



HAL
open science

L'homéostasie catabolique des jasmonates et son impact sur la signalisation des réponses aux stress chez *Arabidopsis thaliana*

Valentin Marquis

► **To cite this version:**

Valentin Marquis. L'homéostasie catabolique des jasmonates et son impact sur la signalisation des réponses aux stress chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ060 . tel-03613221

HAL Id: tel-03613221

<https://theses.hal.science/tel-03613221>

Submitted on 18 Mar 2022

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
Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) – UPR2357 – CNRS

THÈSE présentée par :
Valentin MARQUIS

soutenue le : **08 octobre 2020**

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

Discipline/Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**L'homéostasie catabolique des jasmonates et
son impact sur la signalisation des réponses
aux stress chez *Arabidopsis thaliana***

THÈSE dirigée par :

Dr Thierry HEITZ

Directeur de recherche, IBMP, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES :

Dr Debora GASPERINI

Professeur, Leibniz Institute of Plant Biochemistry –
Halle (Allemagne)

Dr Antony CHAMPION

Directeur de recherche, Institut de Recherche pour le
Développement – Montpellier

EXAMINATEUR INTERNE :

Dr Patrick ACHARD

Directeur de recherche, IBMP, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury, Debora Gasperini, Antony Champion et Patrick Achard pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

Un énorme merci aux membres du 520, mon laboratoire d'accueil. En premier lieu à mon directeur de thèse, Thierry Heitz, qui m'a encadré et formé pendant presque 5 années riches en enseignements. Merci pour la confiance et la liberté et que tu m'as accordées depuis le début, et merci de m'avoir poussé à faire ce que je me pensais incapable de faire. À Rozenn Ménard, merci pour ta gentillesse, ta patience, ton écoute et ton soutien qui m'ont été précieux, en particulier dans les moments les plus difficiles de ma thèse. Tes encouragements m'ont permis de tenir jusqu'au bout et merci aussi pour ce que tu m'as appris et pour toute l'aide apportée depuis le master jusqu'à l'ATER. À Katia Smirnova, merci d'avoir pris en charge ma formation pratique dans les premiers mois de ma thèse, toutes tes petites astuces m'ont été toujours utiles. Merci d'avoir partagé tes larges connaissances et compétences, j'ai beaucoup appris en peu de temps grâce à toi. À Laure Poirier, tu m'as encadré lors de mon premier stage dans le labo, merci beaucoup pour ça, de m'avoir initié à la recherche en laboratoire, de m'avoir fait découvrir en pratique le royaume des Jasmonates et de m'avoir donné l'envie de revenir. À Maxime Lecorbeiller, merci pour nos longues discussions dans le bureau et pour l'initiation aux analyses statistiques que tu as pris le temps de me faire. À Pauline Delcros, merci de toute l'aide que tu m'as apportée lors de ton stage de M2, tant pour tes impressionnantes capacités d'apprentissage que pour ta sympathie et ta sociabilité qui sont un plaisir au quotidien. À Clara Colin, merci pour ton enthousiasme, ta bonne humeur, ta volonté et ton travail, partagé le temps de ton stage d'été. J'ai réellement apprécié d'apprendre à encadrer un stagiaire avec toi. À Simon NDecky, le dernier arrivé au laboratoire, merci pour les bons moments passés ensemble au bureau et au laboratoire, pour nos discussions scientifiques (et non-scientifiques !), pour ton aide et pour ton inestimable joie de vivre que tu partages au quotidien. À Agnès Lesot, merci pour ta délicieuse compagnie dans le bureau, pour tes conversations, ton entrain, ton dynamisme naturel, et les bonnes petites adresses gastronomiques que tu connais et que j'aime découvrir en ta compagnie. À vous tous du 520, merci pour tous les bons moments passés ensemble, au laboratoire et en dehors, pour votre accueil et vos personnalités que j'ai pris beaucoup de plaisir à connaître et à fréquenter.

Je remercie vivement tous les autres membres de l'équipe évolution et diversité du métabolisme des plantes qui m'ont aidé dans ma formation et grâce à qui j'ai appris beaucoup de choses. Emmanuel Gaquerel, Franck Pinot, Hugues Renault, Nicolas Navrot, Jean-Etienne Bassard, Danièle Werck, Étienne Gienenberger, Samuel Knosp et David Elser.

Je souhaite également remercier les différentes plate-formes et leurs membres pour l'aide apportée pour la réalisation des expérimentations dans le cadre de ma thèse et les bons moments passés ensemble. Julie Zumsteg, Claire Vilette et Dimitri Heintz de la plate-forme *Plant Imaging Mass Spectrometry* ; Sandrine Koechler et Abdelmalek Alioua de la plate-forme Analyse de l'expression génique ; Laurence Herrgott et Nicolas Baumberger de la plate-forme Production et purification des protéines ; Stéphanie Graindorge et Valérie Cognat de la plate-forme Bioinformatique ; Jérôme Mutterer et Mathieu Erhardt de la plate-forme Microscopie ; Sébastien Staerck, Fabrice Braun et Michel Kerneis de la plate-forme Production des plantes.

Merci également aux différents membres de l'institut impliqués dans son bon fonctionnement : merci pour leur réactivité et pour le plaisir partagé lors de nos conversations au détour d'un couloir. Lisiane Vola, Joëlle Friedlin, Jane Loegel et Cathie Nothisen du pôle administratif ; François Disder, Magalie Daujat et Jean-Luc Evrard du service système d'informations ; Laurence Monnier, Michèle Hadji, Thierry Bourré et Joëlle Hoenen des services généraux ; Martine Mittelheisser, Evelyne Vallin et Cinthia Njaha pour ce premier sourire reçu à l'accueil en arrivant le matin.

Un grand merci aux membres de l'IBMP avec qui j'ai pris plaisir à travailler, apprendre, discuter et partager au cours de ma thèse, en particulier Jean-Michel Daviere, Esther Lechner, Salah Bouzoubaa, Patrick Achard, Lali Achard, Sandra Noir, Todd Blevins et Géraldine Bonnard.

Je remercie chaleureusement les enseignants avec qui j'ai travaillé et qui m'ont donné goût à l'enseignement : Rozenn Ménard, Sandra Noir, Jean-Michel Daviere, Camille Rustenholz, Florence Bouvier, Isabelle Combroux et Stéphane Vuilleumier. Merci aux moniteurs avec qui j'ai partagé les TPs : Lucie Kriegshauser, Laura Ferrafiat, Lucas Jilli, Samuel Knosp, Simon NDecky, Agnès Saulnier et Maïlys Piau. C'est grâce à vous que le monitorat et l'ATER ont été des expériences très enrichissantes.

J'exprime toute ma gratitude à ma famille qui m'a soutenu du début jusqu'à la fin.

Un grand merci aussi à tous ceux avec qui j'ai passé de bons moments et qui m'ont donné le sourire durant ma thèse. Merci à la bande de première année avec Pierre, Fanny, Cédric, Cécile et Adrien pour nos innombrables verres et sorties. Aux doctorants de ma promotion : Arnaud, Magdalène, Marlène, Guillaume et Laetitia. Ensemble, nous avons profité (mais galéré aussi!) du début à la fin. À Déborah pour son écoute, son soutien et les événements que l'on a organisés ensemble. À Julie K qui fut la première à m'encourager pour le concours de l'école doctorale. À Marieke pour les week-ends où l'on rentrait ensemble chez nous dans le Nord. À Farah, avec qui j'ai tant de choses en commun et qui est une vraie

bouffée de joie à chaque fois que l'on se voit. À Amélia, pour la découverte de ta culture, notre entraide et mon amélioration dans la maîtrise de l'anglais grâce à ton aide. À la team Pimprenelle, Estelle, Thomas, Alice, Jean-Luc et Camille. À la team bar à jeu et sushi, Mathilde, Nevroz et Naomie. À mes amis de Licence qui me supportent et me soutiennent encore et toujours : Quentin, Paul-André, Céline, Lucie et Jordan. À Anne pour son humour et ses patounes. À Marina et Andy qui sont des compagnons idéals de déconnade depuis le master. À Erwan, pour ton humour piquant et ta simplicité. À Mathilde, pour ta gentillesse (et tes délicieux gâteaux!). À Alexandre, pour ton exceptionnel ouverture d'esprit. À Hélène, Caroline, Charlotte, Loïc, Quentin, Célia, Camille, Marcel, Aude, Mickaële, Herrade, Marjorie, Aleksandar, Sébastien, Réjane, Lucie B et Vianney pour les bavardages et les sorties entres deux manipulations. Merci à tous, pour la complicité que j'ai créé avec chacun d'entre vous.

Enfin, du fond du cœur un énorme merci à ceux avec qui j'ai développé, ou renforcé, une sincère et profonde amitié durant la thèse et qui ont toujours été là pour moi quand j'en avais besoin. À Caroline, ma binôme de master, avec qui j'ai travaillé comme un acharné et qui m'a donné la force de tenir, même épuisé, dans les moments les plus durs, de ne jamais abandonner et d'aller jusqu'au bout. Merci pour tout ce qu'on a partagé ensemble, bien au-delà du travail, merci pour qui tu es, pour ton authenticité, pour ton soutien et ta confiance sans faille, pour ton inestimable humour et les parapluies irisés. À Chloé, ma voisine de labo, avec qui j'ai souvent travaillé, merci pour toute l'entraide qu'on s'est apporté, pour ton épaule secourable et ta compréhension, merci pour ton temps où tu restais avec moi quand tu avais fini ton travail. Pour toutes les sorties organisées, mais surtout celles décidées sur un coup de tête qui restent les meilleures que l'on a faites, pour toutes les séances de bad (la prochaine fois c'est moi qui te mets ta misère !) et pour les bagels au saumon. À Lucie (C), que je côtoie depuis le master, la thèse nous a rapproché, merci pour tous les bons délires, ta connaissance des références de Kaamelott, les goûts musicaux que nous avons partagés et pour toutes les compétences que tu m'as apportées sur les Western blot. Merci d'avoir toujours été là, pour ton soutien inébranlable, pour toutes les soirées mémorables passées ensemble, la raclette par canicule et les retours ensemble à vélo (quand j'ai encore mes 2 roues !). À Lucie (K), la doctorante qui me précède et qui montre la bonne voie, ton dynamisme et ton efficacité poussent toujours à redoubler d'efforts. Merci pour tous tes bons conseils, pour ta joie de vivre sans égale, ton humour incomparable, ton naturel et ton sourire si communicatif. Merci d'avoir ajouté une petite touche de toi rendant chaque moment unique, pour ta force et ta volonté incommensurable et indéfectible et pour avoir fait ressortir le meilleur de moi-même, hum ça a l'air bon. À Laura, la seule de notre promo de doctorat qui a commencé et fini en même temps que moi. Merci pour ta douceur, ton caractère posé et ta patience sur ces quatre années. Pour tous nos échanges autour d'un thé et toutes les difficultés de la thèse qu'on a

vécues au même moment et pour le soutien mutuel. Merci pour ta main toujours tendue, la simplicité que tu partages et les bons verres de rhum que l'on a savouré ensemble, on doit bien l'avouer. À Lucas, mon bro, merci de ta motivation que tu partages, de pousser à donner le meilleur de soi-même dans le travail et dans la vie personnelle, pour les pause-café, ta joie de vivre, ton enthousiasme, ta zénitude et ta confiance dans l'avenir qui donne espoir. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir redonné confiance quand je doutais de tout, d'être là et de tout faire pour rendre le sourire, pour tes bons cocktails de l'Oslo club et la girafe imaginaire, pour tout le sport et les moments de détente qu'on a vécu ensemble. À Rozenn et Alicia, mes deux meilleures amies, plus de 10 ans qu'on roule nos bosses ensemble. Juste merci d'être, pour les doses de mignonititudes quotidiennes, les #bêbête du jour et pour chacune de nos retrouvailles qui sont un vrai bonheur et me regonflent à bloc. Merci pour votre soutien sans faille, d'avoir toujours répondu présent quand j'étais dans la détresse, malgré la distance, pour toute la force que vous m'avez insufflée, pour toutes nos discussions autant passionnantes et inspirantes que passionnées et inspirées et pour la foi que vous avez en moi et en mes capacités. À chacun de vous, merci d'avoir fait un bout de route avec moi durant ma thèse, du lien que j'ai créé avec chacun de vous, et d'avoir rendu le côté « vie sociale » de la thèse merveilleux.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
I. Introduction	6
1. Les phytohormones et les oxylipines.....	7
1.1. Les phytohormones	7
1.2. Les Oxylipines	8
1.2.1. La métabolisation des hydroperoxydes	9
2. Biosynthèse, métabolisme et signalisation des jasmonates	10
2.1. La biosynthèse	11
2.1.1. Les stimuli induisant la synthèse des jasmonates	11
2.1.2. Synthèse du premier jasmonate dans le chloroplaste	11
2.1.3. Métabolisation de l'OPDA dans le Peroxysome	13
2.1.4. Formation de l'hormone active dans le cytoplasme	14
2.1.5. Synthèse initiée depuis le C16:3	14
2.1.6. Rôles biologiques suspectés des OPDAs et des arabidopsides.	15
2.2. Les dérivés du JA.....	16
2.2.1. Les dérivés hydroxylés, glycosylé et sulfaté.....	16
2.2.2. Le dérivé méthylé.....	17
2.2.3. Le dérivé décarboxylé	17
2.2.4. Les dérivés conjugués	18
2.3. La signalisation.....	19
2.3.1. La dérépression JA-Ile dépendante.....	19
2.3.2. Les systèmes de répressions.....	21
2.3.2.1. Les répresseurs.....	21
2.3.2.2. Les compétiteurs	23
2.4. La transcription.....	23
2.4.1. Les cascades de transcription.....	23
2.4.2. L'induction des gènes de la voie jasmonates et de répression	25
3. Rôles biologiques des Jasmonates	26
3.1. L'adaptation aux stress biotiques.....	26
3.1.1. La défense contre les herbivores	26
3.1.2. La défense contre les pathogènes nécrotrophes.....	28
3.1.3. Antagonismes et interactions hormonales.....	29
3.1.4. L'influence du transport.....	30
3.2. L'adaptation aux stress abiotiques.....	32
3.3. Les réponses développementales	33
3.3.1. Le développement racinaire	33

3.3.2. La reproduction.....	34
3.3.3. Le développement de la graine.....	35
3.3.4. Autres impacts développementaux et interactions biotiques.....	36
4. Régulation et inactivation des jasmonates.....	38
4.1. La régulation.....	38
4.1.1. Régulation de la biosynthèse du JA-Ile.....	39
4.1.1.1. Régulation de la biosynthèse basale.....	39
4.1.1.2. Régulation de la biosynthèse induite.....	40
4.1.2. Régulation de la signalisation JA-Ile dépendante.....	42
4.1.2.1. Les mécanismes de rétrocontrôle.....	42
4.1.2.2. La régulation des acteurs de la signalisation.....	43
4.1.2.3. La chimie biologique pour comprendre la signalisation JA-Ile.....	44
4.2. L'inactivation par catabolisme du JA-Ile.....	46
4.2.1. Le catabolisme par oxydation.....	47
4.2.2. Le catabolisme par déconjugaison.....	50
5. Objectif de thèse.....	52
II. Résultats partie 1 : Fonctions et impacts des voies cataboliques du JA-Ile.....	54
1. Contexte.....	55
2. Publication : Stress- and pathway-specific impacts of impaired jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) catabolism on defense signalling and biotic stress resistance.....	57
III. Résultats partie 2 : Caractérisation d'une nouvelle activité d'oxydation de l'acide jasmonique.....	79
1. Introduction.....	80
2. Publication : Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against <i>Botrytis cinerea</i> Infection.....	82
3. Données complémentaires.....	109
3.1. L'expression des <i>JAO</i> après blessure dépend de COI1.....	109
3.2. <i>JAO1</i> et allèles secondaires.....	109
3.3. Recherche d'un effet additif des mutations <i>jao</i>	110
3.4. Existence d'autres puits métaboliques du JA ?.....	111
IV. Résultats partie 3 : Rôle du mécanisme d'atténuation des JAO chez <i>Arabidopsis</i>	113
1. Quel est le spectre de réponses transcriptionnelles et métaboliques réprimées par l'action de JAO2 ?.....	114
1.1. Le transcriptome dérégulé par <i>jao2</i>	114
1.2. Le métabolome d'extrait méthanolique dérégulé par <i>jao2</i>	118
1.2.1. Rôles des phénolamides dans le phénotype de résistance de <i>jao2</i> ?.....	121
2. Quelle est l'implication du mécanisme d'atténuation de JAO2 à l'échelle de l'organisme ?.....	122

2.1. Localisation de JAO2 par marquage histologique GUS	123
2.2. Dissociation des sites d'expressions racinaire et foliaire de <i>JAO2</i>	126
2.3. Expression de <i>JAO2</i> lors de la croissance foliaire	127
2.4. Analyse de l'accumulation foliaire d'une version étiquetée de <i>JAO2</i>	129
3. La fonction de <i>JAO2</i> , contrôle-t-elle la tolérance à d'autres types de stress, par exemple des stress abiotiques ?	130
3.1. Tolérance de <i>jao2</i> au stress hydrique	131
3.2. Implication de l'ABA dans le phénotype de tolérance à la déshydratation de <i>jao2</i>	132
3.3. Implication des JAs dans le phénotype de tolérance à la déshydratation de <i>jao2</i>	136
4. Les JAO peuvent-elles avoir un rôle d'atténuation en réponses à d'autres situations physiologiques ?	137
4.1. Rôle des JAO dans la croissance racinaire	138
4.2. Rôle des JAO pour la croissance.....	140
5. Quelle est la structure exacte du produit d'oxydation de JAO ?.....	143
6. Discussion	147
6.1. Le mécanisme d'atténuation de <i>JAO2</i> est un régulateur majeur de la signalisation JAs basale	147
6.1.1. La régulation par <i>JAO2</i> encore insuffisamment comprise	150
6.1.2. Une régulation multi-échelle de <i>JAO2</i>	151
6.2. L'activité des JAO régule les réponses développementales JAs dépendantes	153
6.3. Le produit d'oxydation de <i>JAO2</i> et son impact sur les connaissances du métabolisme des JAs	154
7. Matériels et Méthodes.....	156
7.1. Culture des plantes et traitements	156
7.1.1. Matériel végétal et culture en sol.....	156
7.1.2. Culture <i>in vitro</i>	156
7.1.3. Mesures des graines.....	156
7.1.4. Test de résistance à <i>Botrytis cinerea</i>	157
7.1.5. Analyses foliaires âges dépendantes	157
7.2. Construction des plasmides et transformation des plantes	157
7.3. Analyse de l'expression des gènes.....	158
7.3.1. RT-qPCR	158
7.3.2. Extraction et purification des ARN pour RNAseq.....	158
7.4. Profils métaboliques	158
7.4.1. Analyse non-ciblée par UHP-LC-QTOF.....	158
7.4.2. Analyse ciblée par UHPLC-MS/MS	159
7.5. Production enzymatique du produit de <i>JAO2</i>	160
7.5.1. Expression et purification de la protéine recombinante <i>JAO2</i>	160
7.5.2. Incubation enzymatique	161
7.5.3. Analyse RMN du produit de réaction.....	161
7.6. Colorations GUS	162

