre de plantules résistantes et sensibles est déterminé. Les lignées ayant intégré une seule copie de l'ADN-T présentent une ségrégation $\frac{3}{4}$ de résistants et $\frac{1}{4}$ de sensibles. Dans la mesure du possible, seules ces lignées à insertion unique ont été conservées et amenées en troisième génération (T3).

Les graines T3 sont stérilisées puis semées sur milieu MS 255 contenant du glufosinate d'ammonium à 25 mg/L. Au bout de deux semaines, les lignées ayant 100% de plantules résistantes sont identifiées, elles correspondent aux lignées homozygotes pour le transgène. En effet, une plante mère hétérozygote insertion unique pour l'ADN-T donnera $\frac{3}{4}$ de plantules résistantes et $\frac{1}{4}$ sensibles tandis qu'une plante mère homozygote donnera 100% des plantules résistantes.

Analyse des flavonoïdes

Afin de déterminer le degré de complémentation des mutants *transparent testa* par les différents gènes de *Physcomitrella patens*, j'ai réalisé des profilages métaboliques des flavonoïdes de rosettes d'*A. thaliana* âgées de 19 jours cultivées sur terre. L'échantillonnage a été effectué comme décrit dans la partie **Protocoles et Méthodologies générales**.

Les flavonoïdes ont été extraits de 10 mg de poudre végétale lyophilisée avec 1ml de méthanol 80% contenant 10 μ M de morine (standard interne). Les échantillons sont agités à 1400 rpm à température ambiante pendant 1 heure, puis centrifugés à 4°C et 13k rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est prélevé à l'aide d'une seringue et filtré sur 0.22 μ M (filtres petits volumes

RESTEK). Le surnageant filtré constitue l'extrait métabolique brut à partir duquel les analyses sont réalisées.

Les flavonoïdes sont très souvent présents sous forme conjugués, à des sucres notamment. Afin de s'affranchir de cette diversité chimique et accéder aux formes aglycones, les extraits métaboliques ont été soumis à une transestérification. Pour ce faire, 250 µL d'extrait sont mis à sec au Speedvac (Savant SPD131DDA, ThermoFischer Scientific). Les résidus secs sont ensuite repris dans 250 µL de solution de méthanolise acide composée de 2N d'HCL dans 50% de MeOH et contenant 2.5 mg/ml d'acide ascorbique (antioxydant). Après agitation pendant 5 minutes à 1400 rpm, l'hydrolyse des liaisons esters est conduite à 80°C pendant 2 heures. Après retour à température ambiante, les échantillons hydrolysés sont analysés.

L'analyse des flavonoïdes est effectuée par HPLC-PDA selon les procédures décrites dans le Matériels et Méthodes du chapitre 2.

Ingénierie métabolique de *Physcomitrella patens*

Nous avons tenté d'exprimer la voie des flavonoïdes de *Petunia inflata* dans la mousse par une approche d'ingénierie métabolique en introduisant quatre gènes – *PiCHS*, *PiCHI*, *PiF3H* et *PiCYP75A1* – dans le génome de *P. patens* par recombinaison homologue selon une stratégie « knock-in/knock-out ».

Les séquences codantes des gènes d'intérêt ont été amplifiées à partir d'ADNc issus d'ARN de *Petunia inflata* (amorces visibles en **Annexe 3**), puis clonées dans le vecteur pJET (**Annexe 2**) entre le promoteur de l'*ACTIN5* de *P. patens* et le terminateur de la *Nopaline Synthase* (NOS). Ces cassettes d'expression ont été amplifiées par PCR puis encadrées par deux fragments d'ADN génomique de *P. patens* en vue d'intégrer la cassette d'expression dans des locus ciblés par recombinaison homologue. Ces constructions génétiques ont été obtenues (1) soit en assemblant *de novo* la cassette d'expression avec deux fragments d'ADN génomique de part et d'autre par clonage GIBSON, (2) soit en utilisant des vecteurs existants contenant déjà les séquences d'ADN génomiques de *P. patens*, qui avaient préalablement été utilisés pour inactiver le gène par recombinaison homologue.

Les constructions génétiques ont été excisées grâce à des enzymes de restriction à partir de 100 µg de plasmides purifiés. Les enzymes de restriction utilisées sont *NheI* dans le cas des cassettes d'expression *pACT5:PiCHI* et *pACT5:PiF3H* ciblant respectivement les loci *PpCHI* et *PpHCT*, et *BamHI* dans le cas des cassettes d'expression *pACT5:PiCHS* et *pACT5:PiCYP75* ciblant

respectivement les loci *PpCHS* et *PpCYP98*. Les fragments d'ADN linéarisés sont ensuite purifiés après excision des bandes sur gel d'agarose 0.7%. Le mix de transformation stérile de 100µL est préparé comme décrit précédemment (**Chapitre 2**) et contient 25 µg de chacun des 4 fragments et 10 µg de plasmide de sélection pRT101.

Les lignées transgéniques ont été génotypées (selon le protocole décrit en **Chapitre 2**) pour vérifier : l'intégration des cassettes d'expression aux locus ciblés de *P. patens*, ainsi que la présence des cassettes d'expression en utilisant les amorces listées en **Annexe 3**.

REFERENCES

- Albert, N.W., Thrimawithana, A.H., McGhie, T.K., Clayton, W.A., Deroles, S.C., Schwinn, K.E., Bowman, J.L., Jordan, B.R., and Davies, K.M.** (2018). Genetic analysis of the liverwort *Marchantia polymorpha* reveals that R2R3MYB activation of flavonoid production in response to abiotic stress is an ancient character in land plants. *New Phytologist* *218*, 554–566.
- Appelhagen I, Thiedig K, Nordholt N, Schmidt N, Huep G, Sagasser M, Weisshaar B.** (2014). Update on transparent testa mutants from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of new alleles from an isogenic collection. *Planta* *240*, 955-970.
- Austin, M.B., and Noel, J.P.** (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* *20*, 79–110.
- Bell, L., Lamport, D., Butler, L., and Williams, C.** (2015). A Review of the Cognitive Effects Observed in Humans Following Acute Supplementation with Flavonoids, and Their Associated Mechanisms of Action. *Nutrients* *7*, 10290–10306.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M.** (2007). Flavonoid Accumulation in *Arabidopsis* Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *The Plant Cell Online* *19*, 148–162.
- Bloor, S.J., and Abrahams, S.** (2002). The structure of the major anthocyanin in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* *59*, 343–346.
- Bradshaw, H.D., and Schemske, D.W.** (2003). Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* *426*, 176–178.
- Carletti, G., Nervo, G., and Cattivelli, L.** (2014). Flavonoids and Melanins: A Common Strategy across Two Kingdoms. *International Journal of Biological Sciences* *10*, 1159–1170.
- Casati, P., Campi, M., Morrow, D.J., Fernandes, J.F., and Walbot, V.** (2011). Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of UV-B signaling in maize. *BMC Genomics* *12* : 321.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*: Floral dip transformation of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* *16*, 735–743.

- Cheng, A.-X., Han, X.-J., Wu, Y.-F., and Lou, H.-X.** (2014). The Function and Catalysis of 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases Involved in Plant Flavonoid Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* *15*, 1080–1095.
- Cheng, A.-X., Zhang, X., Han, X.-J., Zhang, Y.-Y., Gao, S., Liu, C.-J., and Lou, H.-X.** (2018). Identification of chalcone isomerase in the basal land plants reveals an ancient evolution of enzymatic cyclization activity for synthesis of flavonoids. *New Phytologist* *217*, 909–924.
- Choquenot, B., Couteau, C., Paparis, E., and Coiffard, L.J.M.** (2008). Quercetin and Rutin as Potential Sunscreen Agents: Determination of Efficacy by an in Vitro Method. *Journal of Natural Products* *71*, 1117–1118.
- Cock, J.M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A.E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J.-M., Badger, J.H., et al.** (2010). The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* *465*, 617–621.
- Daku, R.M., Rabbi, F., Buttigieg, J., Coulson, I.M., Horne, D., Martens, G., Ashton, N.W., and Suh, D.-Y.** (2016). PpASCL, the Physcomitrella patens Anther-Specific Chalcone Synthase-Like Enzyme Implicated in Sporopollenin Biosynthesis, Is Needed for Integrity of the Moss Spore Wall and Spore Viability. *PLOS ONE* *11*, e0146817.
- Debeaujon, I., Peeters, A.J.M., Léon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M.** (2001). The TRANSPARENT TESTA12 Gene of Arabidopsis Encodes a Multidrug Secondary Transporter-like Protein Required for Flavonoid Sequestration in Vacuoles of the Seed Coat Endothelium. *Plant Cell* *13*, 853.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2003). Proanthocyanidin-Accumulating Cells in Arabidopsis Testa: Regulation of Differentiation and Role in Seed Development. *Plant Cell* *15*, 2514.
- Deluc, L., Bogs, J., Walker, A.R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J.-M., Robinson, S.P., and Barrieu, F.** (2008). The Transcription Factor VvMYB5b Contributes to the Regulation of Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiology* *147*, 2041–2053.
- Dong, X., Braun, E.L., and Grotewold, E.** (2001). Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of Arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiology* *127*, 46–57.
- Erlund, I.** (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* *24*, 851–874.
- Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., and Casati, P.** (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* *3*: 222.
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E.L., and Grotewold, E.** (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors: Plant MYB and bHLH factors. *The Plant Journal* *66*, 94–116.
- Forkmann, G., and Martens, S.** (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology* *12*, 155–160.
- Gagné, S., Lacampagne, S., Claisse, O., and Gény, L.** (2009). Leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase gene expression and activity in flowers, young berries and skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon during development. *Plant Physiology and Biochemistry* *47*, 282–290.

- Gattuso, G., Caristi, C., Gargiulli, C., Bellocco, E., Toscano, G., and Leuzzi, U.** (2006). Flavonoid Glycosides in Bergamot Juice (*Citrus bergamia* Risso). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *54*, 3929–3935.
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G.J., and De Cooman, L.** (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycology* *50*, 483–492.
- Han, Y., Vimolmangkang, S., Soria-Guerra, R.E., Rosales-Mendoza, S., Zheng, D., Lygin, A.V., and Korban, S.S.** (2010). Ectopic Expression of Apple F3'H Genes Contributes to Anthocyanin Accumulation in the Arabidopsis tt7 Mutant Grown Under Nitrogen Stress. *Plant Physiology* *153*, 806–820.
- Harashima, S., Takano, H., Ono, K., and Takio, S.** (2004). Chalcone synthase-like gene in the liverwort, *Marchantia paleacea* var. *diptera*. *Plant Cell Reports* *23*, 167–173.
- Harris, E.S.J.** (2009). Phylogenetic and environmental lability of flavonoids in a medicinal moss. *Biochemical Systematics and Ecology* *37*, 180–192.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., and Kromhout, D.** (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer* *20*, 21–29.
- Holton, T.A., Brugliera, F., Lester, D.R., Tanaka, Y., Hyland, C.D., Menting, J.G.T., Lu, C.-Y., Farcy, E., Stevenson, T.W., and Cornish, E.C.** (1993a). Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* *366*, 276–279.
- Holton, T.A., Brugliera, F., and Tanaka, Y.** (1993b). Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* *4*, 1003–1010.
- Jiang, C., Schommer, C.K., Kim, S.Y., and Suh, D.-Y.** (2006). Cloning and characterization of chalcone synthase from the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* *67*, 2531–2540.
- Jiang, W., Yin, Q., Wu, R., Zheng, G., Liu, J., Dixon, R.A., and Pang, Y.** (2015). Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* *66*, 7165–7179.
- Kape, R., Parniske, M., Brandt, S., and Werner, D.** (1992). Isoliquiritigenin, a Strong nod Gene- and Glyceollin Resistance- Inducing Flavonoid from Soybean Root Exudate. *Applied and Environmental Microbiology* *58*, 1705–1710.
- Kim, S.S., Grienenberger, E., Lallemand, B., Colpitts, C.C., Kim, S.Y., Souza, C. de A., Geoffroy, P., Heintz, D., Krahn, D., Kaiser, M., et al.** (2010). *LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A* and *LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B* Encode Hydroxyalkyl α -Pyrone Synthases Required for Pollen Development and Sporopollenin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* *22*, 4045–4066.
- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., and Weisshaar, B.** (2012). GABI-Kat Simple Search: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* *40*, D1211–D1215.
- Kleinboelting N, Huep G, Appelhagen I, Viehoveer P, Li Y, Weisshaar B.** (2015). The structural features of thousands of T-DNA insertion sites are consistent with a double-strand break repair based insertion mechanism. *Molecular Plant* *8*, 1651–1664