7.7. Greffes	162
7.8. Immunoblot de JAO2 étiqueté	163
7.8.1. Extraction protéique	163
7.8.2. Quantification protéique	163
7.8.3. Immunomarquage	163
7.9. Stress hydrique	164
7.10. Microscopie racinaire	164
7.11. Analyses statistiques	164
V. Discussion générale	165
1. Régulation pré- et post-JA-Ile	166
2. Croissance ou défense, un dogme qui se craquèle	177
3. Améliorer la résistance des cultures par la régulation de la signalisation JAs	178
VI. Annexes	181
Annexe 1, analyse de l'intégrité des ARN pour RNAseq par la plateforme d'analyse d'expression génique	182
Annexe 2, listes des DEG des banques d'expression générées par RNAseq	184
Annexe 2A	184
Annexe 2B	184
Annexe 3, listes des facteurs de transcriptions surexprimés chez le mutant <i>jao2</i>	197
Annexe 4, listes des molécules d'extraits méthanoliques différentiellement accumulées entre WT et <i>jao2</i>	200
VII. Bibliographie	207

Table des illustrations

Figure 1.1. Structure des neuf classes de phytohormones	8
Figure 1.2. Voie de biosynthèse simplifiée des oxylipines végétales à partir des précurseurs acides gras libres	9
Figure 1.3. Voie simplifiée de la biosynthèse compartimentée des jasmonates	11
Figure 1.4. Biosynthèse de l'OPDA dans le chloroplaste	12
Figure 1.5. Métabolisation peroxysomale de l'OPDA en JA	13
Figure 1.6. Biosynthèse des JAs à partir du précurseurs C16:3	14
Figure 1.7. Voie péroxysomale parallèle de formation du JA/JA-Ile	15
Figure 1.8. La formation du 12-hydroxy-jasmonate	16
Figure 1.9. Le métabolisme de l'acide jasmonique	17
Figure 1.10. Le transport du JA-Ile dans le noyau et la dérégulation JA-Ile dépendante	19
Figure 1.11. Analogie structurale du JA-Ile, de la coronatine et du coronalon	20
Figure 1.12. Le complexe SCF ^{COI1}	20
Figure 1.13. Association du complexe tripartite	21
Figure 1.14. Les domaines d'interactions des JAZ	21
Figure 1.15. La répression médiée par JAV1 et l'activation de la transcription des gènes de biosynthèse des jasmonates par les flux de calcium	22
Figure 1.16. La répression médiée par les JAM	23
Figure 1.17. Les facteurs de transcription cibles et leurs rôles biologiques réprimés par les répresseurs JAZ	24
Figure 1.18. L'induction des gènes de biosynthèse des jasmonates par les jasmonates	25
Figure 1.19. L'activation des défenses anti-herbivores régulée par les interactions hormonales	26
Figure 1.20. Voie de biosynthèse simplifiée de la camalexine	27
Figure 1.21. Voie de biosynthèse simplifiée des phénolamides	28
Figure 1.22. L'activation des défenses anti-nécrotrophes régulées par les interactions hormonales	29
Figure 1.23. Antagonismes et inhibitions hormonales des réponses de défenses	30
Figure 1.24. La résistance aux stress hydrique JA-Ile dépendante	33
Figure 1.25. Effets connus des jasmonates sur la biologie des graines	35
Figure 1.26. Le rétrocontrôle négatif médié par les JAZ et MTB	42
Figure 1.27. La SUMOylation réprimant la signalisation JA-Ile	43
Figure 1.28. Analogues structuraux chimiques du JA-Ile et de la COR	45
Figure 1.29. Exemple de types de catabolismes des phytohormones	46
Figure 1.30. L'oxydation du JA-Ile	47
Figure 1.31. L'hydrolyse du JA-Ile	50
Figure 1.32. <i>Crosstalk</i> entre la croissance et la défense par IAR3	51
Figure 3.1. Le détournement métabolique de la défense par <i>Magnaporthe</i>	80

Figure 3.2. Liste de gènes corégués avec <i>CYP94C1</i>	80
Figure 3.3. Hydroxylation catalysée par les 2-ODD	81
Figure 3.4. Exemples d'hydroxylation par les 2-ODD dans le métabolisme phytohormonale	81
Figure 3.5. Liste de gènes corégués avec <i>ST2a</i>	82
Figure 3.6. Profil d'accumulation de JA-Ile après blessure et traitement au prohexadione-calcium.....	82
Figure 3.7. Expression des <i>JAO</i> lors d'une cinétique de blessure	109
Figure 3.8. Profil d'expression de <i>JAO1</i>	109
Figure 3.9. Expression foliaire de <i>JAO1</i> chez différents mutants <i>jao</i>	110
Figure 3.10. Résistance des allèles <i>jao</i> de l'écotype Wassilewskija en réponse à l'infection par <i>Botrytis cinerea</i>	110
Figure 3.11. Réponses de défense et de résistance des mutants <i>jao</i>	110
Figure 3.12. Caractérisation du mutant <i>jmt-1</i>	111
Figure 3.13. Expression de gènes de réponses et du métabolisme des jasmonates chez <i>jmt-1</i>	112
Figure 4.1. Analyse en composantes principales des banques d'expression générée par RNAseq.....	115
Figure 4.2. MA-plot avec et sans stimulus des banques d'expression générée par RNAseq	116
Figure 4.3. Diagramme de venn des DEG entre WT et <i>jao2</i>	116
Figure 4.4. GO analyse des DEG entre les génotypes WT et <i>jao2</i>	117
Figure 4.5. Gènes de la biosynthèse, du catabolisme, de la répression et de la signalisation sur-exprimés chez <i>jao2</i>	118
Figure 4.6. Répartition des facteurs de transcriptions extraits des DEG chez <i>jao2</i>	118
Figure 4.7. <i>Volcano plot</i> des métabolites putativement identifié chez WT et <i>jao2</i>	119
Figure 4.8. Caractérisation des mutants <i>act-1</i> et <i>jao2 act</i>	121
Figure 4.9. Phénotype de résistance à <i>Botrytis</i> du mutant <i>jao2 act</i>	122
Figure 4.10. Complémentation des transformants primaires <i>jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS</i> et <i>jao2-1 pJAO2:JAO2stop-GUS</i>	123
Figure 4.11. Colorations histologiques GUS de la lignée <i>jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3</i>	124
Figure 4.12. Colorations histologiques GUS de la lignée <i>jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS #16</i>	125
Figure 4.13. Distinction entre feuilles jeunes et feuilles matures.....	125
Figure 4.14. Expression de gènes marqueurs de défenses lors de la dissociation des sites d'expressions foliaires et racinaires de <i>JAO2</i>	126
Figure 4.15. Phénotype de résistance à <i>Botrytis</i> des lignées <i>jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3</i> et <i>jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS #16</i>	126
Figure 4.16. Expression de <i>JAO2</i> et de <i>PDF1.2</i> en fonction de l'âge des feuilles.....	127
Figure 4.17. Analyse des transformants primaires <i>jao2-1 pJAO2:JAO2-4xMYC</i>	129
Figure 4.18. Détection du tag myc dans une lignée <i>jao2-1 pJAO2:JAO2-4xmyc</i> selon la croissance foliaire.....	130
Figure 4.19. Taux de survie de mutants <i>jao2</i> à la suite d'un stress.....	131

Figure 4.20. Stades d'études du stress hydrique sévère	133
Figure 4.21. Expression de marqueurs de réponses à la déshydratation au cours d'un stress hydrique par manque d'eau	134
Figure 4.22. Dosage de l'ABA au cours d'un stress hydrique par manque d'eau	135
Figure 4.23. Dosage des JAs au cours d'un stress hydrique par manque d'eau	136
Figure 4.24. Dosage des catabolites des JAs au cours d'un stress hydrique par manque d'eau	137
Figure 4.25. Localisation racinaire de l'expression de <i>JAO2</i> , <i>JAO3</i> et <i>JAO4</i> d'après les données d'expressions publiques d'eFP Browser.....	138
Figure 4.26. Expression des <i>JAO</i> dans les parties foliaires et dans les racines	139
Figure 4.27. Allongement racinaire des mutants <i>jao</i> en présence ou non de JA	139
Figure 4.28. Mesure de la taille des cellules racinaire de la zone d'élongation	140
Figure 4.29. Mesure de la surface foliaire des mutants <i>jao</i>	141
Figure 4.30. Masse totale des graines produites par les mutants <i>jao</i>	141
Figure 4.31. Mesure de la taille des graines produites par les mutants <i>jao</i>	142
Figure 4.32. Contrôle sur gel SDS-Page de la purification protéique de <i>JAO2</i>	144
Figure 4.33. Contrôle de l'activité enzymatique de <i>JAO2</i> par UHPLC-MS/MS.....	144
Figure 4.34. Analyse des produits d'oxydation de <i>JAO2</i> par RMN.....	145
Figure 4.35. Contrôle sur gel SDS-Page de la purification protéique à grand échelle de <i>JAO2</i>	146
Figure 4.36. Contrôle de l'activité enzymatique à grande échelle de <i>JAO2</i> par UHPLC-MS/MS	146
Figure 4.37. Vecteurs d'expression pour les plantes utilisés dans cette étude.....	158
Figure 4.38. Vecteurs d'expression bactérien utilisés pour la production enzymatique du produit de <i>JAO2</i>	160
Tableau 4.1. Amorces utilisées dans cette étude.....	157
Figure 5.1. Orthologues de <i>AtJAO2</i> chez les plantes	179

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
2-HPOD	Acide 2(R)-hydroperoxylinolenic
2-ODD	<i>2-oxoglutarate-dependent dioxygenases</i>
<i>2ah</i>	<i>iar3 ill6</i>
<i>3cyp</i>	<i>cyp94b1 b3 c1</i>
4,5-ddh-JA	4,5-didehydrojasmonate
<i>5ko</i>	<i>cyp94b1 b3 c1 iar3 ill6</i>
9-HPOD	Acide 9-hydroperoxy-octadecadiénoïque
9-HPOT	Acide (9S)-hydroperoxy octadécatriénoïque
10,11-EHT	Acide 10,11-(S)-epoxy hexadécatriénoïque
11-HPHT	Acide 11(S)-hydroperoxy-hexa-decatriénoïque
11OH-JA	11-hydroxy-jasmonate
12,13-EOT	Acide 12,13(S)-époxy-octadécatriénoïque
12-HSO ₄ -JA	Acide 12-hydroxyjasmonic sulfate
12-O-Glc-JA	Acide 12-O-glucospyranosyl-jasmonique
12COOH-JA	12-carboxy-JA
12COOH-JA-Ile	12-carboxy-JA-Ile
12OH-JA	12-hydroxy-jasmonate
12OH-JA-Ile	12-hydroxy-JA-Ile
13-HPOD	Acide 13-hydroperoxy-octadecadiénoïque
13-HPOT	Acide (13S)-hydroperoxy octadécatriénoïque
α-DOX	α-dioxygénases
μg	Microgramme
μL	Microlitre
μm	Micromètre
μM	Micromolaire
A	
aa	Acides aminés
ABA	Acide abscissique
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABI5	<i>ABSCISIC ACID INSENSITIVE5</i>
Abm	Mono-oxygénase de <i>Magnaporthe oryzae</i>
ACT	<i>Agmatine coumaroyltransferase</i>
ACX	<i>Acyl-CoA oxidase</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN-T	ADN de transfert
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
AH	Amidohydrolases
AM	Mycorhizes arbusculaires
ANAC019	<i>Abscisic-acid-responsive NAC 019</i>
AOC	Allène oxyde cyclases
AOS	Allènes oxydes synthases
APT	<i>APETALA</i>
ARN	Acide ribonucléique
B	
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BR	Brassinostéroïdes
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C	
Ca ²⁺	Calcium
CDPK	<i>Calcium-dependent protein kinases</i>
CFA	Acide coronafacic
CJ	<i>cis-jasmone</i>

CK	Cytokinines
cm	Centimètre
COI1	<i>Coronatine-insensitive 1</i>
Col0	Columbia
COR	Coronatine
COR-MO	Coronatine-O-méthylxime
CRL	Coronalon
CTS	COMATOSE
CYP	Cytochromes P450
CYP74	Cytochromes P450 de la famille 74
CYP94	Cytochromes P450 de la famille 94
D	
DAD1	<i>DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DAO	<i>DIOXYGENASE OF AUXIN OXIDATION</i>
ddd	Doublet de doublet de doublet
DEG	<i>Differential expressed gene</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhanced Polarization Transfer</i>
DES	Divinyls éthers synthases
DGL	<i>DONGLE</i>
dnOPDA	Acide dinor-oxo-phytodiénoïque
DO	Densité optique
DREB	<i>Dehydration responsive element binding</i>
DTT	Dithiothréitol
DTX18	<i>DETOXIFICATION18</i>
E	
EAR	<i>ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR-associated amphiphilic repression</i>
EAS	<i>Epoxy alcohol synthase</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EIN3	<i>ETHYLENE INSENSITIVE 3</i>
ERF	<i>ETHYLENE RESPONSE FACTOR</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ET	Éthylène
EtAc	Éthyle acétate
EtOH	Éthanol
F	
FAD	<i>Fatty acids desaturases</i>
Fag	Feruloyl-agmatine
FeSO₄	Sulfate de fer (II)
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FT	Facteurs de transcription
G	
GA	Gibbérellines
GA2ox	GA2 oxydases
GAM	Goat anti-mouse
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GH3	Gretchen Hagen3
GLR	<i>GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE</i>
GLV	<i>Green Leaf Volatiles</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GUS	β-glucuronidase
H	
Ha	Proton allylique
HAMP	<i>Herbivore-associated molecular pattern</i>
HB2	<i>HOMEBOX PROTEIN 2</i>
HCl	Chlorure d'hydrogène
His	Histidine

HPL	Hydroperoxydes lyases
HPO	Hydroperoxydes
HR-LC-MS	<i>High Resolution-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
HtA/C16:3	Acide hexadécatriénoïque
HTI	<i>Herbivore-triggered immunity</i>
Hv	Proton vinylique
I	
IAA	Acide indole-3-acétique ou auxine
IAR3	<i>IAA-alanine resistant 3</i>
ICE	<i>INDUCER OF CBF EXPRESSION</i>
IGMT1	Indole glucosinolate O-méthyltransférase 1
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
Ile	Isoleucine
ILL6	<i>IAA-leucine resistant (ilr)-like gene 6</i>
InsP₅	Inositol pentakisphosphate
J	
(+)-JA	Acide (+)-7-iso-jasmonique
JA	Acide jasmonique
JA-ACC	Acide jasmonoyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylique
JA-Ala	Jasmonoyl-alanine
JA-Glc	Acide jasmonique glucopyranosyl ester
JA-Gln	Jasmonoyl-glutamine
JA-Ile	(+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine
JA-Leu	Jasmonoyl-leucine
JA-Met	Jasmonoyl-méthionine
JA-Phe	Jasmonoyl-phénylalanine
JA-Thr	Jasmonoyl-thréonine
JA-Val	Jasmonoyl-valine
JAM	<i>JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE</i>
JAO	<i>Jasmonic acid oxidase</i>
jao234	<i>jao2-1 jao3-1 jao4-2</i>
JAR1	<i>JASMONATE RESISTANT1</i>
JAs	Jasmonates
JAT1	<i>JA TRANSPORTER1</i>
JATI	<i>JA-triggered immunity</i>
JAV1	<i>Jasmonate-associated VQ motif gene 1</i>
JAZ	<i>JASMONATE-ZIM DOMAIN</i>
jazQ	Quintuple <i>jaz</i> (<i>jaz1/3/4/9/10</i>)
JID	<i>JAZ-interaction domain</i>
JIH1	Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1
JJW	JAV1-JAZ8-WRKY51
JMT	<i>Jasmonic acid carboxyl methyltransferase</i>
JOX	<i>Jasmonate-induced oxygenases</i>
joxQ	Quadruple <i>jox/jao</i>
JUL1	<i>JAV1-ASSOCIATED UBIQUITIN LIGASE1</i>
K	
KAT	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase</i>
KEG	<i>KEEP ON GOING</i>
KODE	Ketodienes
L	
LeA/C18:3	Acide α -linoléinique
LOX	Lipoxygénases
M	
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAR	Méristème apicale racinaire
MED25	MEDIATOR25

MeJA	Méthyl-jasmonate
MeOH	Méthanol
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique)
MFP	<i>Multifunctional protein</i>
MFT	<i>MOTHER-OF-FT-AND-TFL1</i>
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minutes
MJE	Méthyl-jasmonate estérase
mm	Millimètre
mL	Millilitre
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Murashige et Skoog
MTB	<i>MYC2-TARGETED BHLH</i>
N	
NaCl	Chlorure de sodium
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
NCED3	<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3</i>
ng	Nanogramme
NINJA	<i>NOVEL INTERACTOR OF JAZ</i>
nm	Nanomètre
NO	Monoxyde d'azote
NOPh	O-phényl oxime
NPR1	<i>NON EXPRESSER OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1</i>
O	
OGM	Organisme génétiquement modifié
OH-JA	Hydroxy-jasmonate
OPC-4:0	Acide 3-oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-butyrique
OPC-6:0	Acide 3-oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-hexanoic
OPC-8:0	Acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentényle)-cyclopentane-1-octanoïque
OPCL1	<i>OPC-8:0 COENZYME A LIGASE1</i>
OPDA	Acide <i>cis</i> -(+)-12-oxo-phytodiénoïque
OPDA-Ile	OPDA-isoleucine
OPR3	12-oxophytodiénoate réductase 3
ORA59	<i>OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
P	
p-CAg	<i>p</i> -coumaroyl-agmatine
P3P	Production et Purification des Protéines
P5CS	<i>Pyrroline-5-carboxylate synthase</i>
PAD3	<i>Phytoalexin deficient 3</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PAP1	<i>PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1</i>
pb	Paires de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Analyse en composantes principales
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
PDF1.2	<i>Plant defensin1.2</i>
phyB	Phytochrome B
PhyH	Phytohormones
PLA₁	Phospholipase-A ₁
PLAI	<i>Patatin-related phospholipase A I</i>
PLAT	<i>Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin</i>
PLT	PLETHORA
POX	Péroxygénases
PP	Phytostanes
ppm	Parties par million

PR	<i>Pathogenesis-related</i>
PUB10	<i>PLANT U-BOX PROTEIN10</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
PVDF	<i>PolyVinylidene Fluoride</i>
Q	
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
qsp	<i>Quantité suffisante pour</i>
R	
RAV2	<i>Related to ABI3/VP1</i>
RD29A	<i>Responsive to Dessication 29A</i>
RGL2	<i>RGA LIKE 2</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RING	<i>REALLY INTERESTING NEW GENE</i>
RMN	<i>Résonance magnétique nucléaire</i>
ROS	<i>Espèces réactives d'oxygènes</i>
rpm	<i>Rotation par minute</i>
RT	<i>Reverse transcription</i>
S	
S3H/S5H	<i>SA 3(5)-hydroxylase</i>
SA	<i>Acide salicylique</i>
SCF^{CO11}	<i>Skp, Cullin, F-box containing complex CO11</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SIM	<i>SUMO interacting motif</i>
SL	<i>Strigolactones</i>
ST2a	<i>Sulfotransférase 2a</i>
START	<i>Steroidogenic Acute Regulatory-related lipid transfert</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
T	
T-DNA	<i>ADN de transfert</i>
TA	<i>Acide tubéronique</i>
TAD	<i>Trans-activation domain</i>
tnOPDA	<i>TetranorOPDA</i>
TPL	<i>TOPELESS</i>
TPR	<i>TPL-Related</i>
Tris	<i>Tris(hydroxyméthyl)aminométhane</i>
U	
UGT	<i>UDP-dependent glycosyltransferase</i>
UHPLC-MS/MS	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
UV	<i>Ultra-violet</i>
V	
VOC	<i>Volatil organic compound</i>
VSP	<i>VEGETATIVE STORAGE PROTEIN</i>
W	
WS	<i>Wassilewskija</i>
X	
X-Gluc	<i>Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronique</i>
Z	
ZIM	<i>Zinc finger protein expressed in Inflorescence Meristem</i>

CHAPITRE I.

INTRODUCTION

I. Introduction

1. Les phytohormones et les oxylipines

Les plantes sont des organismes sessiles qui ne peuvent fuir une modification climatique à court ou long terme ou un prédateur. Leur capacité de développement et de survie dépend de leur adaptabilité et de leur capacité à résister aux modifications de leur environnement. Au cours de l'évolution elles ont développé des réponses physiques et chimiques qui leur permettent de lutter contre les stress abiotiques et biotiques perçus. Ces réponses peuvent être constitutives ou induites par le stress. Les plantes disposent de tout un réseau de signalisation qui leur permet de faire les connexions entre la perception des signaux environnementaux et développementaux avec les réponses moléculaires, cellulaires et physiologiques adaptées. L'établissement de ces réseaux de signalisation est médié essentiellement par la production et l'interaction des hormones végétales qui sont nommées phytohormones (**PhyH**).

1.1. Les phytohormones

Les PhyH sont des substances chimiques organiques endogènes agissant à faible dose et qui sont vectrices d'un message influençant le fonctionnement de la cellule, du tissu ou de l'organe cible pour induire un processus physiologique spécifique (Santner et al., 2009). Elles sont produites directement par leur cellule cible et elles peuvent également être transportées pour induire des réponses généralisées. Les messages véhiculés par les PhyH intègrent les multiples signaux perçus et coordonnent les réponses physiologiques adaptées par l'activation ou la répression de gènes afin de réguler de façon optimale le cycle de vie de la plante (Santner et Estelle, 2009). Leur synthèse est induite à la suite de la perception d'un stimulus, un même stimulus peut initier la biosynthèse de plusieurs PhyH. Chacune a la capacité d'induire un panel de réponses physiologiques propres, mais elles peuvent aussi induire les mêmes réponses (Song et al., 2013b).

Majoritairement les PhyH interagissent entre-elles, de façon synergique ou antagoniste (Santner et Estelle, 2009; Santner et al., 2009), ce qui définit les *crosstalks* hormonaux. Ils peuvent être directs, au moins deux PhyH ont un composant de signalisation commun. Les *crosstalks* indirects représentent le cas où un gène de réponse induit par une PhyH influe sur la signalisation d'une autre (Erb et al., 2012). L'induction des réponses est donc dépendant de la balance hormonale plus que de l'action d'une PhyH seule. Elles ont une action ponctuelle plutôt que continue, lorsque cette action est achevée elles sont inactivées par leur propre dégradation ou inactivation pour éviter les effets négatifs liés à une expression constitutive des

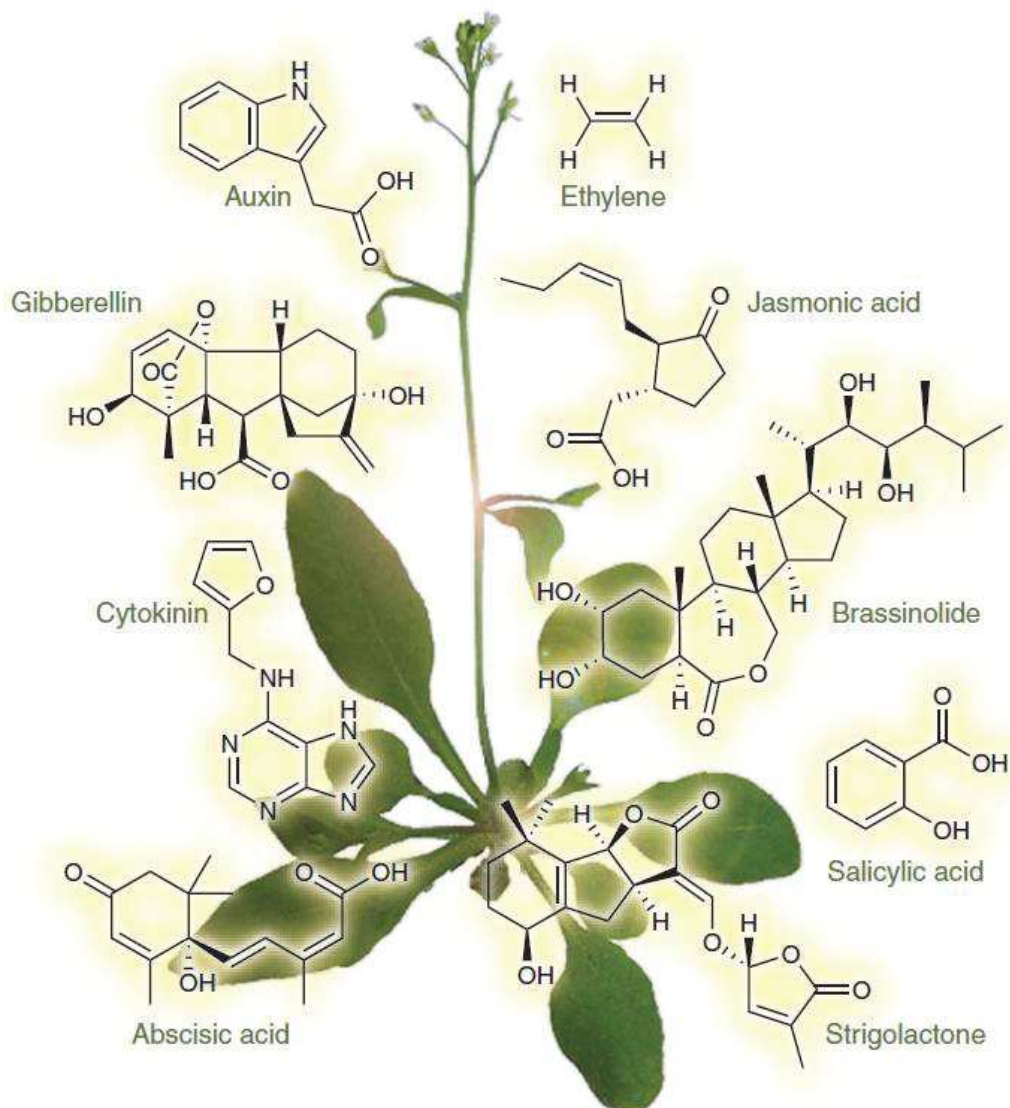


Figure 1.1. Structure des neuf classes de phytohormones.

Les hormones de croissances, dont la première fonction majoritaire caractérisée est pour le développement de la plante en réponse à un stimulus interne, sont l'auxine ou acide indole-3-acétique, les cytokinines représentées ici avec la kinétine, les gibbérellines avec l'acide gibbérellique ou GA₃, les brassinostéroïdes avec le brassinolide et les strigolactones avec le strigol.

Les hormones de stress dont la fonction biologique majeure est d'induire les réponses à la suite d'un stimulus environnemental ou un stress sont l'acide abscissique, l'acide salicylique, l'éthylène et les jasmonates avec l'acide jasmonique illustré ici.

Figure issue de Santner *et al.*, 2009.

réponses faisant que l'expression des gènes cibles est régulée également par le catabolisme phytohormonale. Toutes ces données révèlent la complexité du réseau de signalisation phytohormonale qui permet de réguler la vie de la plante.

Actuellement neuf classes de PhyH ont été découvertes et plus ou moins bien caractérisées. Cinq sont classées comme des PhyH de croissances : les cytokinines (**CK**), les auxines, les brassinostéroïdes (**BR**), les gibbérellines (**GA**) et les strigolactones (**SL**) (Figure 1.1). Les quatre autres sont des PhyH de stress, soit de stress abiotique tel l'acide abscissique (**ABA**) qui a un rôle primordial dans la résistance au stress hydrique, soit de stress biotique ce qui concerne l'acide salicylique (**SA**), l'éthylène (**ET**) et les jasmonates (**JAs**) (Figure 1.1). Cette classification simpliste est issue du rôle majeure de chacune de ces PhyH lorsqu'elles ont été caractérisée, mais en réalité toutes interviennent autant dans des processus développementaux que dans des processus de réponses aux stress. Par exemple l'ET participe à la maturation des fruits (Larsen, 2015) et à l'induction des réponses de défenses contre les nécrotrophes et les insectes broyeurs. Pour cette dernière fonction l'ET agit de concert avec les JAs qui sont les inducteurs majoritaires de ces réponses défensives (Wasternack et Hause, 2013). Les JAs dérivent d'acides gras, de par leur origine chimique et leurs structures ils sont classés dans le groupe des oxylipines (Koo, 2017).

1.2. Les Oxylipines

Le terme « oxylipine » désigne les dérivés oxygénés d'acides gras insaturés (**PUFA** pour *polyunsaturated fatty acids*). On retrouve des oxylipines dans tous les règnes du vivant : animaux, végétaux, champignons et procaryotes (Andreou et al., 2009; Gabbs et al., 2015; Wasternack et Feussner, 2017). Chez les plantes le précurseur principal des oxylipines est l'acide α -linoléique (**LeA**), un C18:3 (Figure 1.2) (Wasternack et Feussner, 2017). Les PUFA sont libérés des membranes plasmiques et plastidiales par des lipases (Gabbs et al., 2015; Wasternack et Feussner, 2017) avant d'être oxygénés spontanément par réactivité chimique (Savchenko et al., 2014) ou enzymatiquement par diverses mono- ou dioxygénases (Figure 1.2).

Les oxylipines végétales formées spontanément sont appelées phytoprostanes (**PP**) (Durand et al., 2009) et sont les analogues des oxylipines animales appelées isoprostanes (Savchenko et al., 2014). Les PP se forment suite à l'attaque du LeA par des espèces réactives d'oxygènes (**ROS**) qui causent l'abstraction d'un atome d'hydrogène et le gain d'un oxygène sur la carbone 11 ou sur le carbone 14 avant d'être cyclisé (Figure 1.2) (Thoma et al., 2003; Durand et al., 2009; Collado-González et al., 2015). Leur synthèse se produit en permanence mais augmente significativement en cas de stress, les PP agiraient comme molécules signales pour

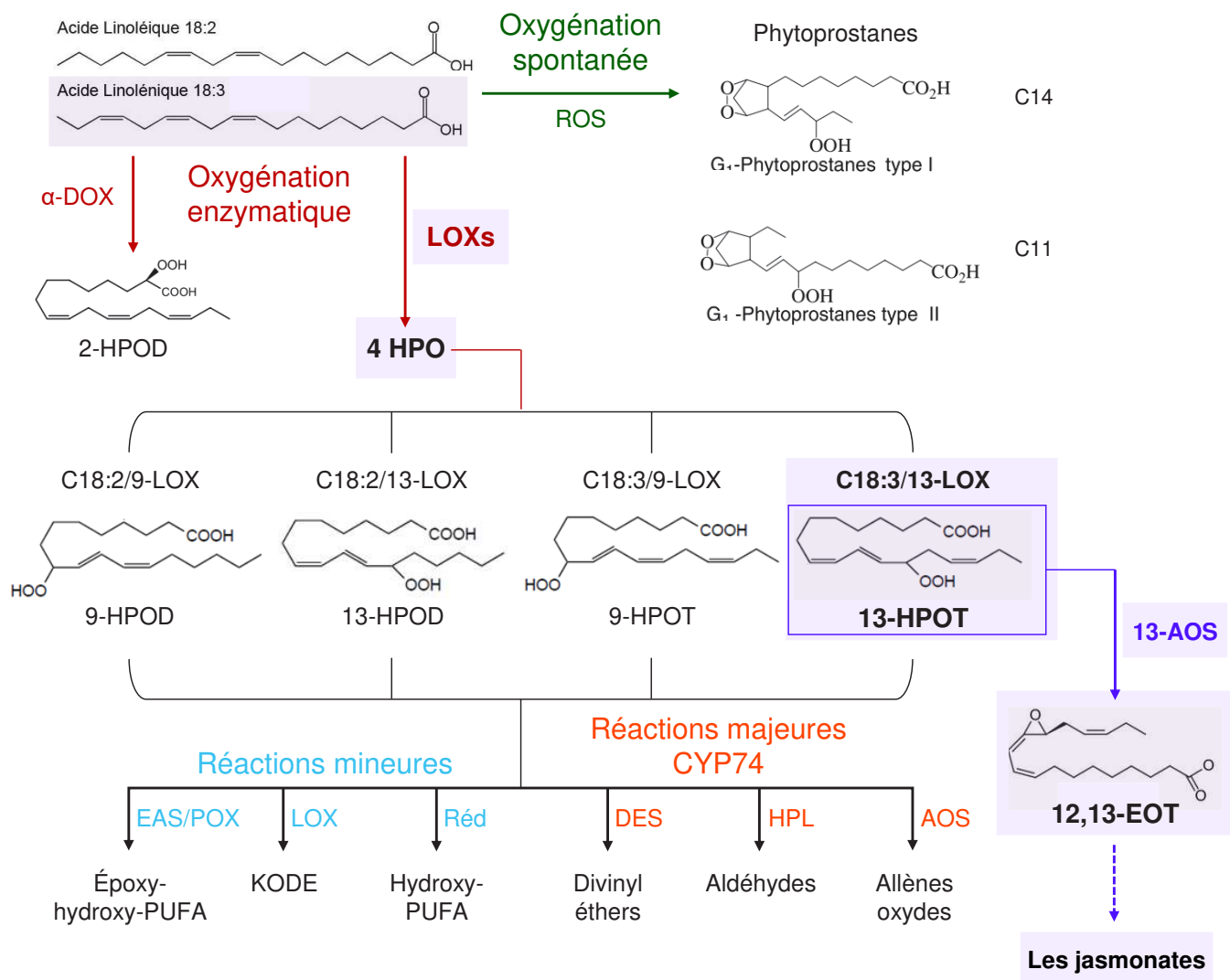


Figure 1.2. Voie de biosynthèse simplifiée des oxylipines végétales à partir des précurseurs acides gras libres.

Les acides linoléiques (C18:2) et linoléiques (C18:3) sont convertis par oxygénation spontanée (en vert) en phytoprostanes par l'action des ROS soit sur le carbone 14 ou le carbone 11 puis par cyclisation, ce qui forme respectivement les types I et II (Durand *et al.*, 2009). Les C18:2 et C18:3 peuvent être oxygénés enzymatiquement (en rouge) par les α -DOX ce qui forme du 2-HPOD (Hamberg *et al.*, 2005). Ils peuvent aussi être oxygénés par les LOX en HPO et, dépendamment du précurseur utilisé entre le C18:3 et le C18:2 et le type d'enzyme entre 9-LOX et 13-LOX, quatre HPO peuvent être produits : le 9-HPOD et le 13-HPOD qui dérivent du C18:2 ; le 9-HPOT et le 13-HPOT qui dérivent du C18:3 (Blée *et al.*, 2002). Ces HPO peuvent être métabolisés par quatre réactions mineures (en bleu) médiées par les EAS, les POX, les LOX et les réductases ce qui forme des époxy-PUFA, des hydroxy-PUFA et des KODE. Trois réactions majeures (en orange) sont caractérisées et impliquent les enzymes du clade CYP74 : les DES, les HPL et les AOS. Ces enzymes vont former respectivement des divinyl éthers, des aldéhydes et des allènes oxydes. La voie métabolique qui aboutit à la biosynthèse des jasmonates est surlignée en violet où une 13-AOS métabolise du 13-HPOT en 12,13-EOT qui sera converti en le premier jasmonate.

2-HPOD = acide 2(R)-hydroperoxylinoléique ; 9-HPOD = 9-hydroperoxy-octadécadiénoïque ; 9-HPOT = (9S)-hydroperoxy octadécatriénoïque ; 12,13-EOT = l'acide 12,13 époxyoctadécatriénoïque ; 13-HPOD = 13-hydroperoxy-octadécadiénoïque ; 13-HPOT = (13S)-hydroperoxy octadécatriénoïque ; α -DOX = α -dioxigénase ; AOS = allène oxydes synthases ; CYP74 = cytochrome P450 de la famille 74 ; DES = divinyl éthers synthases ; EAS = epoxy alcohol synthase ; HPL = hydroperoxydes lyases ; HPO = hydroperoxydes ; KODE = cétydiènes ; LOX = lipoxigénase ; PUFA = polyunsaturated fatty acids ; POX = peroxygénase ; Réd = réductase ; ROS = espèces réactives d'oxygènes.

induire des réponses défensives notamment via la synthèse de phytoalexines (Thoma et al., 2003; Durand et al., 2011; Savchenko et al., 2014).