- Koduri, P.K.H., Gordon, G.S., Barker, E.I., Colpitts, C.C., Ashton, N.W., and Suh, D.-Y.** (2010). Genome-wide analysis of the chalcone synthase superfamily genes of *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology* 72, 247–263.
- Koes, R., Verweij, W., and Quattrocchio, F.** (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* 10, 236–242.
- Kovinich, N., Kayanja, G., Chanoca, A., Otegui, M.S., and Grotewold, E.** (2015). Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 10, e1027850.
- Kubo, M., Imai, A., Nishiyama, T., Ishikawa, M., Sato, Y., Kurata, T., Hiwatashi, Y., Reski, R., and Hasebe, M.** (2013). System for Stable β -Estradiol-Inducible Gene Expression in the Moss *Physcomitrella patens*. *PLoS ONE* 8, e77356.
- Landry, L.G., Chapple, C.C., and Last, R.L.** (1995). *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.* 109, 1159–1166.
- Liu, Z., Tavares, R., Forsythe, E.S., André, F., Lugan, R., Jonasson, G., Boutet-Mercey, S., Tohge, T., Beilstein, M.A., Werck-Reichhart, D., et al.** (2016). Evolutionary interplay between sister cytochrome P450 genes shapes plasticity in plant metabolism. *Nature Communications* 7, 13026.
- Liu-Smith, F., and Meyskens, F.L.** (2016). Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Molecular Nutrition & Food Research* 60, 1264–1274.
- Markham, K.R., and Porter, I.J.** (1974). Flavonoids of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry* 13, 1937–1942.
- May, P., Wienkoop, S., Kempa, S., Usadel, B., Christian, N., Rupprecht, J., Weiss, J., Recuenco-Munoz, L., Ebenhoh, O., Weckwerth, W., et al.** (2008). Metabolomics and Proteomics Assisted Genome Annotation and Analysis of the Draft Metabolic Network of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179, 157–166.
- Meyer, K., Shirley, A.M., Cusumano, J.C., Bell-Lelong, D.A., and Chapple, C.** (1998). Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6619–6623.
- Mirza, B.** (2005). Influence of the nature of the T-DNA insertion region on transgene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetika* 41, 1601–1607.
- Morita, Y., Takagi, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ishiguro, K., Tanaka, Y., Nitasaka, E., Nakayama, M., Saito, N., Kagami, T., Hoshino, A., et al.** (2014). A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation. *The Plant Journal* 78, 294–304.
- Muir, S.R., Collins, G.J., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, A., De Vos, C.R., van Tunen, A.J., and Verhoeven, M.E.** (2001). Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnology* 19, 470–474.
- Negri, G., Santi, D., and Tabach, R.** (2013). Flavonol glycosides found in hydroethanolic extracts from *Tilia cordata*, a species utilized as anxiolytics. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15, 217–224.

- Ngaki, M.N., Louie, G.V., Philippe, R.N., Manning, G., Pojer, F., Bowman, M.E., Li, L., Larsen, E., Wurtele, E.S., and Noel, J.P.** (2012). Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis. *Nature* *485*, 530–533.
- Nishihara, M., Nakatsuka, T., and Yamamura, S.** (2005). Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. *FEBS Letters* *579*, 6074–6078.
- Papoutsis, K., Vuong, Q., Pristijono, P., Golding, J., Bowyer, M., Scarlett, C., and Stathopoulos, C.** (2016). Enhancing the Total Phenolic Content and Antioxidants of Lemon Pomace Aqueous Extracts by Applying UV-C Irradiation to the Dried Powder. *Foods* *5* : 55.
- Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L., and Murphy, A.S.** (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of arabidopsis. *Plant Physiology* *126*, 536–548.
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., and Vianello, A.** (2013). Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences* *14*, 14950–14973.
- Piantelli, M., Rossi, C., Iezzi, M., La Sorda, R., Iacobelli, S., Alberti, S., and Natali, P.G.** (2006). Flavonoids inhibit melanoma lung metastasis by impairing tumor cells endothelium interactions. *Journal of Cellular Physiology* *207*, 23–29.
- Pietta, P.-G.** (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* *63*, 1035–1042.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Keddie, J., Adam, L., Ratcliffe, J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., et al.** (2000). Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *290*, 2105–2110.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* *53*, 247–259.
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., and Fernie, A.R.** (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry* *72*, 21–34.
- Schlagen, K., Miosic, S., Thill, J., and Halbwirth, H.** (2010). Cloning, functional expression, and characterization of a chalcone 3-hydroxylase from *Cosmos sulphureus*. *Journal of Experimental Botany* *61*, 3451–3459.
- Schoenbohm, C., Martens, S., Eder, C., Forkmann, G., and Weisshaar, B.** (2000). Identification of the Arabidopsis thaliana Flavonoid 3'-Hydroxylase Gene and Functional Expression of the Encoded P450 Enzyme. *Biological Chemistry* *381*, 749–753.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., and Tonelli, C.** (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology* *24*, 743–755.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001) The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. *Current Opinion in Plant Biology* *4*, 447–456.
- Stracke, R., Ishihara, H., Huep, G., Barsch, A., Mehrstens, F., Niehaus, K., and Weisshaar, B.** (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls

flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling: TFs of *A. thaliana* R2R3-MYB subgroup 7. *The Plant Journal* 50, 660–677.

Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O. (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal* 48, 261–273.

Tanaka, Y., and Brugliera, F. (2013). Flower colour and cytochromes P450. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, 20120432–20120432.

Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., et al. (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor: Metabolomics and transcriptomics. *The Plant Journal* 42, 218–235.

Vauzour, D. (2014). Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology: Flavonoids and memory. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 1042–1056.

Verhoeven, M.E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., de Vos, C.H.R., and Colliver, S. (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 53, 2099–2106.

Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., Luo, J., Deng, X., Zhang, H., and Xu, J. (2017a). Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in Citrus Species. *Scientific Reports* 7.

Wang, X., Cao, J., Dai, X., Xiao, J., Wu, Y., and Wang, Q. (2017b). Total flavonoid concentrations of bryophytes from Tianmu Mountain, Zhejiang Province (China): Phylogeny and ecological factors. *PLOS ONE* 12, e0173003.

Wang, Q.-Z., Downie, S.R., and Chen, Z.-X. (2018). Genome-wide searches and molecular analyses highlight the unique evolutionary path of flavone synthase I (FNSI) in Apiaceae. *Genome* 61, 103–109.

Welle, R., Schroder, G., Schiltz, E., Grisebach, H., and Schroder, J. (1991). Induced plant responses to pathogen attack. Analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. Harosoy 63). *European Journal of Biochemistry* 196, 423–430.

Weng, J.-K., Li, X., Stout, J., and Chapple, C. (2008). Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 7887–7892.

Weng, J.-K., Mo, H., and Chapple, C. (2010). Over-expression of F5H in COMT-deficient *Arabidopsis* leads to enrichment of an unusual lignin and disruption of pollen wall formation: Lignin modification leads to male sterility. *The Plant Journal* 64, 898–911.

Wilson, K.E., Wilson, M.I., and Greenberg, B.M. (1998). Identification of the Flavonoid Glycosides that Accumulate in *Brassica napus* L. cv. Topas Specifically in Response to Ultraviolet B Radiation. *Photochemistry and Photobiology* 67, 547–553.

Wolf, L., Rizzini, L., Stracke, R., Ulm, R., and Rensing, S.A. (2010). The Molecular and Physiological Responses of *Physcomitrella patens* to Ultraviolet-B Radiation. *Plant Physiology* 153, 1123–1134.

- Yin, R., Han, K., Heller, W., Albert, A., Dobrev, P.I., Zažímalová, E., and Schäffner, A.R.** (2014). Kaempferol 3- *O* -rhamnoside-7- *O* -rhamnoside is an endogenous flavonol inhibitor of polar auxin transport in *Arabidopsis* shoots. *New Phytologist* 201, 466–475.
- Yu, D., Xu, F., Zeng, J., and Zhan, J.** (2012). Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *IUBMB Life* 64, 285–295.
- Yu, H.-N., Wang, L., Sun, B., Gao, S., Cheng, A.-X., and Lou, H.-X.** (2015). Functional characterization of a chalcone synthase from the liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. *Plant Cell Reports* 34, 233–245.
- Yu, Z.-L., Zhang, J.-G., Wang, X.-C., and Chen, J.** (2008). Excessive Copper Induces the Production of Reactive Oxygen Species, which is Mediated by Phospholipase D, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase and Antioxidant Systems. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 157–167.
- Zhang, M., Cao, J., Dai, X., Chen, X., and Wang, Q.** (2012). Flavonoid Contents and Free Radical Scavenging Activity of Extracts from Leaves, Stems, Rachis and Roots of *Dryopteris erythrosora* 7, 991-997.
- Zhao, Q., Zhang, Y., Wang, G., Hill, L., Weng, J.-K., Chen, X.-Y., Xue, H., and Martin, C.** (2016). A specialized flavone biosynthetic pathway has evolved in the medicinal plant, *Scutellaria baicalensis*. *Science Advances* 2, e1501780.
- Ziaei, S., and Halaby, R.** (2017). Dietary Isoflavones and Breast Cancer Risk. *Medicines* 4: 18.
- Zou, H., Xu, K.-P., Li, F.-S., Zou, Z.-X., Long, H.-P., Li, G., Wang, H., and Tan, G.-S.** (2013). Uncinataflavone, a new flavonoid with a methyl benzoate substituent from *Selaginella uncinata*. *Journal of Asian Natural Products Research* 15, 408–412.

DISCUSSION GENERALE

Le modèle *Physcomitrella patens*

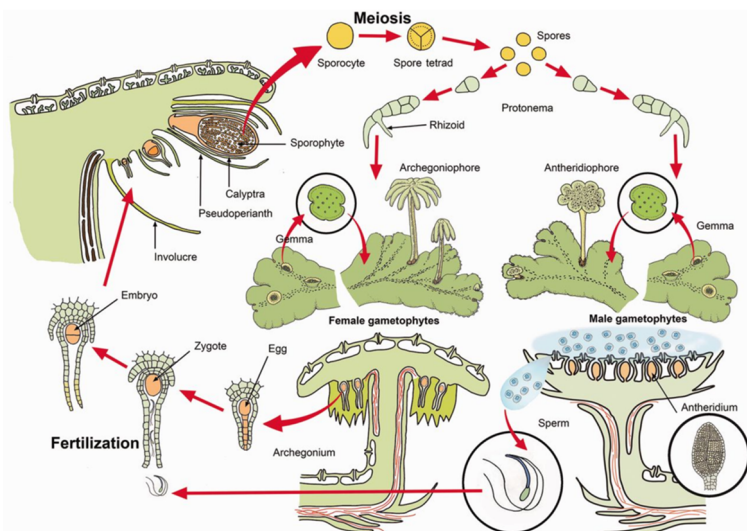
P. patens est une bryophyte modèle, de plus en plus couramment utilisée pour la recherche fondamentale et appliquée. En effet, elle présente des avantages considérables par rapport aux autres plantes modèles : haploïdie, transformation génétique par recombinaison homologue ou CRISPR-cas9, permettant un ciblage très précis de gènes, et culture en bioréacteur. Sa position phylogénétique fait de cette mousse un modèle pour l'étude des caractères ancestraux des premières plantes terrestres.