Plusieurs familles enzymatiques permettent la synthèse d'une diversité d'oxylipines depuis le précurseur LeA, dont les JAs (Figure 1.2) (Wasternack et Feussner, 2017). Par exemple les α -dioxygénases (**α -DOX**) qui forment l'acide 2(R)-hydroperoxylinolenic (**2-HPOD**) (Figure 1.2) (Hamberg et al., 1999; Blée, 2002; Hamberg et al., 2002). Ou encore les lipoxygénases (**LOX**), des dioxygénases qui représentent la famille d'enzymes majoritaires pour l'oxygénation des PUFA (Bannenberg et al., 2009; Wasternack et Feussner, 2017). Il existe les 9-LOXs et les 13-LOXs qui vont créer une fonction hydroperoxyde respectivement sur le carbone 9 et sur le carbone 13 du LeA pour former les acides (9S)- et (13S)-hydroperoxy octadécatriénoïque (**9-HPOT**, **13-HPOT**) (Feussner et Wasternack, 2002). Dans le cas où le précurseur est l'acide linoléique (C18:2) il en dérive les acides 9- et 13-hydroperoxy-octadécadiénoïque (**9-HPOD**, **13-HPOD**) (Figure 1.2) (Nuñez et al., 2001). Ces hydroperoxydes (**HPO**) sont très réactifs et peuvent être substrats de diverses réactions enzymatiques considérés comme mineures ou majeures selon l'importance de leurs produits dans la biologie de la plante et de leur niveau de caractérisation (Feussner et Wasternack, 2002).

1.2.1. La métabolisation des hydroperoxydes

Quatre réactions mineures sont connues et encore peu caractérisées. La première est l'*epoxy alcohol synthase* (**EAS**) qui forme des époxy- et hydroxy-PUFA (Figure 1.2) (Hamberg, 1999). La seconde réaction est catalysée par les peroxygénases (**POX**) qui vont aussi former des époxy- et hydroxy-PUFA (Figure 1.2) (Hamberg, 1995; Feussner et Wasternack, 2002; Meesapyodsuk et Qiu, 2011). Les LOX produisant les 9- et 13-HPOs peuvent également utiliser ces produits comme substrats formant les 9- et 13-ketodienes (**KODE**) selon le substrat (Figure 1.2), ce qui définit la troisième réaction mineure (Kuhn et al., 1991; Feussner et Wasternack, 2002). La quatrième réaction mineure consiste en une réduction des 9-HPO et 13-HPO en hydroxy-PUFA de façon POX indépendante par des réductases dont l'identité moléculaire est inconnue (Figure 1.2) (Feussner et Wasternack, 2002).

Il existe trois réactions majeures, bien caractérisées, qui convertissent les produits des 9- et 13-LOXs et toutes sont médiées par des monooxygénases à cytochromes P450 (**CYP**) de la famille 74 (**CYP74**). Ces P450 sont atypiques par leur localisation, qui est plastidiale et non dans le réticulum endoplasmique, et par leur mécanisme d'action. Elles ne nécessitent pas de transfert d'électron via le NADPH ni d'une molécule d'oxygène qu'elles utilisent directement sur la fonction époxyde de leur substrat (Stumpe et Feussner, 2006; Brash, 2009). Les trois réactions sont médiées par les allènes oxydes synthases (**AOS**), les hydroperoxydes lyases

(HPL) et les divinyls éthers synthases (DES) (Figure 1.2) (Brash, 2009; Wasternack et Feussner, 2017). Leur classification est basée sur les substrats HPO qu'elles acceptent ou non, par exemple les CYP74A regroupent les AOS qui sont spécifique des substrat 13-HPOD et 13-HPOT et qui sont aussi nommées 13-AOS (Stumpe et Feussner, 2006). L'action des DES forme des divinyl éthers qui s'accumulent après infection ce qui suggèrent que les DES et leurs produits interviennent dans les réponses de défenses des plantes. (Figure 1.2) (Galliard et Phillips, 1972; Galliard et al., 1973; Grechkin et al., 1995; Gorina et al., 2014). L'activité des HPL va cliver les substrats HPO en ω -oxo acide gras et en aldéhyde à chaîne courte (Figure 1.2), des constituants des *Green Leaf Volatiles* (GLV) impliqués dans la défense indirecte par l'attraction des prédateurs des herbivores (Tijet et al., 2001; Kandzia et al., 2003; Chehab et al., 2008; Amo et al., 2013). Les AOS sont des déshydrogénases qui vont former des allènes oxydes (Figure 1.2) qui peuvent eux-mêmes être métaboliser en diverses composés (Grechkin et Hamberg, 2000; Hamberg, 2000; Howe et Schillmiller, 2002; Stumpe et al., 2006). Tout comme les DES et les HPL, la diversité des produits formés par les AOS dépend du substrat usité entre les 9- ou les 13-HPO. Le produit majeur pour les plantes par l'action des AOS est l'acide 12,13(S)-époxy-octadecatriénoïque (**12,13-EOT**) qui est formé spécifiquement par les 13-AOS à partir de 13-HPOT (Howe et Schillmiller, 2002; Rustgi et al., 2019). Ce composé 12,13-EOT est le précurseur du premier jasmonate formé, un acide oxo-phytodiénoïque duquel dérive toute cette famille hormonale (Figure 1.2).

2. Biosynthèse, métabolisme et signalisation des jasmonates

Les JAs sont connus de longue date et ont été découverts chez *Jasminum grandiflorum* (Jasmin), qui a inspiré le nom de cette famille de composés, bien avant de comprendre leurs activités hormonales. Le méthyl-jasmonate (**MeJA**) a été le premier identifié, comme composé odorifère de l'huile essentielle de jasmin (Demole et al., 1962). L'acide jasmonique (**JA**) libre a été isolé la première fois dans des cultures de *Lasiodiplodia theobromae*, l'agent de la pourriture noire des cabosses de cacaoyer, en tant qu'inhibiteur de la croissance (Aldridge et al., 1971). Ce n'est que plus tard qu'il a été identifié comme un composé endogène des plantes (Dathe et al., 1981) et que ses rôles biologiques furent caractérisés. L'un de ces rôles est l'induction des réponses de défenses contre les pathogènes nécrotrophes et les insectes herbivores de types broyeur (Wasternack et Hause, 2013).

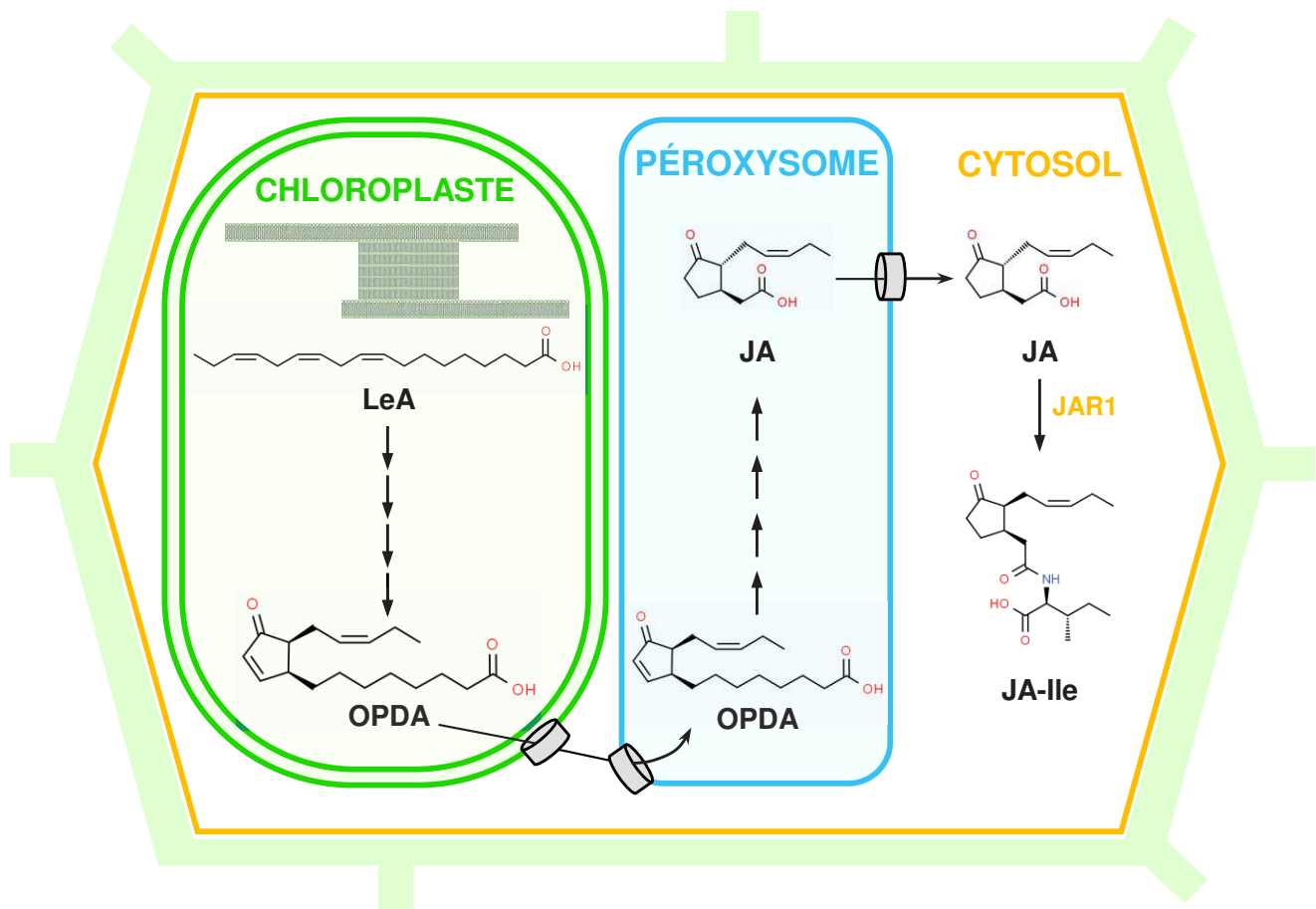


Figure 1.3. Voie simplifiée de la biosynthèse compartimentée des jasmonates.

Les premières étapes de la synthèse débutent dans le (chloro)plaste où sont localisées les enzymes permettant la métabolisation du précurseur acide gras LeA en OPDA, le premier jasmonate. Cet OPDA est transporté dans le péroxysome où se situent les enzymes qui peuvent le métaboliser en la pro-hormone JA. Le JA est ensuite excrété dans le cytosol où il est conjugué à l'isoleucine par JAR1 pour former le JA-Ile qui est considéré comme l'hormone bioactive majoritaire permettant l'induction des réponses (Wasternack et Hause, 2013).

JA = acide (-)-jasmonique ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAR1 = jasmonate résistant1 ; LeA = acide α -linoléique ; OPDA = acide *cis*-(+)-12-oxo-phytyldiénoïque.

2.1. La biosynthèse

2.1.1. Les stimuli induisant la synthèse des jasmonates

Outre la défense contre les pathogènes nécrotrophes et les insectes herbivores, les JAs sont induits par plusieurs processus développementaux ou par certains stress abiotique qui sont bien documentés (Santino et al., 2013; Wasternack et Strnad, 2019). Parmi les stimuli développementaux les JAs sont induits par exemple lors du développement floral au niveau du filet des étamines chez *Arabidopsis* (Wasternack et Hause, 2013). En ce qui concerne les stress abiotiques les JAs sont synthétisés suite à la perception du froid, du sel, de la sécheresse ou d'un déséquilibre osmotique (Santino et al., 2013). Le dernier stimulus induisant puissamment la synthèse des JAs est la blessure mécanique qui sert beaucoup dans les études de laboratoire (Glauser et al., 2008).

Vick et Zimmerman ont proposé le premier modèle de la biosynthèse des JAs (Vick et Zimmerman, 1983) qui a été étoffé au cours des 35 dernières années par d'intenses recherches (Wasternack et Hause, 2013; Koo, 2017; Wasternack et Feussner, 2017; Wasternack et Strnad, 2018). La synthèse des JAs est très compartimentée dans la cellule (Figure 1.3) dû à la localisation distincte des différentes enzymes clés des étapes successives de conversions des précurseurs et intermédiaires. Elle est initiée dans le (chloro)-plaste où est formé l'acide 12-oxo-phytodiénoïque, le premier jasmonate qui sera transporté dans le péroxysome où il sera converti en JA (Figure 1.3). Le JA est ensuite relargué dans le cytosol où une des modifications possible est sa conjugaison à l'isoleucine pour former l'hormone bioactive jasmonoyl-L-isoleucine (**JA-Ile**) (Figure 1.3) (Wasternack et Feussner, 2017; Wasternack et Strnad, 2018).

2.1.2. Synthèse du premier jasmonate dans le chloroplaste

Les précurseurs des JAs sont deux PUFA, l'acide hexadecatriénoïque (**C16:3, HtA**) et majoritairement le LeA (C18:3) (Figure 1.4) (Wasternack et Feussner, 2017; Wasternack et Strnad, 2018). Ils proviennent des membranes lipidiques chloroplastiques et thylakoïdiennes qui sont riches en acides gras, ils sont estérifiés dans les membranes sur le carbone 1 avec une fonction carboxyle (Nilsson et al., 2012) avant la formation de trois insaturations par les *fatty acids desaturases* (**FAD**) (Miquel et Browse, 1992; McConn et Browse, 1996). La libération du C18:3 des membranes plastidiales est permise par l'action d'enzymes possédant une activité phospholipase-A₁ et/ou galactolipase (**PLA₁**) (Figure 1.4) (Wasternack et Hause, 2013). *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1* (**DAD1**) est une phospholipase exprimée dans le filet des étamines et est essentielle pour la libération du précurseur C18:3 des JAs

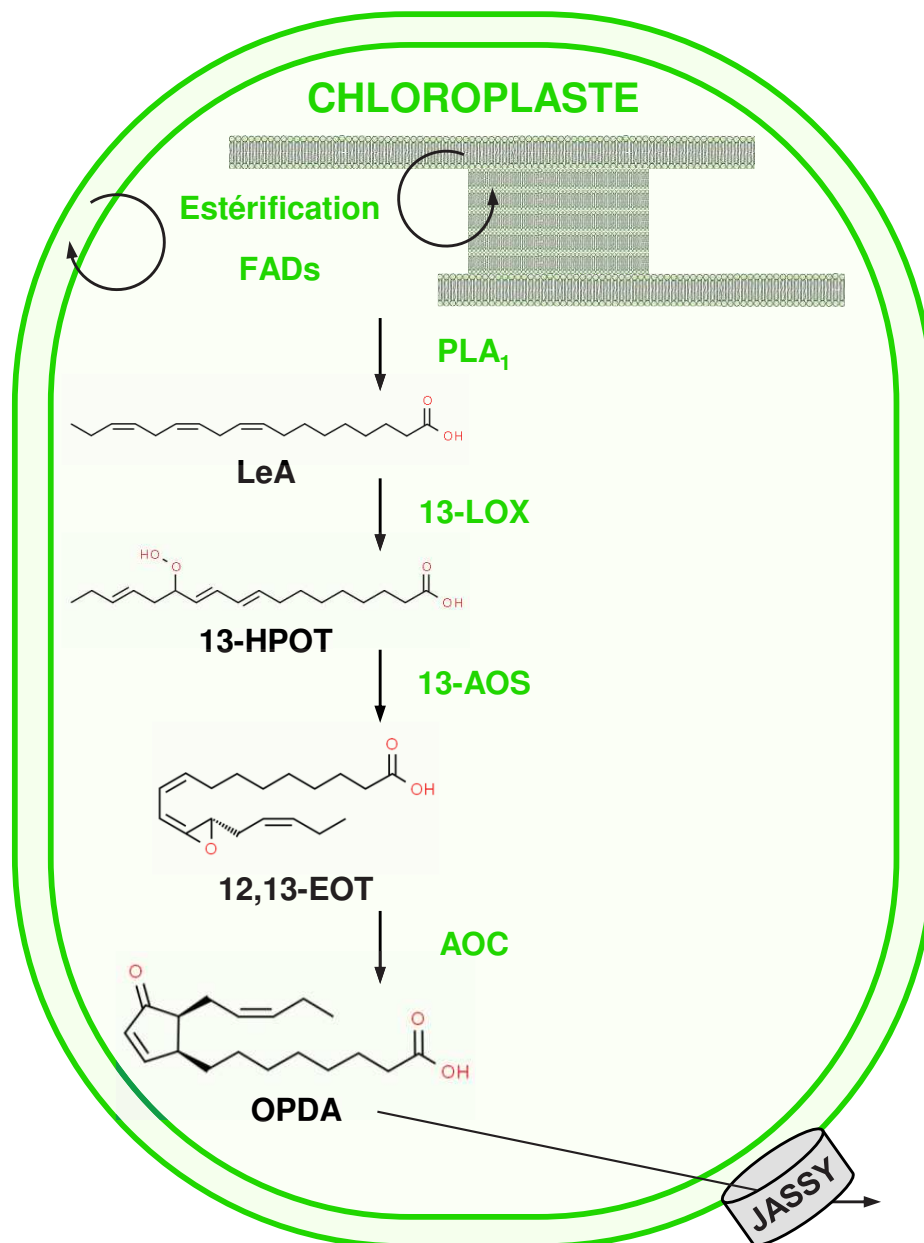


Figure 1.4. Biosynthèse de l'OPDA dans le chloroplaste.

Les lipides de l'enveloppe chloroplastique et des membranes thylakoïdiennes sont estérifiés avec une fonction carboxyle et trois insaturations sont apportées par les FAD (Miquel et Browse, 1992; McConn et Browse, 1996; Nilsson *et al.*, 2012) ce qui forme des acides gras tel que le LeA (C18:3). Le LeA est libéré des membranes par des enzymes possédant une activité de phospholipase avant d'être oxygéné sur le carbone n°13 par des 13-LOX ce qui forme le 13-HPOT (Wasternack et Hause, 2013). Cette molécule est ensuite métabolisée par des CYP74A, aussi appelées 13-AOS, qui vont créer par déshydratation une fonction époxyde à partir du carbone n°13 oxygéné pour produire le 12,13-EOT (Laudert *et al.*, 1996; Koo, 2017). La dernière étape chloroplastique consiste en la conversion du 12,13-EOT en OPDA par l'action d'AOC qui vont cycliser la molécule en pentacycle en reliant la fonction époxyde portée par le carbone n°13 avec le carbone n°9 (Ziegler *et al.*, 2000). L'OPDA est considéré comme le premier jasmonate et est le précurseur de toute cette famille phytohormonale. Il est exporté du chloroplaste par les transporteurs JASSY (Guan *et al.*, 2019), qui sont présents sur la membrane externe de l'enveloppe chloroplastique, pour permettre leur métabolisation en d'autres jasmonates.

12,13-EOT = acide 12,13 époxyoctadecatriénoïque ; 13-AOS = allène oxydes synthases de type 13 ; 13-HPOT = (13S)-hydroperoxy octadécatriénoïque ; 13-LOX = lipoxigénase de type 13 ; AOC = allène oxydes cyclase ; CYP74A : cytochrome P450 de la famille 74, sous-famille A ; FAD = *fatty acids desaturases* ; JASSY = transporteur de la membrane externe de l'enveloppe chloroplastique ; LeA = acide α -linoléique ; OPDA = acide *cis*-(+)-12-oxo-phytyldiénoïque ; PLA₁ = enzyme à activité phospholipase-A₁.

nécessaires à la fertilité mâle (Ishiguro et al., 2001). Plus d'une cinquantaine de lipases sont prédites pour avoir une localisation plastidiale et leurs fonctions biologiques restent à caractériser (Ajjawi et al., 2010). Il apparaît donc difficile de caractériser une ou des lipases spécifiques pour la synthèse des JAs en réponses à un stress biotique du fait de l'implication de larges familles multigéniques, avec probablement des activités redondantes.

Le LeA libre est oxygéné par les lipoxygénases de type 13 pour former le 13-HPOT (Figure 1.4). LOX2 est la première lipoxygénase caractérisée pour la synthèse des JAs après blessure (Bell et al., 1995). Parmi les six LOX d'*Arabidopsis* quatre présentent une activité 13-LOX : LOX2, 3, 4 et 6 (Bannenberg et al., 2009). LOX3 est inductible par la blessure (Gfeller et al., 2011) et on observe une stérilité mâle dû à une déficience en JAs seulement lorsque la plante est déficiente pour LOX3 et LOX4 (Caldelari et al., 2011). Il existe donc une redondance fonctionnelle entre les 13-LOX et elles sont toutes les quatre impliquées pour la synthèse de JAs après blessure (Chauvin et al., 2013). Leurs patrons d'expression différents permettent une action hiérarchisée et conditionne la synthèse des JAs, par exemple LOX2 ne se trouve pas dans les fleurs (Caldelari et al., 2011).

Le 13-HPOT est métabolisé par une 13-AOS (Figure 1.2) qui va convertir par déshydratation le groupement hydroperoxyde formé par les 13-LOX en fonction époxyde ce qui génère le 12,13-EOT (Figures 1.2 et 1.4) (Laudert et al., 1996; Koo, 2017). Chez *Arabidopsis*, 13-AOS représente un point critique de la synthèse des JAs car il n'existe qu'un gène qui code l'enzyme (Park et al., 2002). Une déficience de la 13-AOS élimine totalement la production de JAs et cause, entre autres, une grande susceptibilité aux agresseurs et une stérilité mâle (Park et al., 2002).

La dernière étape chloroplastique est catalysée par les allène oxyde cyclases (**AOC**) qui vont cycliser le 12,13-EOT en formant un pentacycle ce qui donne l'acide *cis*-(+)-12-oxo-phytyldiénoïque (**OPDA**) (Figure 1.4) (Ziegler et al., 2000). Il y a quatre gènes qui codent pour des AOC chez *Arabidopsis* et tous contribuent à la biosynthèse des JAs (Schaller et al., 2008). Présentes dans la plupart des tissus, elles ont néanmoins une activité promotrice distincte et donc un impact biologique potentiellement différent. Les AOC n'acceptent que le 12,13-EOT (C18:3) et non des dérivés en C18:2 par exemple et produisent *in vivo* uniquement la configuration *cis* de l'OPDA (Ziegler et al., 2000; Wasternack et Kombrink, 2010). L'OPDA est le premier JAs et sa stéréochimie donnée par les AOC se retrouve dans les JAs qui en dérivent et est essentielle pour la signalisation médiée par le JA-Ile.

L'ensemble des enzymes 13-LOX, 13-AOS et AOC sont, comme le précurseur LeA, localisées au niveau des thylakoïdes et de l'enveloppe chloroplastique (Farmaki et al., 2007; Hölzl et Dörmann, 2019; Pollmann et al., 2019). Récemment il a été démontré que LOX2, 13-AOS et

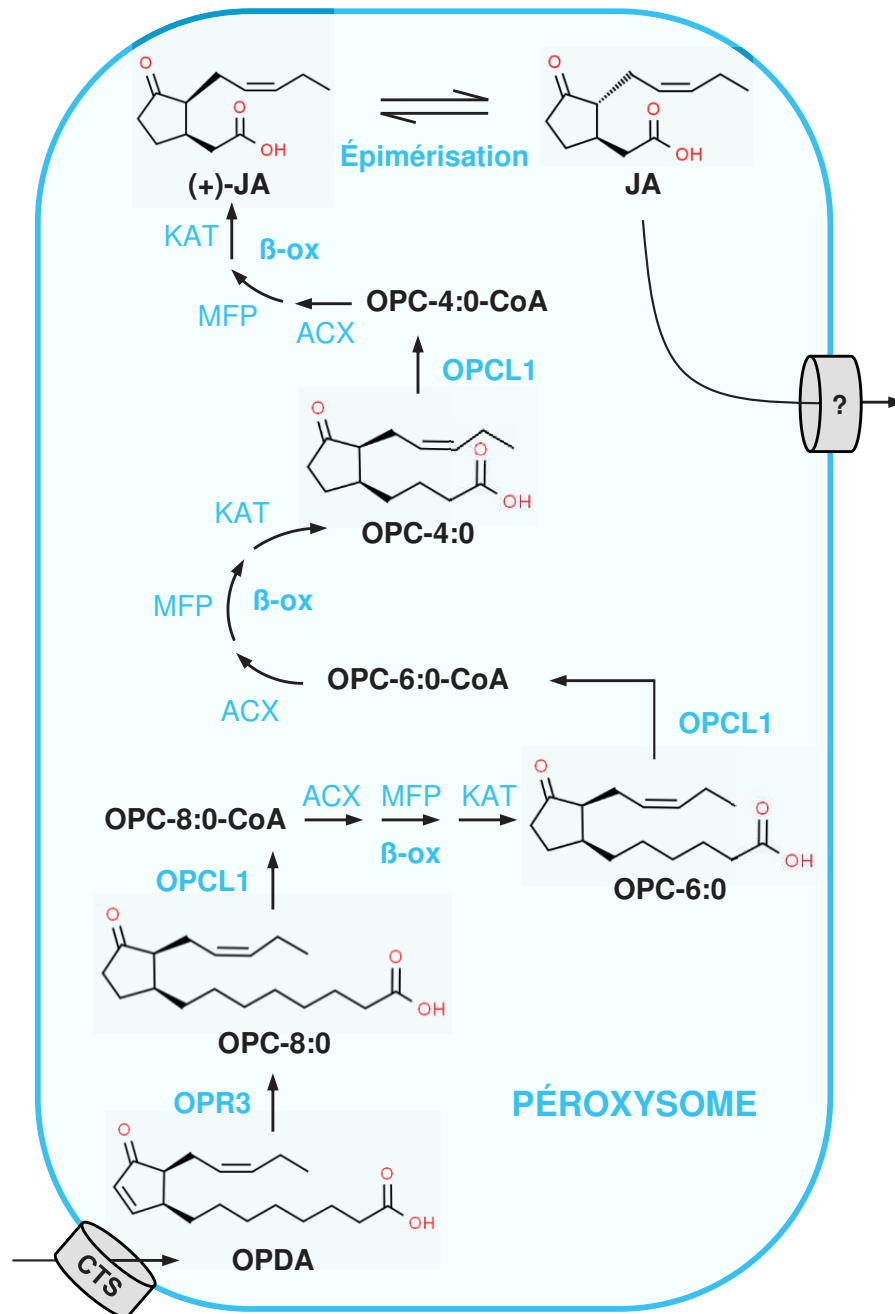


Figure 1.5. Métabolisme peroxysomale de l'OPDA en JA.

L'OPDA est importé dans le peroxysome par le transporteur CTS puis il subit une réduction de la double liaison du pentacycle par OPR3 ce qui forme l'OPC-8:0 (Footitt *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2000). Cette molécule est activée par l'estérification d'un CoA par une *ACYL ACTIVATING ENZYME* nommé OPCL1 ce qui produit l'OPC-8:0-CoA (Koo, 2017). Ensuite trois cycles de β -oxydation effectué par trois enzymes, une ACX, une MFP et une KAT réduisent l'OPC-8:0-CoA. Parmi les six ACX, les deux MFP et les trois KAT connus chez *Arabidopsis* (Koo, 2017) c'est ACX1 et ACX5 (Li *et al.*, 2005; Schillmiller *et al.*, 2007), la MFP AIM1 (*abnormal inflorescence meristem1*) (Delker *et al.*, 2007) et KAT2 (Cruz Castillo *et al.*, 2004) qui ont la fonction majoritaire de β -oxydation pour la synthèse des JAs. Le premier cycle de β -oxydation libère une molécule à 16 carbones appelée OPC-6:0 qui effectuera le second cycle après activation par OPLC1 en OPC-6:0-CoA qui formera une molécule à 14 carbones nommé OPC-4:0 (Kienow *et al.*, 2008). Enfin l'estérification en OPC-4:0-CoA et le troisième cycle donne le (+)-JA, une molécule à 12 carbones qui s'épimérise spontanément en JA (Browse et Howe, 2008) avant d'être exporté dans le cytosol (Koo, 2017).

(+)-JA = acide (+)-7-iso-jasmonique ; β -ox = β -oxydation ; ACX = *acyl-CoA oxidase* ; CoA = Coenzyme A ; CTS = COMATOSE ; JA = jasmonate ou acide jasmonique ou acide (-)-jasmonique ; KAT = *3-ketoacyl-CoA thiolase* ; MFP = *multifunctional protein* ; OPC-4:0 = l'acide 3-oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-butyrique ; OPC-6:0 = acide 3-oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-hexanoïque ; OPC-8:0 = acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentényle)-cyclopentane-1-octanoïque ; OPCL1 = *opc-8:0 coenzyme A ligase1* ; OPDA = acide *cis*-(+)-12-oxo-phytyldiénoïque ; OPR3 = *12-oxophytyldiénoate réductase 3*.

AOC2 forment un complexe chez *Arabidopsis* au niveau de l'enveloppe du chloroplaste qui permet de catalyser les premières étapes de la biosynthèse des JAs en excluant la conversion concurrente du 13-HPOT par les HPL (Figure 1.2) (Pollmann et al., 2019).

2.1.3. Métabolisation de l'OPDA dans le Peroxysome

La seconde partie de la biosynthèse des JAs est dans le peroxysome où se localisent les enzymes qui permettent la métabolisation de l'OPDA en JA (Wasternack et Strnad, 2018). La sortie du chloroplaste de l'OPDA est effectuée par le transporteur **JASSY** (Figure 1.4) (Guan et al., 2019). C'est une protéine qui possède le domaine *Steroidogenic Acute Regulatory-related lipid transfert* (**START**) permettant le trafic intracellulaire lipidique (Schrick et al., 2014). L'OPDA peut se lier à JASSY qui agit comme un canal membranaire pour permettre sa sortie du chloroplaste. Il est ensuite transporté dans le péroxysome et son entrée est facilitée par un transporteur à *ATP-binding cassette* (**ABC**) nommé COMATOSE (**CTS**) (Figure 1.5) (Footitt et al., 2002; Theodoulou et al., 2005). La déficience de JASSY ou de CTS cause une diminution drastique de l'accumulation du JA en absence de stimulus et également après blessure (Theodoulou et al., 2005; Guan et al., 2019).

La première étape catalytique dans le peroxysome fait intervenir la 12-oxophytodiénoate réductase 3 (**OPR3**) qui va réduire la double liaison du pentacycle de l'OPDA pour produire l'acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentényle)-cyclopentane-1-octanoïque (**OPC-8:0**) (Figure 1.5) (Schaller et al., 2000). Sa caractérisation approfondie a montré qu'OPR3 a une préférence pour les *cis*-isomères (Schaller et Weiler, 1997) ce qui démontre l'importance de la stéréochimie apportée par les AOC pour une conversion optimale du substrat.

L'OPC8:0 subit une étape d'activation par estérification avec le Coenzyme A (**CoA**) catalysée par l'OPC-8:0 COENZYME A LIGASE1 (**OPCL1**), formant l'OPC8:0-CoA (Figure 1.5) (Koo et al., 2006; Koo, 2017). Le mutant *opc1* montre une suraccumulation de l'OPC-8:0 et non de l'OPDA ce qui prouve qu'OPCL1 intervient sur le produit d'OPR3 (Koo et al., 2006; Kienow et al., 2008). L'OPC-8:0CoA va ensuite être raccourci au niveau de sa chaîne latérale par trois cycles de β -oxydation nécessitant trois enzymes pour chaque cycle (Figure 1.5). D'abord une *acyl-CoA oxidase* (**ACX**), puis une *multifunctional protein* (**MFP**) et enfin une *3-ketoacyl-CoA thiolase* (**KAT**) (Hu et al., 2012; Fürstenberg-Hägg et al., 2013; Koo, 2017). Le premier cycle résulte en la libération de deux carbones de l'OPC-8:0 ce qui donne l'acide 3-oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-hexanoïque (**OPC-6:0**) (Figure 1.5). L'OPC-6:0 est lui-même estérifié par OPCL1 et subit le second cycle de β -oxydation pour former l'acide 3-oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-butyrique (**OPC-4:0**) (Figure 1.5) qui sera à son tour activé par OPCL1 et réduit par le dernier cycle (Kienow et al., 2008). Cette action séquentielle fournira l'isomère

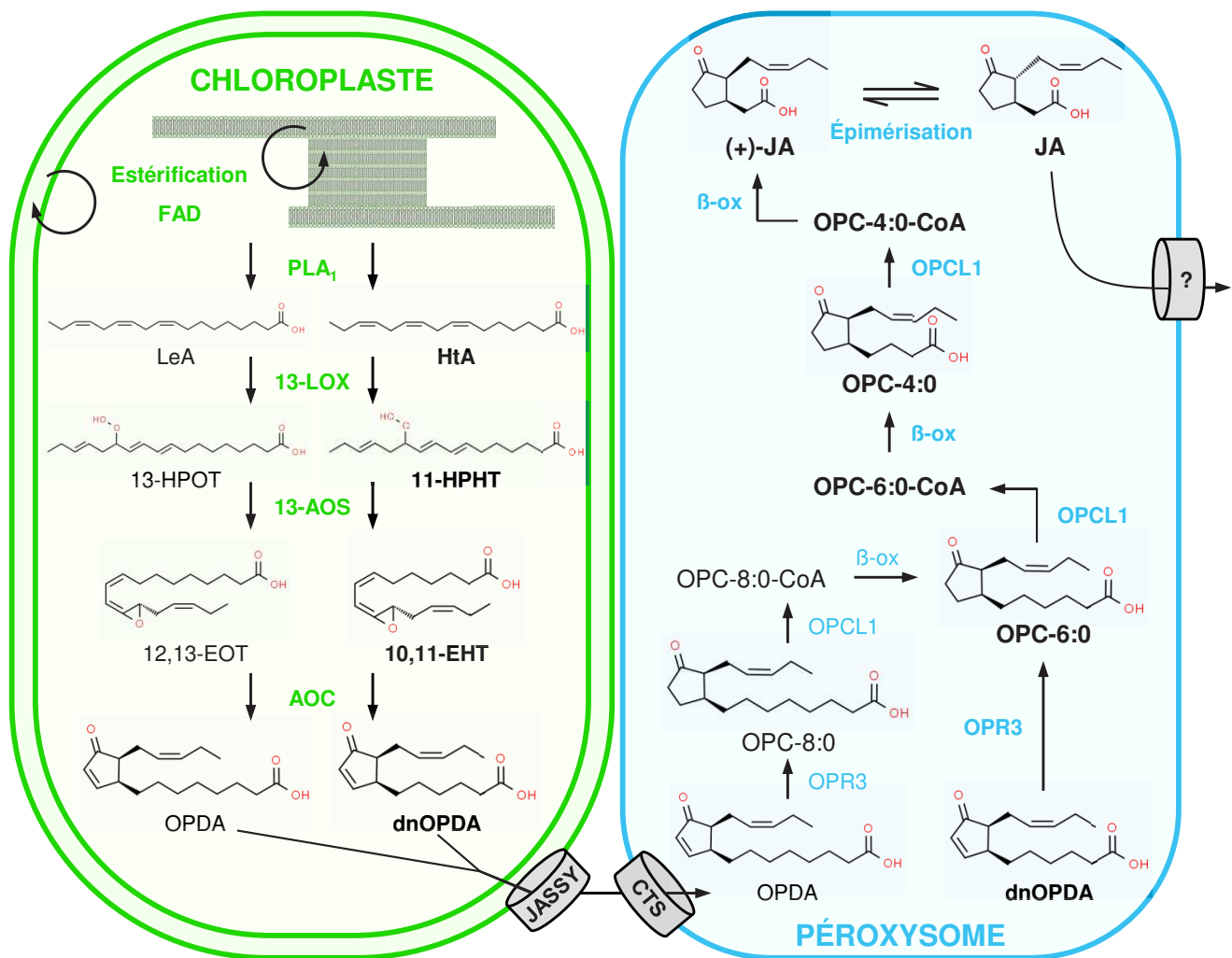


Figure 1.6. Biosynthèse des JAs à partir du précurseurs C16:3.

A l'image du *Lea*, le HtA est libéré des membranes chloroplastiques par des enzymes possédant une activité de phospholipase avant d'être oxygéné par une 13-LOX ce qui forme le 11-HPHT (Schaller et Stintzi, 2009). Cette molécule est ensuite métabolisée par une 13-AOS formant ainsi le 10,11-EHT qui est cyclisée par une AOC pour former le dnOPDA, un précurseur chloroplastique à 16 carbones (Weber *et al.*, 1997; Schaller et Stintzi, 2009). Tout comme l'OPDA il est transporté dans le peroxyssome via des transporteurs, probablement JASSY et CTS (Dave *et al.*, 2011), où il est réduit par OPR3 ce qui forme l'OPC-6:0 (Schaller et Stintzi, 2009). Cette molécule est activée par OPCL1 produisant l'OPC-6:0-CoA avant de subir seulement deux cycles de β -oxydation pour générer le (+)-JA qui s'épimérise en JA (Browse et Howe, 2008) avant d'être exporté dans le cytosol (Koo, 2017).