L'expression stable de transgènes et la génération d'organismes végétaux génétiquement modifiés tels que *A. thaliana*, le riz, se fait principalement par intégration d'un ADN-T, via la transformation avec *A. tumefaciens* (Clough and Bent, 1998 ; Hiei et al, 1997). Cette technique implique une intégration aléatoire du transgène qui peut avoir des effets indésirables. Par exemple, le transgène peut s'intégrer dans une région de l'ADN génomique silencieuse, résultant en une expression faible ou absente (Mirza, 2005). Il existe certaines pistes, néanmoins complexes, pour cibler le site d'intégration du transgène, par exemple en créant une cassure double brin d'une chromatide et ainsi favoriser les mécanismes de réparation par recombinaison homologue (Kumar and Fladung, 2001). *Physcomitrella patens* offre une alternative très intéressante car il est possible de cibler avec précision le site d'intégration du transgène transfecté directement dans les protoplastes, par recombinaison homologue avec une fréquence comprise entre 66 et 100% (Schaefer, 2001). Néanmoins, comme j'ai pu le constater pendant ma thèse, l'élaboration des constructions génétiques pour la transformation peut s'avérer difficile. En effet, il faut assembler le transgène avec des fragments de recombinaison homologue (d'environ 750 pb) aux extrémités 5' et 3', ce qui peut aboutir à des constructions génétiques très longues. Par exemple, dans le cas des constructions pour l'ingénierie métabolique de la voie des flavonoïdes, les cassettes d'expression avaient une longueur comprise entre 2937 et 3772 paires de bases, assemblées de part et d'autre avec 750 pb homologues, résultant en une longueur totale comprise entre 4437 et 5272 pb à cloner ensuite dans un vecteur. Ces clonages ont donc demandé beaucoup de patience, de nombreux essais, et de la mise au point, pour être réalisés. Ensuite, la co-transformation de protoplastes avec les quatre constructions n'a permis l'intégration ciblée que d'une seule cassette, dans une seule lignée. La faible proportion d'intégration peut être, là encore, due à une taille trop importante des transgènes. L'utilisation de promoteurs forts plus petits tels que l'ubiquitine-1 (899 pb chez le maïs) ou le 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (343 pb), ayant fait leurs preuves chez

P. patens, pourrait permettre de réduire la taille des cassettes d'expression (Anterola et al, 2009 ; Zhan et al, 2014).

J'ai également effectué des transformations génétiques de *P. patens* par CRISPR-cas9, qui se sont avérées très efficaces. Par exemple, pour *Ppfht*, sur onze lignées résistantes après transformation, six avaient une altération au niveau de la région génomique ciblée par l'ARN guide, aboutissant à la production d'une protéine tronquée plus courte, due à l'apparition d'un codon STOP prématuré résultant d'un décalage du cadre de lecture. Comme évoqué précédemment, la recombinaison homologue est un mécanisme de réparation d'une cassure double brin de l'ADN, utilisant la chromatide sœur intacte comme substrat pour la réparation (Kumar and Fladung, 2001 ; Weterings and Chen, 2008). Dans le cas de la transfection des protoplastes haploïdes de *P. patens*, une cassure double brin peut être réparée à partir d'un ADN exogène partageant une forte homologie. L'utilisation combinée d'un système CRISPR-Cas9, induisant une cassure double brin, et la transfection avec un ADN exogène homologue au site de cassure augmente la fréquence d'introduction ciblée du transgène (Collonnier et al, 2017). Dans ce cas, des mutations silencieuses doivent être introduites dans le PAM (5'-NGG-3') et dans la séquence reconnue par l'ARN guide pour éviter toute cassure double brin par la Cas9 après recombinaison homologue du transgène (Collonnier et al, 2017). Cette approche pourrait donc être utilisée pour générer de nouvelles lignées pour l'ingénierie métabolique.

De par sa position phylogénétique, à la base des plantes terrestres, *P. patens* est un modèle de choix pour étudier l'émergence de certains caractères chez les plantes terrestres. Néanmoins, cette approche implique de considérer qu'un nombre important de caractères ancestraux ont été retenus au cours de leur évolution. En effet, *P. patens*, comme les autres bryophytes au sens large (s.l), a divergé très tôt des autres plantes terrestres et a évolué depuis 450 millions d'années et développé des caractères propres. *Marchantia polymorpha*, une marchantiophyte modèle, est



une illustration de cette évolution puisqu'elle possède des caractéristiques bien particulières comme un thalle plat dorsiventral à croissance dichotomique (**Figure 1**) (Shimamura, 2016). Sur la face dorsale se développent des structures originales appelées corbeilles à propagules (« gemmae cup » en anglais), qui contiennent des structures haploïdes

Figure 1 : Cycle de vie de *M. polymorpha* (Shimamura, 2016)

(gemma) propagées par l'eau et générant de nouveaux individus par division cellulaire. Le génome de *M. polymorpha* a été publié récemment (Bowman et al, 2017). Les récentes analyses phylogénétiques suggèrent que le groupe des bryophytes s.l serait monophylétique, plaçant les anthocérophytes à la base, et les marchantiophytes et les mousses comme des groupes frères (Puttick et al, 2018). Néanmoins, même si les bryophytes s.l partagent des caractéristiques communes, ses membres présentent une grande diversité de morphologie, de développement et des caractéristiques propres (Harrison, 2016). C'est pour cette raison qu'il est difficile d'extrapoler des observations effectuées sur une seule espèce (*P. patens*, *M. polymorpha*) à l'ensemble des bryophytes, et encore plus à l'ensemble des premières plantes terrestres. Pour résoudre cette problématique, il est indispensable d'étudier plus de représentants des bryophytes, et d'élargir même aux plantes non spermatophytes comme les lycophytes et les ptéridophytes (Rensing, 2017). Le génome de quelques espèces est disponible comme celui d'*Anthoceros agrestis*, une anthocérophyte (Szövényi et al, 2015) ou celui de *Selaginella moellendorffii*, une lycophyte (Banks et al, 2011).

Le métabolisme phénolique ancestral

L'objectif de ma thèse était de poursuivre l'étude de la voie des phénylpropanoïdes menant aux précurseurs de la cuticule. Lorsque j'ai débuté, notre équipe était en train de caractériser PpCYP98, l'homologue de CYP98 impliqué dans la voie de biosynthèse de la lignine chez les plantes vasculaires. Nous avons pu mettre en évidence que la structuration de la cuticule était dépendante de cette voie, et notamment du caféate, mais nous ne connaissions pas encore le lien qui existait entre le caféate et les autres constituants de la cuticule, en particulier les acides gras.

En étudiant PpHCT, qui agit en amont de PpCYP98, j'ai pu mettre en évidence le même phénotype chez le mutant et j'ai montré que cette enzyme était capable de générer du *p*-coumaroyl-thréonate, substrat de PpCYP98. Néanmoins, cette voie métabolique s'est avérée plus complexe que prévue. En effet, alors que la disparition des esters caféoyl-thréonate était prévisible dans le mutant Δ PpHCT, il a été surprenant de constater une accumulation de *p*-coumaroyl-thréonate soluble, se traduisant aussi par une accumulation de résidus coumaroyle au niveau de la cuticule. Ce résultat suggère que l'accumulation des résidus *p*-coumarate que nous observons ne permet pas de compenser l'absence des résidus caféate, mettant ainsi en évidence un rôle primordial des résidus caféate dans la structuration de la cuticule. D'autre part, la présence de *p*-coumaroyl-thréonate chez le mutant Δ PpHCT indique la présence d'une

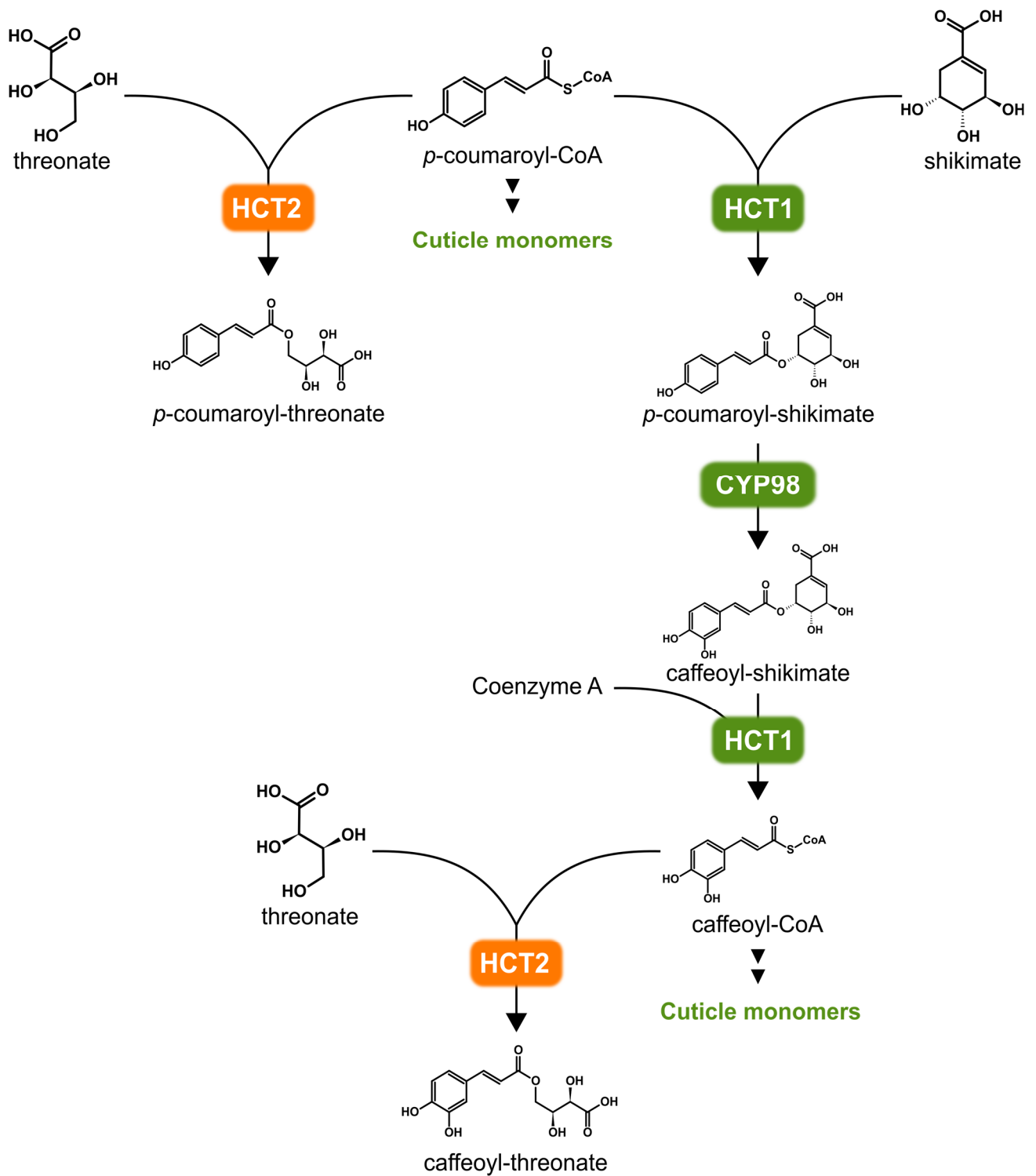


Figure 2 : Hypothèse alternative de la voie des esters phénoliques faisant intervenir une deuxième HCT (HCT2) et des esters de thréonate, et de shikimate.

deuxième hydroxycinnamoyl transférase. J'ai entrepris l'identification de l'enzyme responsable que j'ai nommée PpHCT2 (résultats non présentés).