(+)-JA = acide (+)-7-iso-jasmonique ; 10,11-EHT = acide 10,11-(S)-epoxy hexadecatriénoïque ; 13-AOS = allène oxydes synthases de type 13 ; 11-HPHT = acide 11(S)-hydroperoxy-hexa-decatriénoïque ; 13-LOX = lipoxygénase de type 13 ; β -ox = β -oxydation ; ACH = acyl-thioestérase ; ACX = *acyl-CoA oxidase* ; AOC = allène oxydes cyclase ; CoA = Coenzyme A ; CTS = comatose ; dnOPDA = acide dinor-oxo-phytodiénoïque ; HtA = acide hexadecatriénoïque ; JA-CoA = jasmonate coenzyme A ; JA = acide (-)-jasmonique ; JASSY = transporteur de la membrane externe de l'enveloppe chloroplastique ; KAT = *3-ketoacyl-CoA thiolase* ; LeA = acide α -linoléique ; MFP = *multifunctional protein* ; OPC-4:0 = l'acide 3-oxo-2-(2'-pentényl)-cyclopentane-1-butérique ; OPC-6:0 = acide 3-oxo-2-(2'-pentényl)-cyclopentane-1-hexanoïque ; OPC-8:0 = acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentényl)-cyclopentane-1-octanoïque ; OPCL1 = *opc-8:0 coenzyme A ligase1* ; OPDA = acide *cis*-(+)-12-oxo-phytodiénoïque ; OPR3 = 12-oxophytodiénoate réductase 3 ; PLA₁ = enzyme à activité phospholipase-A₁.

acide 3-oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentaneacetic, une molécule à 12 atomes de carbone, aussi appelé acide (+)-7-iso-jasmonique (**(+)-JA**) (Figure 1.5).

Le (+)-JA s'épimérise spontanément en acide (-)-jasmonique qui est thermodynamiquement plus stable (Figure 1.5) (Browse et Howe, 2008). C'est cet épimère qu'on appelle classiquement acide jasmonique ou JA et qui correspond à une pro-hormone.

2.1.4. Formation de l'hormone active dans le cytoplasme

Le JA est ensuite exporté dans le cytosol par un transporteur encore non identifié (Figure 1.5) où il peut être couplé à l'isoleucine (**Ile**) par l'enzyme soluble *JASMONATE RESISTANT1* (**JAR1**) ce qui va le convertir en (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine (**JA-Ile**) (Figure 1.3) (Staswick et Tiryaki, 2004; Westfall et al., 2012). JAR1 présente une haute spécificité stéréochimique pour l'épimère (-)-JA qui est conjugué cent fois plus vite que l'acide (+)-7-iso-jasmonique (Guranowski et al., 2007). JAR1 appartient à la famille des *IAA-amido synthetase* de type Gretchen Hagen3 (**GH3**) qui comprennent de nombreux membres incomplètement caractérisés. Elle fonctionne par adénylation qui permet d'initier la conjugaison aux acides aminés telle l'Ile (Staswick et al., 2002).

Le JA-Ile formé correspond à l'hormone bioactive majeure induisant les réponses JAs dépendantes (Thines et al., 2007; Wasternack et Hause, 2013) ce qui a relégué le JA, longtemps considéré comme l'entité active, au rang de pro-hormone. Cette considération venait du fait que pour les autres PhyH les formes conjuguées représentent des formes inactives, de stockage ou encore avec un rôle spécifique (Sembdner et al., 1994; Piotrowska et Bajguz, 2011). Néanmoins un traitement du mutant *jar1* avec du JA-Ile mais pas avec du JA entraîne un retard dans la croissance racinaire, indiquant que la conversion de JA en JA-Ile a une signification biologique (Figure 1.3) (Staswick et Tiryaki, 2004).

2.1.5. Synthèse initiée depuis le C16:3

La voie de synthèse décrite jusqu'ici s'applique lorsque le précurseur est le LeA. Dans le cas où la formation des JAs est initiée à partir du précurseur HtA (C16:3) les étapes enzymatiques sont les mêmes mais forment d'autres intermédiaires métaboliques (Figure 1.6) (Schaller et Stintzi, 2009). Tout comme avec le LeA, la libération de l'HtA est effectuée par des lipases avant qu'il soit métabolisé par 13-LOX puis par 13-AOS et enfin par AOC. L'action de ces enzymes forment respectivement de l'acide 11(S)-hydroperoxy-hexa-decatriénoïque (**11-HPHT**), de l'acide 10,11-(S)-epoxy hexadecatriénoïque (**10,11-EHT**) et de l'acide dinor-oxo-phytydiénoïque (**dnOPDA**) (Figure 1.6) (Weber et al., 1997; Schaller et Stintzi, 2009). Le dnOPDA est ensuite transporté dans le peroxyosome où il est réduit par OPR3 ce qui donne de

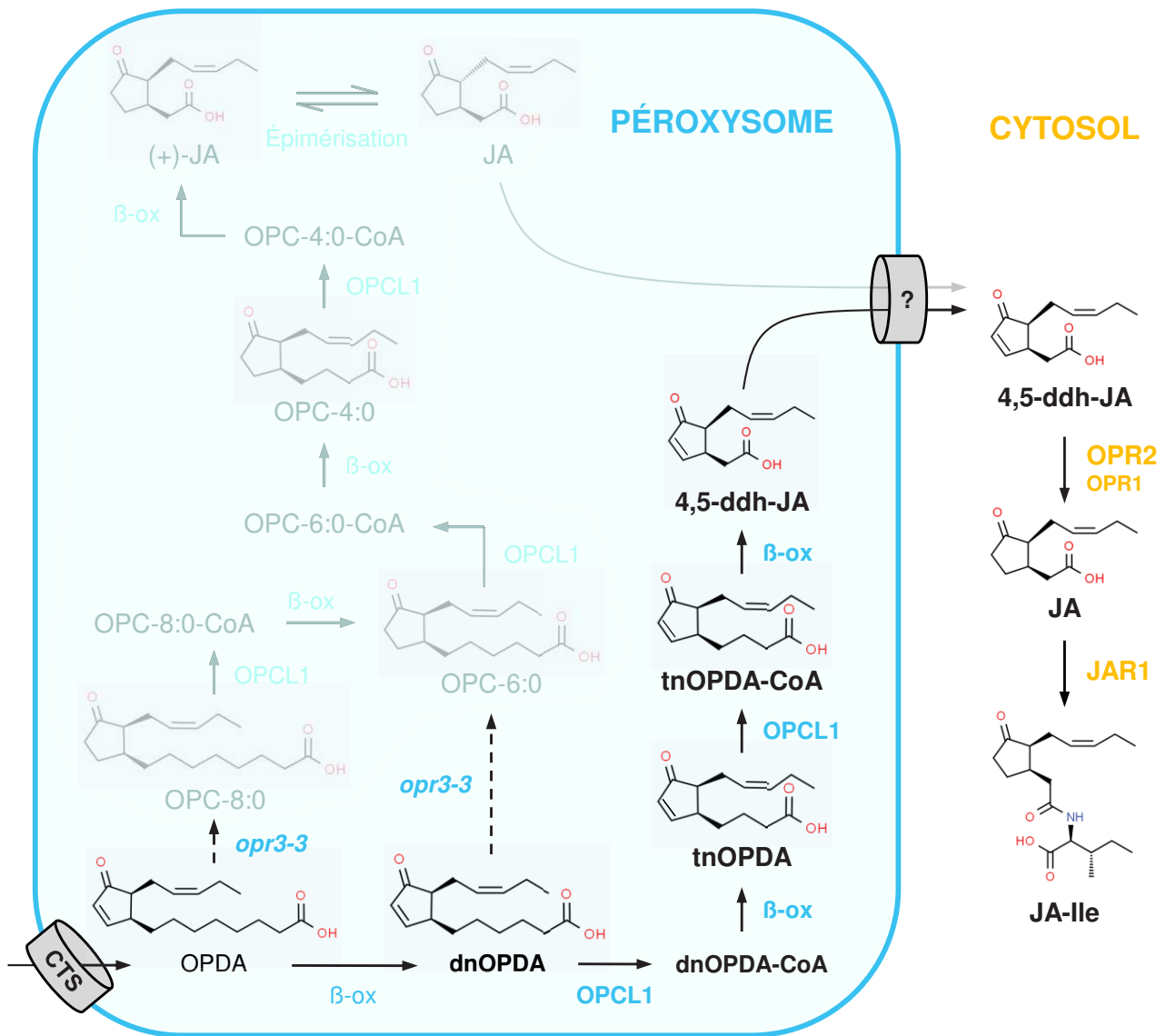


Figure 1.7. Voie péroxyssomale parallèle de formation du JA/JA-Ile.

Chez le mutant *opr3-3* qui ne peut plus former dans le péroxyssome d'OPC-8:0 ou d'OPC-6:0 à partir de l'OPDA et du dnOPDA respectivement, le dnOPDA est directement activé par estérification avec un CoA par OPCL1, formant probablement du dnOPDA-CoA (Chini *et al.*, 2018). Ce composé subit ensuite deux cycles de β -oxydation dont le premier forme le tnOPDA qui doit être activé par OPCL1 en tnOPDA-CoA avant de subir le second cycle de β -oxydation. Cette voie parallèle aboutit à la formation du 4,5-ddh-JA (Chini *et al.*, 2018), une molécule à 12 atomes de carbone. Chez ce mutant, Chini *et al.*, 2018 suppose que l'OPDA peut également être activé par OPCL1 avant de subir un premier cycle de β -oxydation formant du dnOPDA. Le 4,5-ddh-JA est exporté dans le cytoplasme où il est réduit en JA par OPR1 et majoritairement OPR2, deux homologues cytosoliques d'OPR3, avant d'être couplé à l'isoleucine par JAR1 pour former le JA-Ile (Chini *et al.*, 2018).

Les flèches en pointillées représentent les réactions absentes chez le mutant *opr3-3*.

4,5-ddh-JA = 4,5-didehydrojasmonate ; (+)-JA = acide (+)-7-iso-jasmonique ; β -ox = β -oxydation ; CoA = Coenzyme A ; CTS = comatose ; dnOPDA = acide dinor-oxo-phytodiénoïque ; JA = acide (-)-jasmonique ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAR1 = jasmonate resistant1 ; OPC-4:0 = l'acide 3-oxo-2-(2'-pentényl)-cyclopentane-1-butyrique ; OPC-6:0 = acide 3-oxo-2-(2'-pentényl)-cyclopentane-1-hexanoïc ; OPC-8:0 = acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentényle)-cyclopentane-1-octanoïque ; OPCL1 = *opc-8:0* coenzyme A ligase1 ; OPDA = acide *cis*-(+)-12-oxo-phytodiénoïque ; OPR1 = 12-oxophytodiénoate réductase 1 ; OPR2 = 12-oxophytodiénoate réductase 2 ; OPR3 = 12-oxophytodiénoate réductase 3 ; tnOPDA = tetranorOPDA.

l'OPC-6:0 avant de subir seulement deux cycles de β -oxydation pour former le (+)-JA (Figure 1.6) (Schaller et Stintzi, 2009; Koo, 2017; Wasternack et Strnad, 2018).

L'analyse du mutant nul *opr3-3* a révélé une voie parallèle de formation du JA/JA-Ile qui s'initie à partir du dnOPDA lors des premières étapes péroxysomale (Figure 1.7) (Chini et al., 2018). Dans cette voie le dnOPDA est directement activé par OPCL1 en dnOPDA-CoA et raccourci par deux cycles de β -oxydation qui forment successivement le tetranorOPDA (**tnOPDA**) et le 4,5-didehydrojasmonate (**4,5-ddh-JA**) (Figure 1.7) (Chini et al., 2018). Les auteurs supposent que l'OPDA quant à lui subit trois cycles de β -oxydation dont le premier le convertit en dnOPDA et le dernier fournit du 4,5-ddh-JA (Figure 1.7). Le 4,5-ddh-JA est exporté vers le cytosol où il est réduit en JA principalement par OPR2, une homologue d'OPR3 avec une localisation cytosolique, avant d'être converti en JA-Ile par JAR1 (Figure 1.7) (Chini et al., 2018). Cette voie parallèle de formation du JA-Ile est minoritaire dans les plantes supérieures et est considérée comme un reliquat de l'évolution.

2.1.6. Rôles biologiques suspectés des OPDAs et des arabidopsides.

De plus en plus d'exemples indiquent que l'OPDA et le dnOPDA ne seraient pas seulement des précurseurs hormonaux mais auraient un rôle biologique. Par exemple l'absence d'OPDA entraîne une létalité des embryons chez la tomate (Goetz et al., 2012). De plus un traitement des plantes à l'OPDA va induire un panel distinct de gènes, en plus de ceux induits par un traitement JA (Taki et al., 2005). La découverte de l'OPDA-isoleucine (**OPDA-Ile**) dont la conjugaison est médiée par JAR1 (Floková et al., 2016), qui est capable d'induire des gènes du panel spécifique du traitement OPDA (Arnold et al., 2016) suppose qu'il est la forme active de l'OPDA. Néanmoins ce composé est très peu abondant (Floková et al., 2016).

L'OPDA, ainsi que le dnOPDA, peuvent également être conjugués aux galactolipides plastidiaux ce qui forme les arabidopsides, une classe de molécule appartenant aux oxylipines. Les galactolipides plastidiaux peuvent être estérifiés avec une à trois molécules d'OPDA et/ou de dnOPDA sur la chaîne carbonée et/ou directement sur le groupement galactose (Mosblech et al., 2009). Sept formes d'arabidopsides sont actuellement connues, appelées arabidopsides A à G dont les rôles ne sont pas encore clairement définis (Stelmach et al., 2001; Hisamatsu et al., 2003, 2005; Andersson et al., 2006; Kourtchenko et al., 2007; Genva et al., 2019). Néanmoins ils sont inductibles par l'infection fongique et permettent de réduire la croissance du pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Kourtchenko et al., 2007). Il est supposé qu'ils aient un rôle de stockage d'OPDA et de dnOPDA. En effet en absence de stimulus environ 85 % de l'OPDA est à l'état estérifié chez *Arabidopsis* (Stelmach et al., 2001) et la lipase *patatin-related phospholipase A 1* (**PLAI**) a été caractérisée comme une acyl hydrolase qui libère

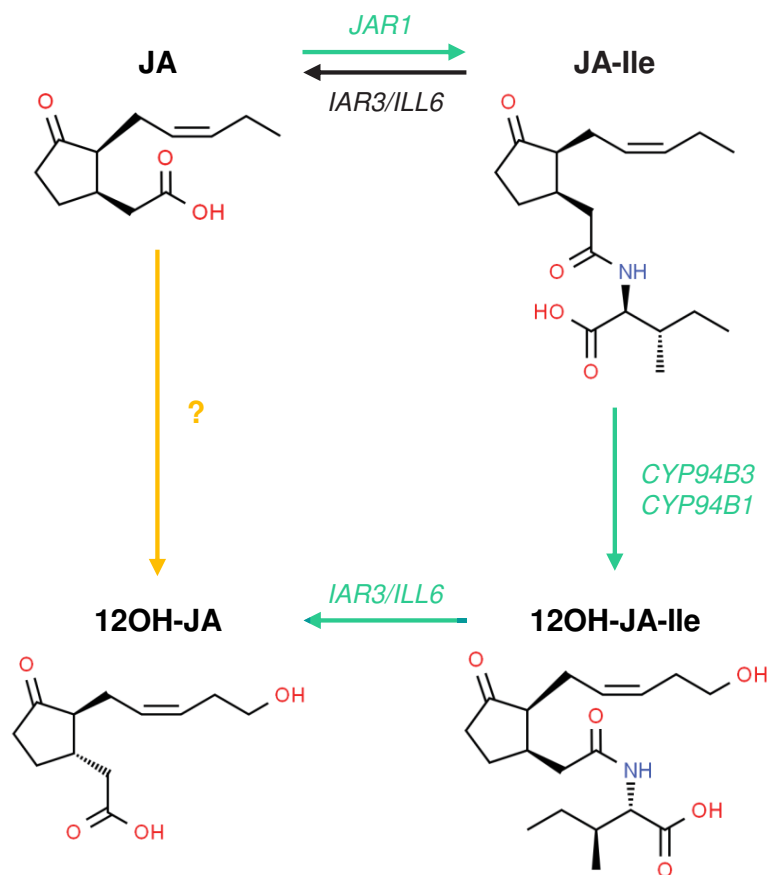


Figure 1.8. La formation du 12-hydroxy-jasmonate.

Les connaissances actuelles supposent que la synthèse du 12OH-JA depuis le précurseur JA est possible par deux voies métaboliques distinctes. La première est bien décrite et est une voie de formation indirecte qui nécessite la métabolisation des dérivés conjugués du JA (flèches bleues). Le JA est conjugué à l'isoleucine par JAR1 formant le JA-Ile (Staswick et Tiryaki, 2004) qui est catabolisé par les enzymes CYP94B1 et B3 donnant du 12OH-JA-Ile (Heitz *et al.*, 2012). Ce dernier composé peut subir une hydrolyse par les amidohydrolases IAR3 et ILL6 ce qui libère du 12OH-JA et de l'isoleucine (Widemann *et al.*, 2013). La seconde voie de formation du 12OH-JA est supposé être une voie par oxydation directe du JA (flèche jaune) mais bien que plusieurs études démontrent que la déficience de la voie indirecte ne supprime pas totalement l'accumulation de l'hydroxy-jasmonate, aucune enzyme n'a encore été caractérisé pour oxyder le JA directement en 12OH-JA (Widemann *et al.*, 2013 ; Aubert *et al.*, 2015).

12OH-JA = 12-hydroxy-jasmonate ; 12OH-JA-Ile = 12-hydroxy-jasmonoyl-L-isoleucine ; CYP94 = cytochrome P450 de la famille 94 ; IAR3 = *IAA-alanine resistant 3* ; ILL6 = *IAA-leucine resistant (ilr)-like gene 6* ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JA = acide (-)-jasmonique ; JAR1 = *jasmonate resistant 1*.

l'OPDA des galactolipides (Yang et al., 2007). De plus l'accumulation de JA après une infection fongique est corrélée avec une réduction de la quantité des arabidopsides (Kourtchenko et al., 2007). La présence abondante d'arabidopsides pourrait permettre une accumulation plus rapide après un stress d'OPDA, de JA et ses dérivés.

2.2. Les dérivés du JA

Le JA-Ile est reconnu comme la forme active majoritaire responsable de la signalisation et de l'induction des réponses. Mais il existe de nombreux autres dérivés du JA, des composés conjugués, méthylés, estérifiés, hydroxylés, décarboxylés, sulfatés ou encore glycosylés qui sont formés dans le cytoplasme dont bien souvent les enzymes impliquées n'ont pas été caractérisées (Wasternack et Hause, 2013). Certains de ces composés ont été identifiés pour avoir une fonction biologique spécifique qui peut être indépendante de la signalisation JA-Ile (Heitz et al., 2016; Wasternack et Song, 2017; Wasternack et Strnad, 2018).

2.2.1. Les dérivés hydroxylés, glycosylé et sulfaté

Le JA peut être converti en un dérivé hydroxylé, appelé le 12-hydroxy-jasmonate (**12OH-JA**) (Miersch et al., 2008), ce composé a été découvert dans les tubercules de *Solanum tuberosum* (pomme de terre) et caractérisé pour avoir un rôle dans la tubérisation ce qui lui a valu le nom d'acide tubéronique (**TA**) (Yoshihara et al., 1989). Sa formation passe par les intermédiaires conjugués dérivant du JA-Ile (Figure 1.8) (Staswick et Tiryaki, 2004; Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013; Wasternack et Strnad, 2016). Une seconde voie de formation du 12OH-JA par une oxydation directe du JA est suspectée, mais une enzyme catalysant cette oxydation n'a pas encore été trouvée (Figure 1.8). Néanmoins lorsqu'une des étapes de la synthèse indirecte du 12OH-JA est inactivée par mutation il est toujours observé une accumulation du composé. Cette accumulation est, par rapport au sauvage, de 50 % après blessure (Widemann et al., 2013) et sans différence après infection fongique (Aubert et al., 2015). Ces résultats soutiennent l'hypothèse de l'existence d'une voie d'oxydation directe du JA en 12OH-JA sans passer par les intermédiaires conjugués. Un second OH-JA existe, l'isomère de position 11OH-JA dont la voie de formation est inconnue (Figure 1.9) (Miersch et al., 2008). Bien que l'isomère 12 soit celui retrouvé majoritairement dans les plantes, dans certains cas le 11OH-JA est la forme dominante comme chez *Cucurbita pepo* ou dans les feuilles d'*Arabidopsis* stimulées (Miersch et al., 2008). La présence dans les plantes d'OH-JA ne produisant pas de tubercules (Miersch et al., 2008) suppose que les OH-JA pourraient avoir un autre rôle biologique que la tubérisation.

L'isomère 12OH-JA est métabolisé en deux dérivés, l'un sulfaté et l'autre glycosylé (Figure 1.9), qui ont longtemps été considérés comme des catabolites du JA avant qu'il ne soit

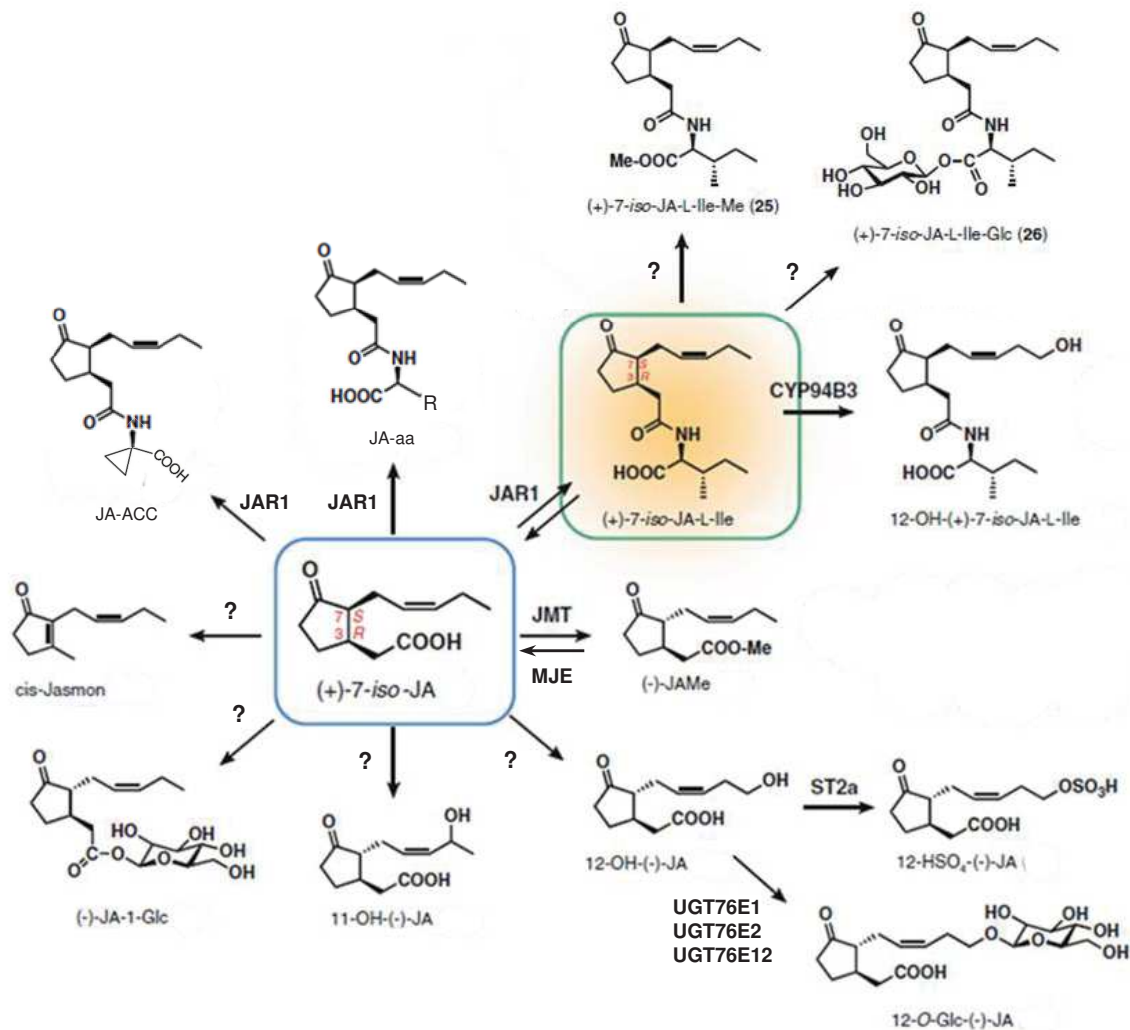


Figure 1.9. Le métabolisme de l'acide jasmonique.

Le JA peut être métabolisé par de nombreuses réactions enzymatiques formant une diversité de dérivés. L'enzyme JAR1 qui permet de former l'hormone bioactive (+)-7-iso-JA_L-Ile forme également d'autres conjugués de JA, le JA-ACC (Staswick et Tiriyaki, 2004) et les différents JA-aa connus (Koo *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2016). Pour certains composés comme le *cis*-jasmon (dérivé décarboxylé), le JA-Glc (dérivé glycosylé), le 11 et le 12OH-JA (deux dérivés hydroxylés) l'enzyme catalysant la métabolisation est inconnue. Le JA peut également être méthylé par la JMT en méthyl-jasmonate qui peut être reconverti en JA par la MJE (Stuhlfelder *et al.*, 2004). Parmi ces dérivés du JA certains présentent leur propres dérivés, par exemple le 12OH-JA peut être métabolisé en 12HSO₄-JA, dérivé sulfaté par l'enzyme ST2a, et en 12-O-Glc-JA, dérivé glycosylé par les enzymes UGT76E1, E2 et E12 (Haroth *et al.*, 2019). Le JA-Ile possède tout comme le JA un dérivé méthylé, le (+)-7-iso-JA_L-Ile-Me, et un dérivé glycosylé, le (+)-7-iso-JA_L-Ile-Glc, dont les enzymes catalysant ces réactions sont inconnues. De plus le JA-Ile présente aussi un dérivé hydroxylé, le 12OH-(+)-7-iso-JA_L-Ile, formé par l'enzyme CYP94B3 et qui est défini comme un catabolite de l'hormone. Adaptée de Kombrink, 2012.

(+)-7-iso-JA = acide jasmonique ; (+)-7-iso-JA_L-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl_L-isoleucine ; (+)-7-iso-JA_L-Ile-Glc = 12-O-β-glucopyranosyl-jasmonoyl_L-isoleucine ; (+)-7-iso-JA_L-Ile-Me = méthyl-jasmonoyl_L-isoleucine ; 11OH-JA = 11-hydroxy-jasmonate ; 12-O-Glc-JA = acide 12-O-glucospyranosyl-jasmonique ; 12-OH-(+)-7-iso-JA-L-Ile = 12-hydroxy-jasmonoyl_L-isoleucine ; 12HSO₄-JA = acide 12-hydroxyjasmonic sulfate ; 12OH-JA = 11-hydroxy-jasmonate ; CYP94 = cytochrome P450 de la famille 94 ; JA-aa = acide jasmonique-acides aminés ; JA-ACC = acide jasmonoyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylique JA-Glc = acide jasmonique glucopyranosyl ester ; JAMe = méthyl-jasmonate ; JMT = *jasmonic acid carboxyl methyltransferase* ; MJE = méthyl-jasmonate estérase ; ST2a = sulfotransférase 2a ; UGT76 = *UDP-dependent glycosyltransferase* de la famille 76.

découvert en 2007 que le JA-Ile soit l'hormone active majeure (Thines et al., 2007; Wasternack et Song, 2017). Le dérivé sulfaté du 12OH-JA correspond à l'acide 12-hydroxyjasmonic sulfate (**12-HSO₄-JA**), sa synthèse est effectuée par la sulfotransférase 2a (**ST2a**) (Figure 1.9) (Gidda et al., 2003). Ce composé n'a pas de rôle connu mais il s'accumule dans les feuilles blessées de tomate et d'*Arabidopsis* (Miersch et al., 2008; Widemann et al., 2013). Le dérivé glycosylé est l'acide 12-O-glucospyranosyl-jasmonique (**12-O-Glc-JA**), il est formé par trois *UDP-dependent glycosyltransferase* (**UGT**), UGT76E1, UGT76E2 et UGT76E12 (Figure 1.9) (Haroth et al., 2019). Le 12-O-Glc-JA a été découvert et caractérisé en même temps que le 12OH-JA comme induisant la tubérisation de la pomme de terre (Yoshihara et al., 1989) et il permet d'induire la nyctinastie, notamment chez l'arbre à pluie (*Samanea saman*) (Nakamura et al., 2011).

2.2.2. Le dérivé méthylé

La méthylation du JA est catalysée par la *jasmonic acid carboxyl methyltransferase* (**JMT**) (Seo et al., 2001) et forme le méthyl-jasmonate (MeJA) (Figure 1.9). Le MeJA a initialement été décrit comme un *volatil organic compound* (**VOC**) constituant le bouquet odorifère du jasmin pour l'attraction des pollinisateurs (Demole et al., 1962). Ce VOC intervient également dans la communication inter-plantes et permet d'induire des réponses de défenses en anticipation (Farmer et Ryan, 1990). Le MeJA est inactif pour induire des réponses de la signalisation hormonale JA-Ile (Yan et al., 2009; Sheard et al., 2010) mais il peut être déméthylé par la méthyl-jasmonate estérase (**MJE**) (Figure 1.9) (Stuhlfelder et al., 2004). Le MeJA perçu à l'état de VOC par les plantes est métabolisé par la MJE en JA et s'en suit sa conversion en JA-Ile activant des réponses biologiques en anticipation (Tamogami et al., 2008).

2.2.3. Le dérivé décarboxylé

Le *cis*-jasmonone (**CJ**) est un dérivé décarboxylé du JA dont deux voies de formations ont été proposées. La première est par une décarboxylation directe du JA (Koch et al., 1997) dont l'enzyme catalysant cette réaction n'a pas encore été identifiée (Figure 1.9). La seconde voie commencerait par le *cis*-OPDA, qui serait converti en *iso*-OPDA dans le chloroplaste, par une isomérase inconnue avant d'être métabolisé en 3,7-didehydroJA qui serait convertit en CJ par réaction spontanée (Dabrowska et Boland, 2007). Le CJ est un composant du bouquet floral de nombreuses plantes (Koch et al., 1997; Dabrowska et Boland, 2007). Il intervient surtout dans les interactions plantes-insectes, pour l'attraction des pollinisateurs (Etl et al., 2016) ou de prédateurs et de parasitoïdes afin de réduire la pression d'herbivorie (Birkett et al., 2000; Bruce et al., 2008). La perception du CJ par les plantes induit un panel de gènes différent de

ceux induits par le JA (Matthes et al., 2010) et correspondent, chez le maïs et la pomme de terre, à la synthèse de VOCs (Oluwafemi et al., 2013; Sobhy et al., 2017). Contrairement au MeJA, le CJ a un effet direct sur la plante sans être reconverti en JA et il existe probablement des systèmes permettant sa perception chez certains insectes.

2.2.4. Les dérivés conjugués

Il existe de nombreuses formes conjuguées du JA, avec différents couplages au groupement COOH de JA, par exemple avec un glucose sous forme d'acide jasmonique glucopyranosyl ester (**JA-Glc**) (Figure 1.9) (Miersch et al., 1987). La glucosyle transférase n'a pas été identifiée et très peu de choses sont connues sur l'activité biologique de ce composé.

Le JA peut aussi être conjugué à l'ACC ce qui forme l'acide jasmonoyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylique (**JA-ACC**) (Figure 1.9) (Staswick et Tiryaki, 2004). La formation de ce composé est catalysée par JAR1 *in vitro*, mais l'absence de cette enzyme *in vivo* résulte en des quantités plus importantes de JA-ACC (Staswick et Tiryaki, 2004). Cela montre qu'au moins une autre enzyme permet la conjugaison du JA et de l'ACC (Van de Poel et Van Der Straeten, 2014) et qu'il y a un effet de compensation. L'ACC est le précurseur de l'ET or l'ET et les JAs agissent de concert dans l'induction de réponses permettant la résistance aux nécrotrophes ou l'inhibition de la croissance racinaire (Van de Poel et Van Der Straeten, 2014). Il est supposé que la synthèse du JA-ACC serait un des modulateurs principaux du *crosstalk* entre ces deux hormones (Van de Poel et Van Der Straeten, 2014) par un mécanisme de co-régulation de la disponibilité des précurseurs JA et ACC pour la synthèse des hormones actives JA-Ile et ET respectivement (Staswick et Tiryaki, 2004).

Enfin le JA peut être conjugué avec plusieurs acides aminés (**aa**) ce qui forme par exemple le jasmonoyl-alanine (**JA-Ala**), le jasmonoyl-leucine (**JA-Leu**), le jasmonoyl-phénylalanine (**JA-Phe**), le jasmonoyl-valine (**JA-Val**), le jasmonoyl-thréonine (**JA-Thr**) et le jasmonoyl-glutamine (**JA-Gln**) qui s'accumulent tout comme le JA-Ile dans les feuilles blessées d'*Arabidopsis* (Koo et al., 2009). L'accumulation de ces conjugués est réduite mais non abolie chez *jar1*, ce qui indique que JAR1 réalise la conjugaison du JA avec ces différents aa (Figure 1.9) et, comme pour le JA-ACC, une autre enzyme de conjugaison existe (Staswick et Tiryaki, 2004). Une analyse sophistiquée basée sur la synthèse chimique d'un analogue structural du JA, l'acide coronafacic (**CFA**), couplé à chacun des 20 aa a montré que JA-Leu, JA-Val, JA-Ala et le jasmonoyl-méthionine (**JA-Met**) sont bioactifs (Yan et al., 2016). Un traitement sur *Arabidopsis* avec ces CFA-aa induit entre autres l'inhibition de la croissance racinaire, le développement des étamines et l'expression de gènes induits par JA (Kitaoka et al., 2014; Yan et al., 2016). Le fait que JA-Ile soit la forme active majoritaire et le conjugué JA-aa le plus accumulé dans

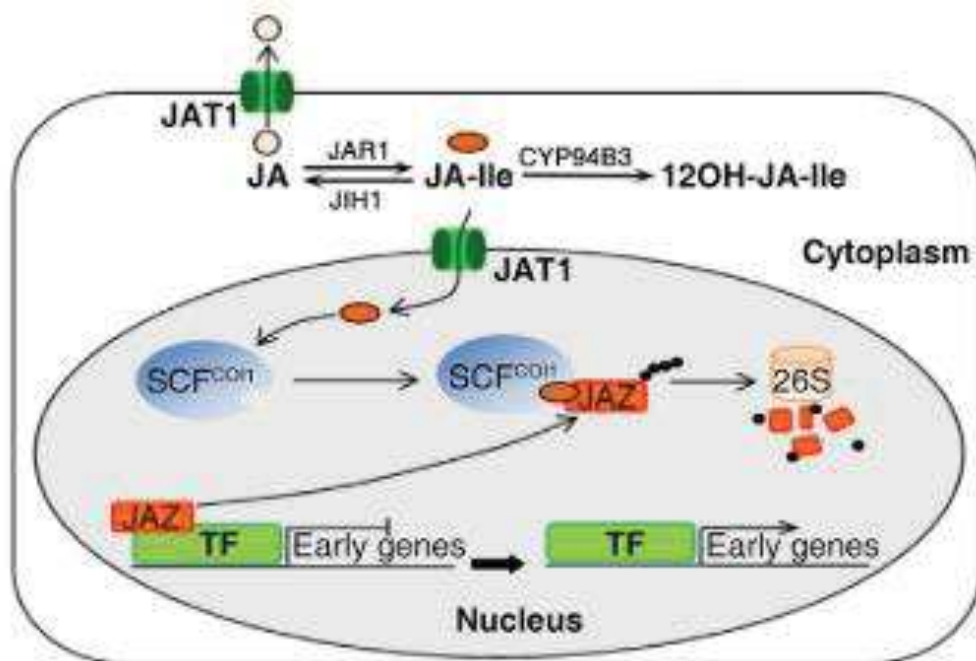


Figure 1.10. Le transport du JA-Ile dans le noyau et la dérèpression JA-Ile dépendante.

Le JA cytoplasmique peut être excrété dans l'apoplasme par le transporteur JAT1 pour être transporté à longue distance. La part de JA convertie en JA-Ile par l'enzyme JAR1 peut, dans le cytoplasme, être déconjugué en JA par IAR3/JIH1 (Woldemarian *et al.*, 2012), catabolisé en 12OH-JA-Ile par CYP94B3 ou importé dans le noyau par JAT1. Dans le noyau le JA-Ile sert de ligand entre les répresseurs JAZ et la F-box COI1 associé au complexe SCF^{COI1} pour entraîner la poly-ubiquitination et la dégradation des JAZ par le protéasome 26S. Les facteurs de transcription libéré de l'effet répresseur des JAZ recrutent le complexe médiateur et la polymérase pour initier la transcription des gènes de réponses à la signalisation au JA-Ile.

Tirée de Li *et al.*, 2017

12OH-JA-Ile = 12-hydroxy-jasmonoyl-L-isoleucine ; 26S = protéasome 26S ; CYP94 = cytochrome P450 de la famille 94 ; IAR3 = *IAA-alanine resistant 3* ; JA = acide jasmonique ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAR1 = *jasmonate resistant 1* ; JAT1 = *JA transporter 1* ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; JIH1 = *Jasmonoyl-L-Isoleucine Hydrolase 1* ; SCF^{COI1} = *Skp, Cullin, F-box containing complex Coronatine-insensitive 1* ; TF = facteur de transcription.

les plantules après blessure (Staswick et Tiryaki, 2004; Yan et al., 2016) est dû au fait que JAR1 a une plus grande spécificité de substrat pour l'Ile que pour les autres aa (Suza et Staswick, 2008). De plus les conjugués JA-Leu, JA-Val, JA-Ala et JA-Met sont moins efficaces pour former le corécepteur permettant la signalisation hormonale des réponses JAs dépendantes (Thines et al., 2007; Chini et al., 2007).