J'ai dans un premier temps émis l'hypothèse que cette réaction était réalisée par une BAHD transférase et j'ai donc recherché d'autres BAHD transférases candidates. Alors que PpHCT (Chapitre 1) partage 60% d'identité séquence avec la protéine AtHCT, les cinq autres BAHD transférases de *P. patens*, identifiées par les séquences signature HXXXDF et DFGWG, ne partageaient que 33 à 37% d'identité de séquence avec AtHCT. Ceci signifie que l'on recherchait une enzyme capable de la même activité catalytique que PpHCT, mais qui était relativement différente au niveau de sa séquence. Parmi ces cinq BAHD, l'une était PpFHT (Chapitre 2). J'ai sélectionné deux enzymes par rapport à des analyses qPCR qui montraient une expression différentielle des gènes correspondants dans le mutant $\Delta PpHCT$ par rapport au sauvage. Le profilage métabolique des mutants correspondants et les incubations *in vitro* des deux protéines recombinantes ont été effectués mais n'ont pas permis de mettre en évidence une activité HCT2. La protéine pourrait être identifiée par une approche exhaustive, par exemple en étudiant les autres candidates BAHD de *P. patens*, ou en élargissant les recherches à d'autres classes d'acyltransférases.

Le fait que le *p*-coumaroyl-thréonate résiduel ne soit pas métabolisé en caféoyl-thréonate par PpCYP98 a suggéré deux hypothèses. Soit il existe une compartimentation différentielle des enzymes PpCYP98 et PpHCT2 qui implique que le produit de PpHCT2 est inaccessible à PpCYP98. Soit PpCYP98 ne serait capable de métaboliser *in vivo* uniquement le produit de PpHCT, qui pourrait être du *p*-coumaroyl-shikimate si on se fie aux données de cinétiques enzymatiques de PpHCT *in vitro* qui montrent une très nette préférence pour le shikimate. Le couple PpHCT/PpCYP98 serait alors responsable de la biosynthèse de caféoyl-CoA, faisant intervenir des esters de shikimate. PpHCT2 serait ensuite capable de transférer le caféate d'une partie du caféoyl-shikimate ou du caféoyl-CoA résultant sur le thréonate pour produire du caféoyl-thréonate. Cette hypothèse (**Figure 2**) pourrait alors expliquer pourquoi il n'y a plus de caféoyl-thréonate chez le mutant $\Delta PpHCT$. Le caféoyl-thréonate résultant pourrait alors jouer le rôle d'antioxydant soluble, à l'instar de l'acide chlorogénique qui s'accumule chez certaines plantes vasculaires. Une troisième explication possible serait un couplage obligatoire de PpHCT et PpCYP98 pour la canalisation des intermédiaires métaboliques.

L'étude des composés phénoliques la cuticule

Contrairement à la cuticule des plantes vasculaires, la cuticule de *P. patens* contient une plus forte proportion de composés phénoliques. *P. patens* est donc un bon modèle pour étudier l'impact de ces molécules sur la structuration de la cuticule. Nous avons mis en évidence PpFHT, une BAHD transférase qui fait le lien entre le métabolisme des phénylpropanoïdes et le métabolisme des acides gras, fournissant des précurseurs aliphatiques de cutine.

La caractérisation de PpFHT met pour la première fois en évidence une altération sévère de la cuticule due à l'absence d'un ester phénolique d'acide gras. Chez *A. thaliana*, le mutant *Atdcf* n'a pas de phénotype particulier, probablement parce que les composés phénoliques ne sont pas indispensables à la structuration de la cuticule.

Il reste encore beaucoup de choses à découvrir sur l'impact des composés phénoliques, et principalement du caféate sur la structuration de la cuticule chez *P. patens*. Par exemple, le caféate est probablement intégré sous d'autres formes que le cafeoyl-palmitate. L'analyse de la composition en monomères de cutine pourrait répondre à cette question. En effet, la présence résiduelle de caféate dans la cuticule de *Ppfmt* signifierait alors qu'il est aussi incorporé sous d'autres formes et impliquerait également d'autres enzymes. De plus, il semble possible que le caféate soit impliqué dans l'accrochage du polymère de cutine sur la paroi cellulaire. Ceci reste cependant à démontrer.

Perspectives

Si je pouvais poursuivre les recherches sur ce sujet, je me concentrerais en priorité sur la caractérisation d'une autre BAHD transférase PpFHT2, co-exprimée avec PpFHT et dont le mutant présente un phénotype similaire à *Ppfmt*. Comme je pense qu'elle pourrait être impliquée dans l'accrochage de la cuticule sur la pectine, l'observation de la couche cuticulaire au microscope pourrait être très intéressante. Je testerai également d'autres substrats *in vitro* tels que des monomères de pectines comme accepteurs d'acyles. Je générerais un double mutant *Ppfmt/Ppfmt2*. Cette enzyme revêt d'autant plus d'intérêt que son homologue chez *A. thaliana* n'est pas encore caractérisé.

En ce qui concerne le métabolisme des flavonoïdes, j'approfondirais les recherches sur les deux gènes homologues de CYP75B1 (*Pp1s1_111V6* et *Pp1s98_58V6*) qui complètent le mutant *tt7* d'*A. thaliana*. Dans un premier temps, je caractériserais le produit non identifié (issu de la

méthanolyse acide) et j'effectuerais des incubations *in vitro* des enzymes recombinantes. Je testerais tout un panel de flavonoïdes et également des chalcones pour mettre en évidence une activité F3'H, mais peut être aussi des activités F3'5'H ou FNSII. Enfin, afin de caractériser les produits *in vivo* de ces enzymes, je produirais les mutants de *P. patens* correspondants. Enfin, je réaliserai un profilage métabolique des mousses après traitement aux rayonnements UV.

En parallèle de ces deux projets principaux, je me dégagerais du temps pour identifier PpHCT2. J'adopterais une démarche exhaustive : je clonerais et testerais les treize enzymes identifiées comme BAHD, *in silico* sur la base de leur annotation PFAM PF02458 (<http://pfam.xfam.org>).

Enfin, il serait intéressant d'élargir l'étude de HCT et FHT à d'autres modèles, par exemple en étudiant les homologues chez d'autres bryophytes ou chez les algues.

Conclusion

En utilisant *P. patens* comme modèle, mes travaux de thèse ont montré que le métabolisme phénolique existe déjà chez les bryophytes et qu'il a un rôle primordial dans la structuration de la cuticule, essentielle au développement du gamétophore et lui conférant son imperméabilité.

REFERENCES

- Anterola, A., Shanle, E., Perroud, P.-F., and Quatrano, R.** (2009). Production of taxa-4(5),11(12)-diene by transgenic *Physcomitrella patens*. *Transgenic Research* 18, 655–660.
- Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V.A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B.A., et al.** (2011). The *Selaginella* Genome Identifies Genetic Changes Associated with the Evolution of Vascular Plants. *Science* 332, 960–963.
- Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., et al.** (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* 171, 287-304.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*: Floral dip transformation of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 16, 735–743.
- Collonnier, C., Guyon-Debast, A., Maclot, F., Mara, K., Charlot, F., and Nogu , F.** (2017). Towards mastering CRISPR-induced gene knock-in in plants: Survey of key features and focus on the model *Physcomitrella patens*. *Methods* 121–122, 103–117.
- Jill Harrison, C.** (2017). Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372, 20150490.
- Hiei, Y., Komari, T., and Kubo, T.** (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35, 205–218.
- Kumar, S., and Fladung, M.** (2001). Controlling transgene integration in plants. *Trends in Plant Science* 6, 155–159.
- Mirza, B.** (2005). Influence of the nature of the T-DNA insertion region on transgene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetika* 41, 1601–1607.
- Puttick, M.N., Morris, J.L., Williams, T.A., Cox, C.J., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C.H., Schneider, H., Pisani, D., et al.** (2018). The Interrelationships of Land Plants and the Nature of the Ancestral Embryophyte. *Current Biology* 28, 733-745.
- Rensing, S.A.** (2017). Why we need more non-seed plant models. *New Phytologist* 216, 355–360.
- Schaefer, D.G.** (2001). Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Current opinion in plant biology* 4, 143-150.
- Shimamura, M.** (2016). *Marchantia polymorpha* : Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant and Cell Physiology* 57, 230–256.
- Sz v nyi, P., Frangedakis, E., Ricca, M., Quandt, D., Wicke, S., and Langdale, J.A.** (2015). Establishment of *Anthoceros agrestis* as a model species for studying the biology of hornworts. *BMC Plant Biology* 15 : 98.
- Weterings, E., and Chen, D.J.** (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Research* 18, 114–124.
- Zhan, X., Zhang, Y.-H., Chen, D.-F., and Simonsen, H.T.** (2014). Metabolic engineering of

the moss *Physcomitrella patens* to produce the sesquiterpenoids patchoulol and α/β -santalene. *Frontiers in Plant Science* 5: 636.

PROTOCOLES ET METHODOLOGIES GENERALES

Amplification d'ADN pour clonage

I. Conception des amorces

a. Amorces simples

Clonage blunt-end

Les amorces sont dessinées via l'outil en ligne primer3plus (<http://primer3.ut.ee/>).

b. Amorces avec extension

Clonage Gateway

Les sites *attB1* et *attB2* sont ajoutés aux extrémités 5' des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification du gène d'intérêt (**Annexe 3**), préalablement dessinées via l'outil en ligne primer 3plus (<http://primer3.ut.ee/>). Pour l'amorce sens, on ajoute deux nucléotides entre *attB1* et la séquence spécifique du gène pour garder le cadre de lecture dans le cas où le vecteur de destination permet l'ajout d'un tag à l'extrémité N-terminale de la protéine (cas du vecteur pHGWA), et pour l'amorce anti-sens on ajoute 1 nucléotide entre la séquence *attB2* et la séquence spécifique du gène sans le codon STOP, dans le cas de l'ajout d'un tag à l'extrémité C-terminale. Le programme PCR comprend 5 cycles avec une température d'hybridation adaptée (un T_m correspondant) à la partie de l'amorce qui s'hybride à la matrice d'amplification (ADNg, ADNc, plasmide), puis la température d'hybridation des 27 cycles suivants est celle de l'amorce complète, c'est-à-dire 72°C.

Clonage Gibson

Les amorces pour le clonage Gibson sont choisies grâce à l'outil en ligne NEBuilder Assembly Tool (<http://nebuilder.neb.com>). Les amorces ont des extensions spécifiques aux séquences adjacentes avec lesquelles elles doivent s'assembler, qu'on appelle séquences chevauchantes. Le plasmide pGEM-T est linéarisé par PCR en utilisant les amorces #55 et #56 **en Annexe 3**. Les fragments d'ADN à assembler sont amplifiés selon le même programme PCR que pour le clonage Gateway.

2. Amplification par PCR

Les fragments d'ADN pour les clonages sont amplifiés en utilisant le mix Phusion High-Fidelity (ThermoFischer Scientific), selon le protocole décrit en **Annexe 4**. Les températures d'hybridation des amorces (T_m), sont définies à partir de l'outil en ligne T_m Calculator (<https://www.thermofisher.com>).

3. Purification

5 μ l de la réaction PCR sont déposés sur gel d'agarose (TAE 1x + 1% agarose), puis visualisés sous UV après migration et coloration au BET. Dans le cas où il n'y a pas d'amplifications aspécifiques, l'ADN est purifié directement à partir de la réaction PCR en utilisant le kit PCR clean-up (Macherey-Nagel) sur les 45 μ l restants. S'il y a une bande aspécifique, les 45 μ L de réaction PCR restants sont déposés sur gel et, après électrophorèse, la bande d'intérêt est découpée à partir du gel. L'ADN est ensuite purifié à partir de la bande de gel, en utilisant le kit PCR clean-up (Macherey-Nagel). L'échantillon est ensuite quantifié au Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Les clonages

I. Clonage Gateway

Le clonage Gateway repose sur la recombinaison homologue entre des sites particuliers : *attB1-attB2* d'une séquence à cloner et les sites *attP1-attP2* d'un vecteur d'entrée qu'on appelle communément pDONR. Il existe de nombreux vecteurs pDONR qui diffèrent entre eux par la résistance qu'ils confèrent contre les antibiotiques. Lors de ma thèse, j'ai essentiellement utilisé le pDONR/Zeoicin (**Annexe 2B**). Cette première recombinaison appelée « BP cloning » permet d'obtenir un vecteur d'entrée, contenant la séquence d'intérêt ainsi que de nouveaux sites de recombinaison (*attL1* et *attL2*). L'étape suivante de « LR cloning » effectue la recombinaison entre le vecteur d'entrée et un vecteur de destination. Le vecteur résultant permet l'expression du gène d'intérêt dans différents organismes comme par exemple *E. coli* ou *Arabidopsis thaliana*.

La réaction de clonage s'effectue selon le protocole suivant :

Bp cloning		LR cloning	
Gène d'intérêt	0.03 pmoles	Vecteur d'entrée (pDONR)	0.09 pmoles
pDONR	0.03 pmoles	Vecteur d'expression	0.03 pmoles
BP clonase II	1 µL	LR clonase II	1 µL
Tampon Tris-EDTA, pH 8	Qsp 5µl	Tampon Tris-EDTA, pH 8	Qsp 5µl

La réaction est incubée 2h à température ambiante. Pour augmenter l'efficacité de la recombinaison, une incubation sur la nuit est possible. Pour améliorer la transformation des bactéries ensuite, on peut arrêter la réaction avec 0.5µl de protéinase K et incuber 10 min à 37°C, ce qui permet de séparer les enzymes de l'ADN et d'améliorer la pénétration du plasmide dans les bactéries.

2. Clonage GIBSON

Le clonage Gibson permet l'assemblage de plusieurs fragments d'ADN ensemble, grâce à un mix d'exonucléases, d'ADN polymérases et de ligases (**Figure 1**). Les fragments à assembler possédant les extensions Gibson sont incubés avec le plasmide pGEM-T linéarisé par PCR et le mix 2X Gibson Assembly (NEB). Le mix réactionnel comprend 0.1 pmole de vecteur linéarisé par PCR (ou par enzymes de restriction), 0.3 pmole de chaque fragment à assembler, 5µL de mix 2X Gibson Assembly, et un volume d'H₂O pour compléter à un volume final de 10µL. La réaction est incubée à 50°C pendant une heure, le mix est ensuite utilisé directement pour la transformation bactérienne.

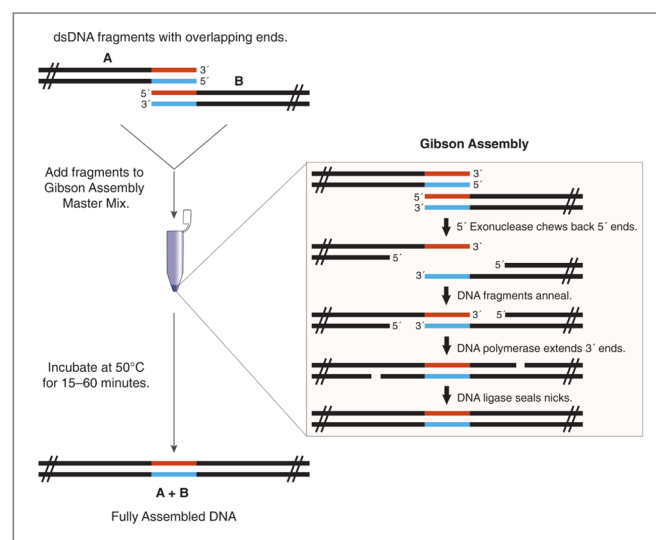


Figure 1 : Principe du clonage Gibson (Gibson Assembly Master Mix, Instruction Manual).

3. Clonage bouts francs (Blunt-end)

Le clonage bouts francs ou Blunt-end concerne la ligation d'un fragment d'ADN à extrémités franches dans un vecteur linéarisé. Le fragment d'ADN est produit par des enzymes qui génèrent des extrémités franches, soit par amplification PCR (Phusion, Phire), soit par restriction (exemple *SmaI*). La première étape consiste en la phosphorylation de l'insert par le protocole suivant : 0.06 pmoles d'ADN, 0.5 µL de 10X « ligation buffer » contenant de l'ATP, 0.25 µL de T4 Polynucleotide Kinase (ThermoFischer Scientific), H₂O qsp 5µL sont incubés à 37°C pendant 20 minutes, puis à 75°C pendant 10 minutes pour inactiver l'enzyme. La deuxième étape consiste en la ligation de l'insert dans le vecteur. Le mix suivant est ajouté à la réaction précédente : 0.02 pmoles de vecteur linéarisé par PCR, 0.5µL de 10X « ligation buffer », 0.5 µL de T4 DNA ligase (ThermoFischer Scientific), H₂O qsp 10µL finaux, puis la réaction est incubée à 22°C pendant 2h (ou 15°C si incubation sur la nuit). 5µL de la réaction sont ensuite utilisés pour la transformation bactérienne.

Production de plasmides

I. Transformations bactériennes

Un volume de réaction de clonage est utilisé pour la transformation de 50µL de bactéries DH5α chimiocompétentes : les bactéries décongelées sont incubées avec la réaction de clonage pendant 10 min sur glace, puis subissent un choc thermique au bain-marie à 42°C pendant 1 min, sont laissées 2 min sur glace. Après ajout de 1ml de LB, les bactéries sont incubées pendant 1h à 37°C, centrifugées à 5000 rpm pendant 1 min. Le culot est repris dans 100µL de LB, puis étalé sur milieu LB sélectif solide contenant l'antibiotique en concentration appropriée (**Annexe 5**) en conditions stériles. Après incubation sur la nuit à 37°C, les colonies ayant intégré le plasmide sont visibles sur la boîte.

2. Vérification du clonage et séquençage du plasmide

a. PCR sur colonies

Chaque colonie est prélevée puis étalée sur une 2nd boîte avec milieu LB sélectif. Le cône utilisé pour le transfert est trempé dans une réaction PCR décrite en **Annexe 4**. Après migration des produits PCR par électrophorèse, le gel d'agarose est coloré dans un bain de BET (1%), puis

observé dans un Gel Doc. Les colonies positives sont identifiées grâce aux produits PCR ayant la taille attendue.

b. Purification de plasmides

Les colonies ayant intégré le plasmide sont mises en culture liquide par inoculation dans 5ml de LB sélectif, et agitation sur la nuit à 37°C. Le lendemain, les plasmides sont purifiés en utilisant le kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-nagel).

c. Séquençage du plasmide

Le séquençage d'ADN Sanger est réalisé sur la plateforme de séquençage de l'IBMP par Malek Alioua et Sandrine Koechler.

Analyses métaboliques

I. Préparation des échantillons

*a. Echantillons de *P. patens**

Les gamétophores ou protonema de *P. patens* utilisés pour des extractions métaboliques ont été cultivés en milieu liquide (**c.f Chapitre 1**). Une semaine après le renouvellement de milieu, le matériel végétal est récolté par filtration sur une membrane en nylon à pores de 100µM, puis transféré sur du papier absorbant pour enlever le maximum de liquide. Le matériel est ensuite transféré dans des tubes 2mL ou Falcon 50mL en fonction de la quantité, et congelés rapidement dans l'azote liquide. Les échantillons congelés sont ensuite placés dans un lyophilisateur durant 48h, permettant ainsi de les sécher complètement. Les échantillons secs sont transférés avec deux billes en métal dans des tubes 2ml, puis broyés à l'aide d'un TissueLyser II (Qiagen) pendant 2 cycles de 30sc.

*b. Echantillons d'*A. thaliana**

Les rosettes d'*A. thaliana* sont récoltées 19 jours après le semis des graines en terre. Après avoir coupé les racines, les parties aériennes sont congelées, lyophilisées et broyées jusqu'à l'obtention d'une fine poudre selon la même procédure que pour *P. patens*.

2. Extraction des métabolites

1 ml de MeOH 80% est utilisé pour l'extraction des métabolites de 10mg de poudre d'échantillon végétal. Le solvant d'extraction contient 10 μ M de standard interne : morine pour les analyses en chromatographie liquide, et ribitol pour les analyses en chromatographie gazeuse (**c.f Chapitre 1**). L'extraction est réalisée par agitation à 1400 rpm à température ambiante pendant 1 heure. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C à v_{max} pendant 15 minutes. Le surnageant est prélevé à l'aide d'une seringue 1ml et filtré sur 0.22 μ M (filtres 0.22 μ M petits volumes, RESTEK). Il est ensuite transféré dans des flacons de LC pour injection.

3. Méthanolyse acide

250 μ L d'extrait sont mis à sec au Speedvac (Savant SPD131DDA, ThermoFischer Scientific). 250 μ L d'une solution de méthanolyse acide composée de 2N d'HCL dans 50% de MeOH contenant 2.5 mg/ml d'acide ascorbique sont ensuite ajoutés et l'échantillon est agité 5 minutes à 1400 rpm, puis incubé à 80°C pendant 2 heures. L'échantillon est refroidi à température ambiante puis transféré dans des flacons de LC pour injection.

4. Analyses chromatographiques

a. Chromatographie liquide HPLC-UV

La séparation et la détection s'effectuent par une chromatographie liquide à haute pression, HPLC 2695 (Waters), couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes (PDA 2996, Waters). La colonne est une Kinetex Core-Shell Technology (Phenomenex) de type C18 de dimensions 100 mm x 4.60 mm, composée de particules de 2.6 μ m de diamètre, de tailles de pores de 100 Å. La phase mobile est composée d'H₂O + 0.1% d'acide formique (solvant A) et d'Acétonitrile (ACN) + 0.1% d'acide formique (solvant B). L'aiguille et la boucle d'injection sont rincées après chaque échantillon successivement avec une solution Weak (95% H₂O/5% ACN) et Strong (95% ACN/5% H₂O). L'élution des molécules est réalisée selon le programme suivant : 0 min-95% A ; 15 min- 5% A ; 17 min – 5% A ; 18 min- 95% A ; 20 min- 95% A. De 0 à 15 minutes, la composition du solvant évolue selon une courbe de type 8 (**Figure 2**). Le flux est

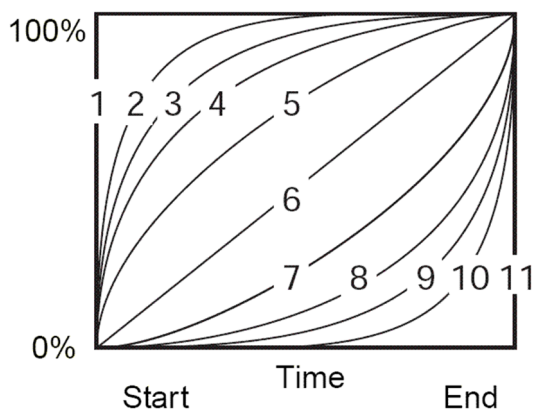


Figure 2: Courbes de gradient en chromatographie liquide.

de 1 ml/min, la température de colonne à 28°C. Le détecteur enregistre les longueurs d'onde entre 200 et 600nm. Les données sont traitées avec le logiciel Empower 3.

b. Chromatographie liquide UPLC-MS/MS

La séparation et la détection s'effectuent par une chromatographie liquide à haute pression, UPLC Acquity (Waters), couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes PDA et un spectromètre de masse Quattro Premier XE Micromass (Waters). La colonne est une Acquity UPLC (Waters) de type C18-BEH de dimensions 100 mm x 2.1 mm, composée de particules de 1.7 µm de diamètre, de tailles de pores 130 Å. La phase mobile est composée d'H₂O + 0.1% d'acide formique (solvant A) et d'Acétonitrile (ACN) + 0.1% d'acide formique (solvant B). L'aiguille et la boucle d'injection sont rincées après chaque échantillon successivement avec solution Weak (95% H₂O/5% ACN) et Strong (95% ACN/5% H₂O). Le gradient de séparation dure 20 minutes selon ce programme : 0 min-98% A ; 1.5 min-98% A ; 16 min- 50% A ; 16.5 min – 0% A ; 18 min- 0% A ; 18.5 min- 98% A ; 20 min- 98% A. De 1.5 à 16 minutes, la composition du solvant évolue selon une courbe de type 6 (**Figure 2**). Le flux est de 0.350 ml/min, la température de colonne à 28°C. Après la séparation, le spectromètre de masse permet d'ioniser les molécules et mesure la masse sur charge (m/z) de l'ion. Le mode d'ionisation utilisé est l'électrospray positif (ESI+) qui ionise les molécules en ajoutant généralement un proton (H⁺), donc la masse détectée est la masse molaire de la molécule + 1 (celle du proton). Le spectromètre de masse a été paramétré comme suit : le flux de gaz du nébuliseur (azote) a été réglé à 50 L/h, et le débit de gaz de désolvatation a été réglé à 900 L/h. La température de l'interface a été réglée à 400°C, et la température de la source à 135°C. La tension capillaire a été réglée à 3,4 kV.

Plusieurs modes de détection ont été utilisés :

- Scan : détection non ciblée de tous les m/z de l'échantillon
- Single Ion Recording (SIR) : détection d'une m/z donnée
- Selected Reaction Monitoring (SRM) : détection d'une m/z donnée (ion parent) et d'un ion fils donné issu de sa fragmentation

Les signaux résultants de ces détections sont les pics du chromatogramme, qui sont proportionnels à la concentration de la molécule dans l'échantillon, mais également de la capacité de la molécule à s'ioniser. L'intensité de ces signaux n'est donc pas comparable entre deux molécules différentes.

Les données sont traitées avec le logiciel MassLynx. La quantification des métabolites dans les extraits végétaux a été effectuée par la mesure du signal de leur transition SRM (**Annexe 6**), correspondant à l'aire du pic. Ces aires ont été normalisées par comparaison de l'aire du standard interne (morine) dans l'échantillon avec l'aire dans le blanc d'extraction.

5. Développement des méthodes de détection en spectrométrie de masse (MS/MS)

En spectrométrie de masse en tandem, on utilise deux analyseurs en tandem, généralement deux quadripôles séparés par une cellule de collision permettant de fragmenter la molécule à analyser. La molécule est ionisée puis est analysée dans le premier quadripôle, puis fragmentée dans la cellule de collision du deuxième quadripôle, et enfin les ions issus de la fragmentation (ions fils) sont analysés dans le troisième quadripôle. La détection en mode Selected Reaction Monitoring (SRM) permet de choisir l'ion parent qui entrera dans le premier quadripôle, est également l'ion fils qui entrera dans le deuxième quadripôle, fournissant ainsi une détection ciblée de la molécule d'intérêt. Le développement de méthode de détection SRM en quatre étapes :

- Recherche de la masse précise de l'ion parent par un Scan (ESI+ de 100 à 600 m/z)
- Détection en mode Single Ion Recording (SIR) en utilisant la masse de l'ion parent et en testant différentes tensions de cônes (CV en Volts) pour trouver l'ionisation qui donne le meilleur signal (ici CV testés 10 ; 11 ; 12 ; 13 V)
- Un mode Daughter Scan (DGS) avec différentes énergies de collision (CE en electron Volts) pour identifier l'ion fils majoritaire ainsi que la CE pour laquelle il a la meilleure intensité (ici CE testés 5 ; 10 ; 15 eV, puis 13 ; 15 ; 17)

- La masse de l'ion parent, et de l'ion fils majoritaires sont connus, et la tension de cône et l'énergie de collision ont été optimisés. Le métabolite peut maintenant être détecté en mode SRM qui recherche une transition spécifique d'un ion parent à un ion fils. Généralement noté MRM : $M_{\text{ion parent}} > M_{\text{ion fils}}$

Ces analyses ont permis d'établir les paramètres de détections optimaux pour les produits issus de l'incubation avec les acyl-CoA et les 16-hydroxypalmitate par MpFHT (**Chapitre 2**) (**Tableau 1**).

	$M_{\text{ion parent}}$	CV (V)	$M_{\text{ion fils}}$	CE (eV)	RT (min)
Coumaroyl-palmitate	419,13	13	146,84	13	7,44
Caffeoyl-palmitate	435,13	13	162,86	13	6,52
Feruloyl-palmitate	449,11	13	176,84	17	7,84

Tableau 1 : Paramètres de détection en spectrométrie de masse electrospray + (ESI +) des produits issus de l'incubation d'acyl-CoA et du 16-hydroxypalmitate.

Les ions fils obtenus correspondent à la masse de la partie hydroxycinnamoyle de chaque molécule, suggérant une fragmentation de la molécule au niveau de la liaison ester qui se trouve entre la partie hydroxycinnamoyle et l'acide gras. En revanche, les esters d'hexadecanol n'ont pas pu être détectés en Scan, sûrement dû à un problème d'ionisation de la molécule. En effet l'hexadecanol est dépourvu de fonction acide carboxylique, facilement ionisable en ESI+.

Analyse de l'expression génique

I. Extraction des ARN

1 ml de TRI Reagent (Sigma-Aldrich) est ajouté à 10 mg de matériel végétal sec en poudre, puis agités à 1400 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 13k rpm à 4°C pendant 10 minutes, le surnageant est transféré dans un nouveau tube, auquel sont ajoutés 200µL de chloroforme. Le tout est agité quelques secondes puis laissé reposer pendant 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 13k rpm à température ambiante pendant 15 minutes, la phase supérieure aqueuse est prélevée ($\approx 425\mu\text{L}$). Les acides nucléiques sont précipités par ajout de 0.1 volume d'acétate de sodium (NaOAc 3M pH 5.2) et de 2.5 volumes d'EtOH absolu, et incubation à -20°C pendant 2 heures. Les échantillons sont ensuite centrifugés à vitesse maximale à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 mL d'EtOH 70%. Après centrifugation à 13k rpm à 4°C pendant 15 minutes, le

maximum de surnageant est éliminé et les culots sont séchés à température ambiante pendant 10 minutes, puis repris dans 15 μL d' H_2O traitée DEPC autoclavée. 3 μL sont prélevés : 1 μL pour le dosage des acides nucléiques au Nanodrop et 2 μL pour une électrophorèse afin de vérifier l'intégrité des acides nucléiques. Les ARN intacts forment deux bandes distinctes d'ARN 18S et 28S tandis que les ARN dégradés forment un « smear ».

2. Traitement à la DNase

Les 12 μL de solution d'ARN totaux restante sont traités à la DNase pour digérer l'ADN génomique contaminant en utilisant le protocole suivant : 2 μL de tampon RQ1 DNase I, 2 μL de RQ1 DNase I (Promega), 3 μL d' H_2O , 1 μL de RNaseOUT™ (ThermoFischer Scientific) pour atteindre un volume final de 20 μL . L'échantillon est incubé à 37°C pendant 30 minutes.

480 μL d' H_2O DEPC, puis 500 μL de Phénol-Chloroforme (1/1) sont ajoutés à l'échantillon, puis vortexés. Après centrifugation à 13k rpm à température ambiante pendant 15 minutes, la phase supérieure aqueuse est prélevée et transférée dans un nouveau tube. Les ARN sont précipités par l'ajout de 0.1 volume d'acétate de sodium (NaOAc 3M pH 5.2) et de 2.5 volumes d'EtOH absolu, et incubation à -20°C pendant 2 heures. Après centrifugation à 13k rpm à 4°C pendant 15 minutes, le maximum de surnageant est retiré et les culots sont séchés à température ambiante pendant 10 minutes. Les culots sont repris dans 11 μL d' H_2O traitée DEPC autoclavée. 3 μL sont prélevés : 1 μL pour le dosage des acides nucléiques au Nanodrop et 2 μL pour une électrophorèse afin de vérifier l'intégrité des acides nucléiques.

3. Rétrotranscription des ARN en ADNc

Les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc qui seront utilisés pour l'analyse en qPCR. La première étape consiste en la dénaturation des ARN afin d'éliminer les structures secondaires, selon le protocole suivant : 1 μL d'oligoDT 50 μM , 1 μL de dNTP 10mM, 500 ng d'ARN et 3 μL d' H_2O DEPC sont incubés 5 minutes à 65°C puis sur glace pendant 2 minutes. La deuxième étape est la rétrotranscription : 4 μL de 5x First Strand buffer, 1 μL de DTT (0.1 M), 1 μL de RNase OUT (ThermoFischer Scientific) et 1 μL de Superscript III (ThermoFischer Scientific) sont ajoutés à la réaction précédente puis incubés à 50°C pendant 45 minutes, puis à 80°C pendant 10 minutes pour la dénaturation des enzymes. Le volume final de réaction est de 20 μL . Les échantillons sont dilués avec H_2O DEPC pour atteindre une concentration de 10 ng ADNc/ μL .

ANNEXE I : SOLUTIONS DE LABORATOIRE

Milieux de culture

Milieu KNOP (Reski and Abel, 1985): Préparer les solutions mères suivantes : 25 g/l KH_2PO_4 , 25 g/l KCl, 25 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 100 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et stériliser à l'autoclave. Pour obtenir 1 l de milieu Knop, prendre 10 ml de chaque solution mère, ajouter 12,5 mg de $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, ajuster le pH à 5,8 avec du KOH ou du HCl. Pour la préparation de milieu solide, ajouter 1,2 % (p/v) de gélose (Oxoid Ltd., Angleterre). Stériliser le milieu par autoclavage.

Milieu MS 255 : Dissoudre 4.9 g de milieu Murashige et Skoog avec vitamines MO255.0010 (Duchefa) dans 1 L de H_2O , ajuster le pH à 5.8 avec HCL, ajouter 10g d'Agar (Sigma). Stériliser à l'autoclave.

Milieux nécessaires à la transfection de protoplastes de P. patens

Milieu 3M : Dissoudre 3,05 g de MgCl_2 , 1 g de MES (acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique), 87,4 g de mannitol dans 800 ml de H_2O , ajuster le pH à 5,6 avec du KOH. Stériliser à l'autoclave.

PEG 40% : Peser 10g de PEG 4000 et ajouter du milieu 3M jusqu'à 25 mL, puis stériliser par filtration.

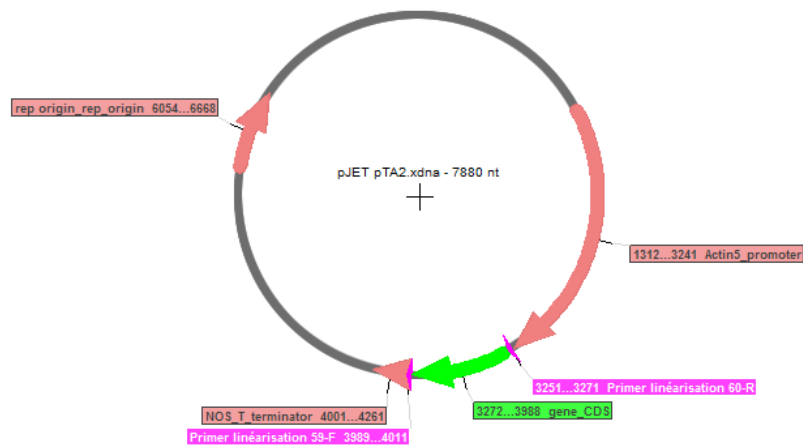
Milieu de régénération : Pour 1 l, utiliser 10 ml de chaque solution mère décrite pour la préparation du milieu Knop (184 mM KH_2PO_4 , 336 mM KCl, 102 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 424 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), ajouter 12,5 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, ajouter 50 g de glucose, ajouter 30 g de mannitol, ajuster le pH à 5,8 avec KOH. Ajuster l'osmolarité à environ 540 mOs à l'aide de mannitol. Filtrer stériliser à travers un filtre de 0,22 μm .

Milieux nécessaires à l'extraction d'ADN génomique

Tampon d'extraction d'ADN 10x : Pour préparer 1 L dissoudre 90,86 g de Tris, 26,43 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 ml de Tween 20 dans 800 ml de H_2O , ajuster le pH à 8,8 avec HCl ; avant utilisation, diluer 1:10 avec H_2O .

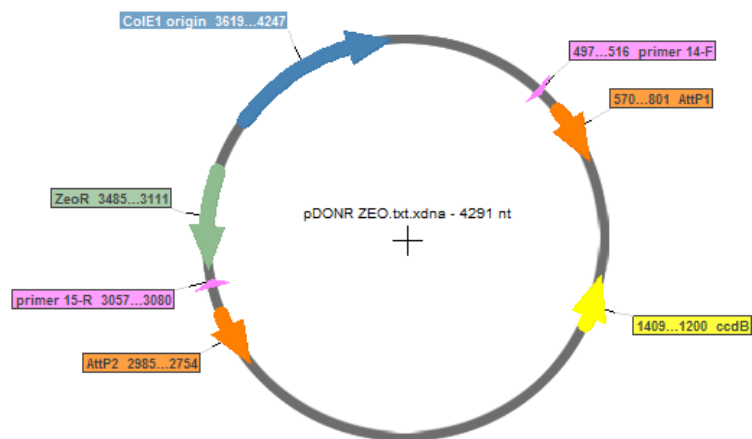
Shorty buffer : Mélanger 100 ml de 1M Tris-HCL (pH 9.0), 100 ml 2M LiCl, 25 ml de 0.5M EDTA, 50 ml 10% SDS, compléter à 500 ml avec H_2O .

ANNEXE 2 : VECTEURS



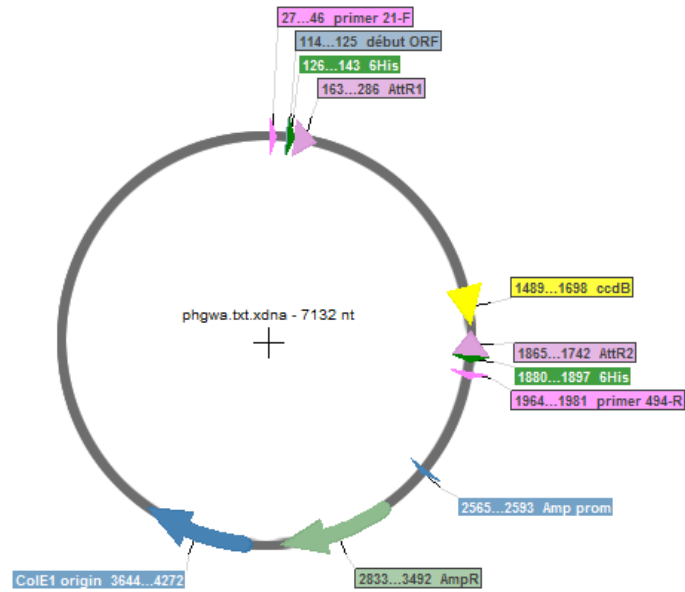
A : Plasmide pJET contenant le promoteur PpAct5.

Des cassettes d'expression ont été construites par clonage des séquences codantes des gènes de *P. inflata* entre le promoteur PpACTIN5 et le terminateur NOS. Il peut être propagé par *E. coli* sur milieu sélectif ampicilline.

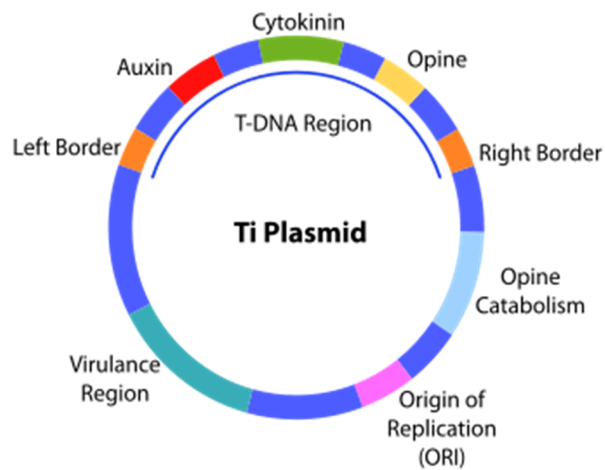


B : Plasmide pDONR-zeocine utilisé pour clonage Gateway.

La recombinaison s'effectue entre les sites attB du fragment à cloner, et les sites attP du plasmide pDONR-zeocine. La PCR sur colonies de bactéries pour vérification du clonage s'effectue en utilisant les primers #14 et #15, avant d'utiliser ces mêmes primers pour le séquençage du plasmide purifié.

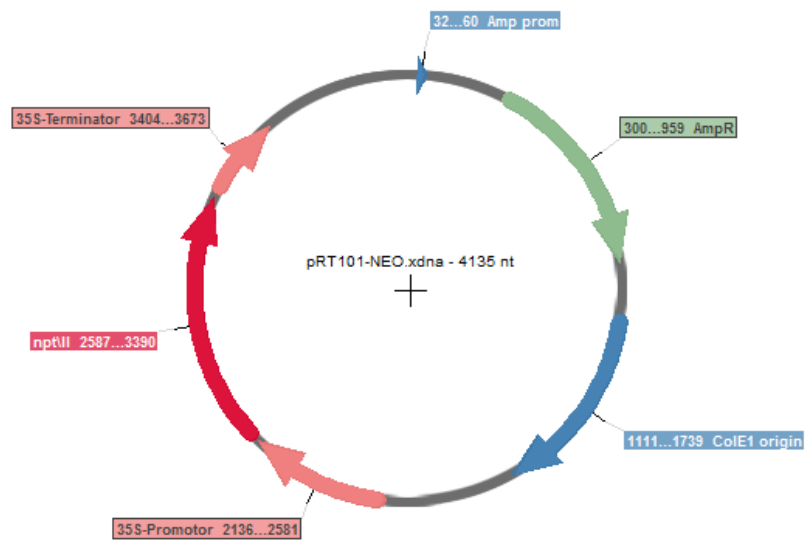


C : Plasmide de destination pHGWA utilisé pour l'expression de protéines recombinantes en système bactérien.
 La séquence codante de la protéine est introduite par « LR cloning » depuis un pDONR. Les primers #21 et #494 sont utilisés pour le séquençage.



D : Plasmide Ti conférant la virulence d'*Agrobacterium tumefaciens*

L'ADN-T (T-DNA en anglais, pour transferred DNA), qui est transféré de la bactérie vers la plante, et intégré dans le génome nucléaire végétal. Les gènes de virulence sont impliqués dans les mécanismes de transfert de l'ADN-T (activation de la virulence, excision de l'ADN-T et transport dans la cellule infectée).



E : Plasmide pRT101 conférant la résistance à G418 (généticine) aux protoplastes de *P. patens*.
 Il peut être propagé par *E. coli* sur milieu sélectif ampicilline.

ANNEXE 3 : AMORCES (I)

Clonages

Gateway

Amorce sens avec site attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Amorce anti-sens avec site attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Gibson

55	pGEM-T linéarisation F	TCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTG
56	pGEM-T linéarisation R	GCCCTATAGTGAGTCGTATTAC

Séquençage de vecteurs

pDONR-zeocine

14	Seq-LA-F	TCGCGTTAACGCTAGCATGGAT
15	Seq-LB-R	GTAACATCAGAGATTTTGTAGACAC

pHGWA

494	Seq-pHGWA-F	CCCAAGGGGTTATGCTAG
21	Seq-pHGWA-R	TAATACGACTCACTATAGGG

ANNEXE 3 : AMORCES (2)

Chapitre 2

Amplification des séquences codantes pour clonage Gateway

327	Pp3c14_6190_CDS_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCTGGAGGTGACGAGAT
328	Pp3c14_6190_CDS_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATGTGTTGCGACGCAG
HR-1034	MpDCF_CDS_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGCGCCGAGGAGGTT
HR-1035	MpDCF_CDS_F	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACAGCTTGATGGCCTGC

Génotypage des lignées modifiées par CRISPR-cas9

354	Pp3c14_6190_screening_R	ACCTGCAGCTTGAAGTCCTC
355	Pp3c14_6190_screening_F	AAATGTGCTGCTCGGAAGGA
417	Off-target_6190_F1/1	TGACAGAGTGAGTGCGTGTG
418	Off-target_6190_R1/1	TCCCACCTGAATCTCTCCTC

Chapitre 3

Complémentation des mutants tt d'A. thaliana par les gènes de P. patens

205	Pp3c2_36290_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCAAGCGGAGAAGTCG
206	Pp3c2_36290_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAACGGTGGCCGCGGCC
208	Pp3c2_32400_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTTCTGCTGGGGATG
209	Pp3c2_32400_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAGCGGAGTTGGGAGCGG
211	Pp3c2_13120_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTTCTGCTGG
212	Pp3c2_13120_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAGCGGAGTTGGGAGCGG
215	Pp3c24_18010_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCACCGCGAGCCGGAGAG
216	Pp3c24_18010_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACACGTTGCGGGCGGCGC
233	Pp3c19_6330_atb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCACCGCGAGCCGGAGAG
234	Pp3c19_6330_atb2stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACACGTTGCGGGCGGCGC
908	Pp1s1_111V6_gF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTATTTTGAGAAGACCACGGT
909	Pp1s1_111V6_gR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAATACAAATGATCTGCAGCACG
910	Pp1s98_58V6_gF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATTTTGCGAAGAGCACG
911	Pp1s98_58V6_gR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGTAGAATTGAGCTGCAGCA

Ingénierie métabolique

i. Amplification des séquences codantes de Petunia inflata

38	CHSA_PetInf_F	ATGGTGACTGTCGAGGAGTA
39	CHSA_PetInf_R	CTAAGTAGCAACACTGTGGAGGA
40	CHI_PetInf_F	ATGTCTCCTTCAGTGTCCGT
41	CHI_PetInf_R	CTAGACTCCAATCACTGGAATGGT
42	F3H_PetInf_F	ATGGCACCTTCAACATTAACAGC
43	F3H_PetInf_R	TTAAGCAAGAATTTCCCTCAATGGGC
44	CYP75A1_PetInf_F	ATGATGCTACTTACTGAACCTTGCTG
45	CYP75A1_PetInf_R	CTATGGTACATAAACATCAAATTGT

ANNEXE 3 : AMORCES (3)

ii. Génotypage des lignées-intégration des cassettes

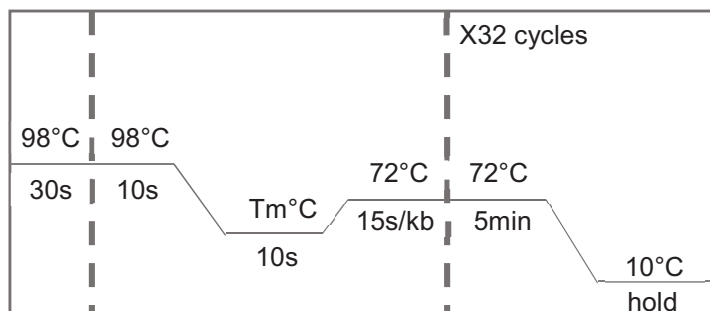
	Séquence	Locus ciblé	Cassette d'expression intégrée
387	CACGGGAAGATAGGTGTGTGA	Intégration 5' locus HCT1	pACT5: PiF3H
371	GAATCTGCGAGGCCCTTATT		
372	CAAGAAGCAGGCCAAGGAG	Intégration 3' locus HCT1	
386	TGCTAGAGCTCGCTAAAGGGTA		
HR-589	AGCTTGTAGGGTAGAGCACA	Intégration 5' locus CYP98	pACT5: PiCYP75
367	CTCGAGGGAACGATTTTGAA		
368	GTGAATGGTTCTTATTGAAATTTGG	Intégration 3' locus CYP98	
HR-590	TTGGATTCTTATTTGGTAATGATGTGA		
381	AGCAAATTGGCAAAAGCTCA	Intégration 5' locus pTA2	pACT5: PiCHI
363	CTTGTTTGGGCGATGATTCT		
364	GAACAAGCAGTTGTCTGAAGCA	Intégration 3' locus pTA2	
382	AGTTCCAGGCCCAGATCATATT		
383	CGGAGCTACGCAAGACTGTG	Intégration 5' locus CHS1	pACT5: PiCHS
359	GAGAAATATGGCGGGC		
360	GGCCTAAAGCCCAGAAACT	Intégration 3' locus CHS1	
384	CCAAGCCCAAAATGTCTTGA		
HR-635	GGTTGGTCATGGGTTGCG	Contrôle positif de la PCR	
HR-636	GAGGTCAACTGTCTCGCC		

iii. Génotypage des lignées – détection des cassettes

	Séquence	Cassette d'expression ciblée
370	TCCTTAGACGTGGTTGATTGC	pACT5: PiF3H
373	CCCAGGTCCAGACATCAGAA	
366	ATCAGCAATGGCATTCAACA	pACT5: PiCYP75
369	GGAGTTGACAGAATAATCAAGCCTA	
362	GGCATTACCCAGATATCATTCT	pACT5: PiCHI
365	ACAACCACTCCAGCTCCAAC	
358	CGCTGATGTCAAACTGAC	pACT5: PiCHS
361	CGCGAACTCTAGCTCAGGAA	

ANNEXE 4 : PROGRAMMES PCR

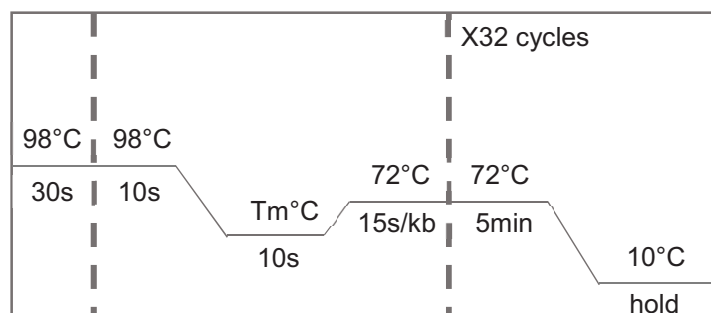
Réaction PCR	Volume	Concentration Finale
Phusion High-Fidelity master mix 2x	25 µL	1X
Amorce forward (10 mM)	2.5 µL	0.5 µM
Amorce reverse (10 µM)	2.5 µL	0.5 µM
Matrice d'ADN	X µL	Quelques ng
H2O	Qsp 50 µL	
VF	50 µL	



A : Protocole de PCR utilisant le master mix Phusion high-fidelity pour générer les fragments d'ADN à cloner.

La durée de l'élongation à 72°C dépend de la taille du fragment à amplifier sachant que la vitesse de l'enzyme est de 15s/kb. Pour les PCR utilisant des amorces avec extension, le T_m utilisé pour les 5 premiers cycles est celui de la partie de l'amorce qui est spécifique de la matrice à amplifier, tandis que celui des 27 cycles suivants correspond au T_m de l'amorce entière soit généralement 72°C.

Réaction PCR	Volume	Concentration Finale
Phire Buffer 5x	4 µL	1X
dNTPs 10mM	0.4 µL	200 µM
Amorce forward (10 mM)	1 µL	0.5 µM
Amorce reverse (10 µM)	1 µL	0.5 µM
Phire Hot Start DNA polymerase	0.4 µL	0,2 µL
Matrice d'ADN	2µL ou colonie bactérienne*	
H2O	Qsp 20 µL	
VF	20 µL	



B : Protocole de PCR utilisant la Phire Hot Start DNA polymerase.

La matrice d'ADN utilisée est soit un extrait d'ADNg de plantes (génotypage) ou une colonie bactérienne (PCR sur colonies).

ANNEXE 5 : SELECTION

Sélection	[] solution stock	[] finale recommandée
Ampicilline	100 mg/ml	100 mg/L
Carbénicilline	100 mg/ml	100 mg/L
Gentamycine	25 mg/ml	25 mg/L
Kanamycine	50 mg/ml	50 mg/L
Zeocine	100 mg/ml	100 mg/L
Rifampicine	50 mg/ml	50 mg/L
Basta	25 mg/ml	25 mg/L

ANNEXE 6 : METHODES DE DETECTION MS/MS

Molecule	Family	M	SRM	CV	CE	ES
Caffeic acid	Phenolic acids	180.16	181.2 > 163.1	20	12	ES+
5-OH-Ferulic acid	Phenolic acids	210.18	211.3 > 193.1	20	6	ES+
Coumaric acid	Phenolic acids	164.16	165.2 > 147.1	22	10	ES+
Ferulic acid	Phenolic acids	194.18	195.3 > 177.2	20	8	ES+
Sinapic acid	Phenolic acids	224.21	225.4 > 207.2	20	8	ES+
Cinnamic acid	Phenolic acids	148.16	149.2 > 103.1	18	16	ES+
Dihydroquercetin	Flavonoids	304.25	305.4 > 153.0	24	20	ES+
Myricetin	Flavonoids	318.24	319.4 > 153.0	36	26	ES+
Dihydrokaempferol	Flavonoids	288.25	289.4 > 153.0	24	20	ES+
Morin	Flavonoids	302.24	303.4 > 153.0	36	32	ES+
Luteolin	Flavonoids	286.24	287 > 153.1	36	36	ES+
Quercetin	Flavonoids	302.24	303.4 > 153.0	36	28	ES+
Apigenin	Flavonoids	270.24	271.4 > 153.0	36	30	ES+
Naringenin	Flavonoids	272.25	273.4 > 153.0	36	24	ES+
Kaempferol	Flavonoids	286.24	287.4 > 153.0	36	26	ES+
Eriodictyol	Flavonoids	288.25	289.4 > 153.0	36	32	ES+
Naringenin chalcone	Flavonoids	272.25	273.4 > 153.0	36	24	ES+
Dihydromyricetin	Flavonoids	320.24	321.4 > 275.1	24	16	ES+
Kaempferol-3-O-Rhamnoside	Flavonoids	432.38	433.6 > 287.1	18	10	ES+
Vitexin	Flavonoids	432.38	433.1 > 313.1	24	24	ES+
Quercetin-3-O-Rhamnoside	Flavonoids	448.38	449.5 > 303.1	18	12	ES+
Coumaroyl-4-threonate	Phenolic esters and amides	282.07	283.2 > 147.1	14	14	ES+
Coumaroyl-2-threonate	Phenolic esters and amides	282.07	283.2 > 147.1	14	14	ES+
Coumaroyl-anthranilate	Phenolic esters and amides	283.08	284.2 > 147.1	17	14	ES+
Caffeoyl-4-threonate	Phenolic esters and amides	298.07	299.2 > 163.1	17	14	ES+
Caffeoyl-2-threonate	Phenolic esters and amides	298.07	299.2 > 163.1	17	14	ES+
Caffeoyl-anthranilate	Phenolic esters and amides	299.08	300.2 > 163.1	17	16	ES+
Coumaroyl-shikimate	Phenolic esters and amides	320.09	321.2 > 147.1	17	14	ES+
Caffeoyl-shikimate	Phenolic esters and amides	336.08	337.2 > 163.1	17	16	ES+
Coumaroyl quinate	Phenolic esters and amides	338.10	339.2 > 147.1	17	14	ES+
Caffeoyl-quinate	Phenolic esters and amides	354.31	355.2 > 163.1	17	16	ES+

La mousse *Physcomitrella patens*, un modèle pour explorer l'évolution et l'ingénierie du métabolisme phénolique

Résumé

Chez les plantes vasculaires, le métabolisme des phénylpropanoïdes conduit à la synthèse de précurseurs de biopolymères structuraux tels que la lignine, ainsi que de nombreux composés antioxydants et anti-UV. Ce métabolisme phénolique est apparu lors de la colonisation des terres par les plantes et a été critique pour leur adaptation à ce nouvel environnement. *Physcomitrella patens*, une bryophyte phylogénétiquement proche des premières plantes terrestres, est un bon modèle pour l'étude de certains caractères ancestraux. *P. patens* est dépourvue de lignine. En combinant des approches phylogénomique, génétique et biochimique, ce travail démontre le rôle essentiel de deux BAHD hydroxycinnamoyl transférases dans le métabolisme phénolique de la mousse et la formation de précurseurs de la cuticule, une couche hydrophobe qui recouvre les parties aériennes de la plante et lui confère une imperméabilité. Il suggère également que deux hydroxycinnamoyl transférases sont requises pour la formation des composés phénoliques solubles accumulés par la mousse. Une exploration préliminaire du métabolisme des flavonoïdes chez ce modèle révèle d'autre part le caractère incomplet et primitif de cette voie métabolique.

Mots-clés : *Physcomitrella patens*, bryophyte, phénylpropanoïdes, BAHD transférase, cuticule

Abstract

In vascular plants, the phenylpropanoid metabolism leads to the synthesis of precursors of structural biopolymers such as lignin and of essential antioxidants and UV screens. The phenolic pathway leading to these compounds appeared upon plant land colonization and is thought critical for their adaptation to this new environment. *Physcomitrella patens* is a bryophyte, an early-diverging land plant and thus a good model to reveal ancestral traits. *P. patens* is devoid of lignin. Combining phylogenomic, genetic and biochemical approaches, this work demonstrates the essential role of two BAHD hydroxycinnamoyl transferases in the moss phenolic metabolism and in the formation of precursors of the cuticle, a hydrophobic layer, covering and conferring impermeability to the aerial parts of the plant. It also suggests that two nonredundant hydroxycinnamoyl transferases are required for the formation of the soluble phenolic compounds accumulated in moss. A preliminary exploration of the flavonoid metabolism in this model in addition reveals primitive features of this metabolic route.

Keywords : *Physcomitrella patens*, bryophyte, phenylpropanoids, BAHD transferase, cuticle