Le transporteur ABC *JA TRANSPORTER1* (**JAT1**) a une localisation dans la membrane plasmique et permet l'export du JA dans l'apoplasme, supposé pour la dispersion intercellulaire pour la réponse systémique (Figure 1.10) (Li et al., 2017; Koo, 2017). Mais le rôle principal de JAT1 est dû à sa localisation dans l'enveloppe nucléaire (Figure 1.10), il transporte le JA-Ile dans le noyau ce qui permet l'assemblage du corécepteur induisant la signalisation JAs (Li et al., 2017).

2.3. La signalisation

Comme pour toutes les PhyH, la signalisation JA-Ile induit l'expression et la répression de gènes permettant, entre autres, la synthèse d'enzymes, de protéines et autres métabolites en réponse au stimulus ayant déclenché la synthèse hormonale. Le modèle dominant de signalisation est commun à toutes les PhyH (Larrieu et Vernoux, 2015). En absence de stimuli, stress ou développementaux, la signalisation est réprimée par une famille de répresseurs transcriptionnels spécifique à chaque type d'hormone. Lors de la perception d'un stimulus entraînant la synthèse d'une PhyH, celle-ci induit la levée de la répression par l'élimination des répresseurs ce qui permet l'expression des gènes en réponse au stimulus perçu. La signalisation fonctionne donc par dérèpression.

2.3.1. La dérèpression JA-Ile dépendante

Dans le noyau la dérèpression est médiée par l'assemblage d'un corécepteur tripartite constitué d'un répresseur nucléaire, d'une protéine F-box et du JA-Ile. L'hormone sert de ligand pour promouvoir l'assemblage de la protéine F-box avec les répresseurs nucléaires (Thines et al., 2007; Chini et al., 2007) ce qui cause leur dégradation, libère les facteurs de transcription (**FT**) dont il bloque l'action et permet la transcription des gènes cibles (Figure 1.10) (Nagels Durand et al., 2016). Les répresseurs principaux de la voie jasmonates sont les protéines *JASMONATE-ZIM DOMAIN* (**JAZ**) (Figure 1.10), une famille constituée de treize membres chez *Arabidopsis* (Chini et al., 2016) et la protéine à F-box de la signalisation JAs est *Coronatine-insensitive 1* (**COI1**) (Figure 1.10) (Xie et al., 1998; Wasternack et Song, 2017).

COI1 tient son nom d'un mutant isolé à partir d'un crible d'insensibilité à la coronatine (**COR**) (Feys et al., 1994). COR est une phytotoxine produite par certaines souches de bactéries

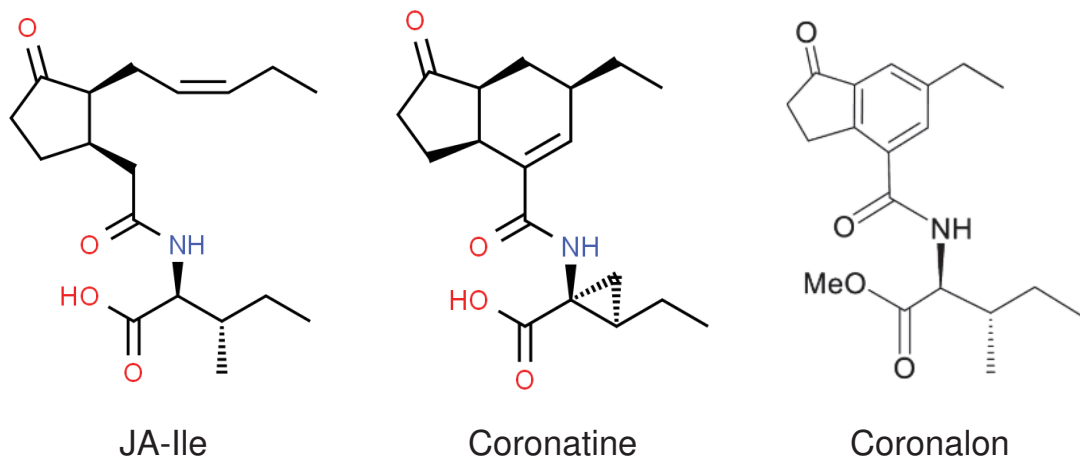


Figure 1.11. Analogie structurale du JA-Ile, de la coronatine et du coronalon.

La coronatine est un métabolite synthétisé par des bactéries induisant la dérégulation des réponses JA-Ile dépendantes (Geng *et al.*, 2014). Le coronalon est un dérivé de la coronatine qui est synthétisé en laboratoire, aussi nommé 6-éthyl indanoyl isoleucine. Adaptée de Scholz *et al.*, 2015.

JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine.

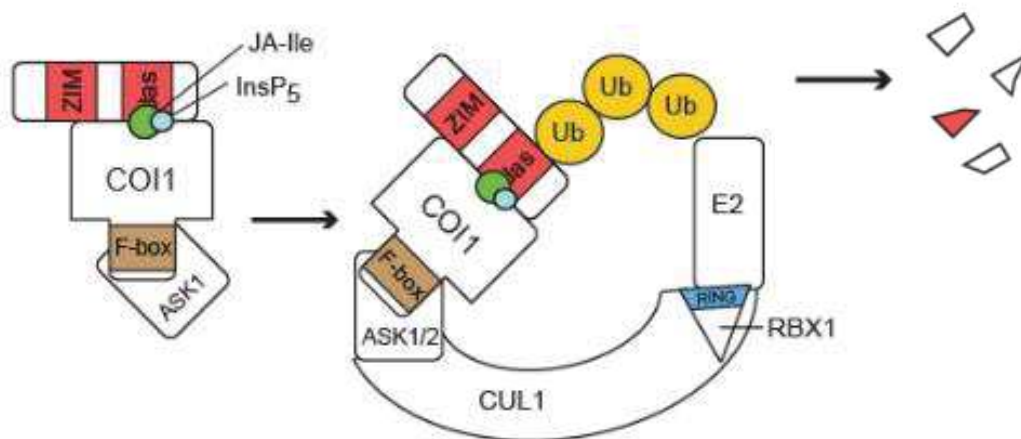


Figure 1.12. Le complexe SCF^{COI1}.

La protéine F-box COI1 est instable et est stabilisée par son interaction avec ASK1 ou ASK2 (Dai *et al.*, 2002; Devoto *et al.*, 2002). Le cofacteur InsP₅ permet également de stabiliser la conformation de COI1 qui peut se lier au domaine Jas des JAZ grâce à l'action ligand du JA-Ile. ASK1/2 associe COI1 au reste du complexe SCF par liaison avec CUL1 elle-même associée à l'enzyme E2 via le domaine ring de RBX1 (Xu *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2005). COI1 sert d'adaptateur entre le complexe SCF E3 ubiquitine ligase et les répresseurs JAZ pour permettre leur polyubiquitination par E2 ce qui entraîne leur dégradation par le protéasome 26S. Tirée de Nagels Durand *et al.*, 2016.

ASK1/2 = *arabidopsis skp1 homolog 1/2* ; COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; CUL1 = *cullin 1* ; InsP₅ = inositol pentakisphosphate ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; RBX1 = *ring box protein 1* ; SCF = *Skp, Cullin, F-box containing complex* ; Ub = ubiquitine ; ZIM = *Zinc finger protein expressed in Inflorescence Meristem* .

hémi-biotrophes et qui induit les réponses JAs-dépendantes sous forme de leurre, ce qui affaiblit les défenses SA dépendantes qui sont efficaces contre les biotrophes (Geng et al., 2014). Il a été déterminé que COR est un analogue structural du (+)-7-iso-JA-Ile (Figure 1.11) et qu'elle agit comme ligand dans la formation du corécepteur COI1-JAZ (Katsir et al., 2008; Fonseca et al., 2009; Sheard et al., 2010). C'est cette propriété qui a permis d'utiliser la COR pour la recherche du récepteur des JAs bien avant la découverte du rôle du JA-Ile et donc d'isoler le mutant *coi1*. *coi1* est incapable d'induire les réponses JAs en présence de COR ou de JA exogène. Par exemple, il maintient une croissance racinaire sauvage, présente une stérilité mâle (Feys et al., 1994) et est plus sensible aux herbivores et aux nécrotrophes (Xie et al., 1998). COI1 est nécessaire pour l'expression de 80 % des gènes régulés par les JAs, confirmant son rôle majeur dans la signalisation (Devoto et al., 2005).

C'est en 2007 que trois équipes ont démontré l'assemblage tripartite du corécepteur COI1-JA-Ile-JAZ permettant la signalisation JAs (Thines et al., 2007; Chini et al., 2007; Yan et al., 2007). Ces publications majeures ont établi de façon complémentaire un nouveau paradigme dans la compréhension des réponses JAs. Les protéines JAZ ont une similarité de domaines avec des FT sans domaine de liaison à l'ADN (Chini et al., 2007) et les JAZ1, 3, 6 et 10 ont une localisation nucléaire (Thines et al., 2007; Chini et al., 2007; Yan et al., 2007), probablement partagée par les 9 autres JAZ, en accord avec une possible fonction de régulateur transcriptionnel. L'analyse de racines de la lignée rapportrice p35S:JAZ1-GUS a montré qu'un traitement JA fait disparaître le marquage GUS, indiquant une dégradation de JAZ1-GUS, qui est bloquée par un traitement simultané avec un inhibiteur du protéasome 26S (Thines et al., 2007). Des résultats similaires ont été obtenus pour JAZ3-GFP (Chini et al., 2016) et presque tous les JAZ peuvent se lier avec MYC2 (Chini et al., 2009), un FT avec une expression constitutive régulateur majeur des réponses JA-Ile-dépendantes, lui-même réprimé par les JAZ (Lorenzo et al., 2004; Chini et al., 2009; Kazan et Manners, 2013). L'ensemble de ces données démontre donc que le JA-Ile induit la dégradation des répresseurs JAZ de façon protéasome dépendante, libérant ainsi les FT et permettant l'expression des gènes en réponse au JA-Ile (Figure 1.10).

COI1 est un récepteur soluble instable qui possède la séquence consensus des F-box (Xie et al., 1998) et assure la fonction d'E3 ubiquitine ligase dans le complexe *Skp, Cullin, F-box containing complex* COI1 (**SCF^{COI1}**) (Figure 1.12) (Nagels Durand et al., 2016). Il a été démontré que COI1 interagit avec les composants centraux du complexe SCF^{COI1} (Dai et al., 2002; Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002; Ren et al., 2005) ce qui permet la poly-ubiquitination des répresseurs cibles (Figure 1.12), tels les JAZ, entraînant leur dégradation par le protéasome 26S (Wasternack et Hause, 2013; Nagels Durand et al., 2016). La liaison au complexe SCF permet de stabiliser la F-box COI1 (Yan et al., 2013). COI1 se constitue

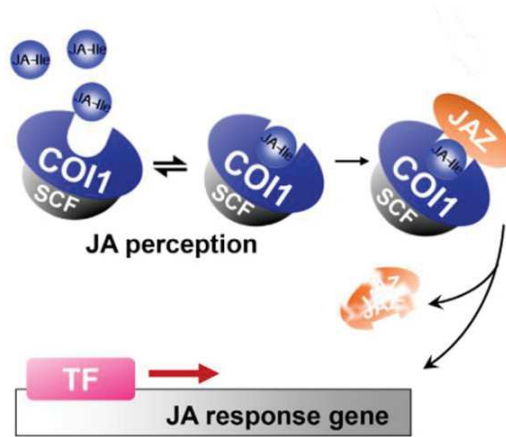


Figure 1.13. Association du complexe tripartite.

Suite à la perception d'un stimulus, le JA-Ile s'accumule rapidement et est perçu par la protéine F-box COI1 liée au complexe SCF^{COI1}. La perception du JA-Ile cause un changement de conformation de COI1 qui va ensuite pouvoir interagir avec le dégron des répresseurs JAZ pour permettre leur dégradation, libérer les facteurs de transcriptions cibles et activer l'expression des gènes de réponses aux jasmonates.

Tirée de Yan *et al.*, 2018b.

COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; JA = acide jasmonique ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; SCF = *Skp, Cullin, F-box containing complex Coronatine-insensitive 1* ; TF = facteur de transcription.

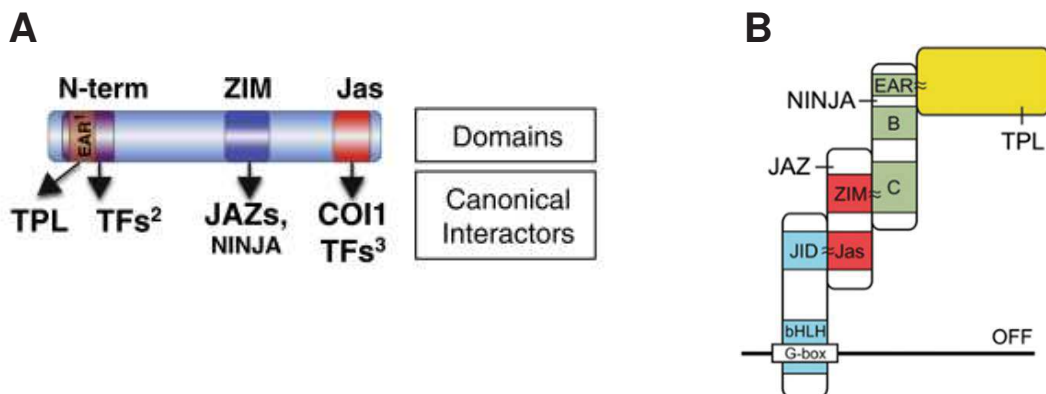


Figure 1.14. Les domaines d'interactions des JAZ.

A, Les répresseurs JAZ possèdent plusieurs domaines avec des fonctions distinctes. Le domaine Jas qui correspond au dégron permet la liaison au facteur de transcription cibles et à COI1, le domaine ZIM est impliqué dans la dimérisation des JAZ et le recrutement de l'adaptateur NINJA. En N-term certain JAZ tel JAZ5, 6, 7, 8 et 13 disposent d'un domaine EAR permettant de recruter le répresseur TPL sans avoir recourt à l'adaptateur NINJA (Kagale *et al.*, 2010 ; Shyu *et al.*, 2012 ; Thireault *et al.*, 2015).

Tirée de Chini *et al.*, 2016.

B, Le FT MYC2, en bleu, se lie par son domaine bHLH sur ses promoteurs cibles via leur motif G-box. Le domaine JID permet la liaison au domaine Jas des JAZ ce qui réprime par compétition l'interaction MYC2-MED25. Les JAZ de part leur domaine ZIM recrutent l'adaptateur NINJA qui dispose d'un domaine EAR permettant la liaison du répresseur général TPL permettant un deuxième niveau de répression.

Tirée de Pauwels et Goossens, 2011.

COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; EAR = *ethylene responsive factor-associated amphiphilic repression* ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; MED25 = *MEDIATOR25* ; JID = *JAZ-interaction domain* ; N-term = région N-terminale ; NINJA = *novel interactor of JAZ* ; TAD = *trans-activation domain* ; TF = facteurs de transcriptions ; TPL = *topless* ; ZIM = *Zinc finger protein expressed in Inflorescence Meristem*.

également d'un domaine solénoïde de liaison qui définit une poche de surface d'interaction dans laquelle va pouvoir se fixer le ligand JA-Ile (Yan et al., 2009). La perception avec une forte affinité de JA-Ile ou COR par COI1 est permise par l'inositol pentakisphosphate (**InsP₅**) qui est un cofacteur essentiel de la F-box permettant de stabiliser sa conformation (Figure 1.12) (Sheard et al., 2010; Cui et al., 2018). Des analyses cristallographiques du complexe COI1-JA-Ile-JAZ ont démontré que le (+)-7-iso-JA-Ile et la COR sont, de tous les ligands potentiels, ceux qui ont la stéréochimie optimale pour se lier de façon stable au dégron des JAZ et à la poche d'interaction de COI1 (Yan et al., 2009; Sheard et al., 2010).

Le corécepteur voit s'effectuer en premier la liaison de COI1 à JA-Ile (Figure 1.13) (Yan et al., 2009, 2018b) ce qui induit un switch structural de COI1 créant une nouvelle surface d'interaction qui permettra le recrutement et la liaison avec le dégron des répresseurs JAZ (Figure 1.13) (Melotto et al., 2008; Yan et al., 2009, 2018b). La liaison de COI1-JA-Ile aux JAZ cause un changement conformationnel du dégron ce qui affaiblit l'interaction JAZ-FT permettant leur dissociation et la dérégulation de la transcription (Zhang et al., 2015). Ce système de dérégulation de FT par dégradation de répresseurs via un complexe SCF est conservé dans les plantes et est un mécanisme qui est retrouvé pour la dégradation d'autres PhyH tel que l'IAA, les GA et les SL (Larrieu et Vernoux, 2015).

2.3.2. Les systèmes de répressions

2.3.2.1. Les répresseurs

Les JAZ sont les répresseurs majoritaires de la voie JAs et ils agissent sur un grand nombre de facteurs de transcriptions différents ce qui permet une régulation de plusieurs processus biologiques sous le contrôle des JAs (Chini et al., 2016). Néanmoins une compréhension détaillée des fonctions physiologiques des treize JAZ est incertaine dû à la redondance génétique entre les JAZ. Ils ont une localisation nucléaire et ils disposent de deux domaines conservés impliqués dans les interactions protéiques (Chini et al., 2016). Le premier est le domaine Jas qui représente le dégron des JAZ et permet la liaison à COI1-JA-Ile et aux FT cibles (Figure 1.14A) (Melotto et al., 2008; Chini et al., 2016). Pour MYC2, un FT de la famille des *basic helix-loop-helix* (**bHLH**), le domaine conservé *JAZ-interaction domain* (**JID**) permet l'interaction avec le domaine Jas des JAZ (Figure 1.14B). L'interaction JAZ-MYC2 bloque l'interaction du domaine *trans-activation domain* (**TAD**) de MYC2 avec MEDIATOR25 (**MED25**) un composant du complexe médiateur permettant d'activer la transcription des gènes par recrutement de la polymérase II (Chen et al., 2012). Les JAZ entrent donc en compétition avec le complexe médiateur et répriment la transcription par inhibition de l'interaction des FT avec MED25 ce qui définit un premier mécanisme de répression (Zhang et al., 2015; Goossens

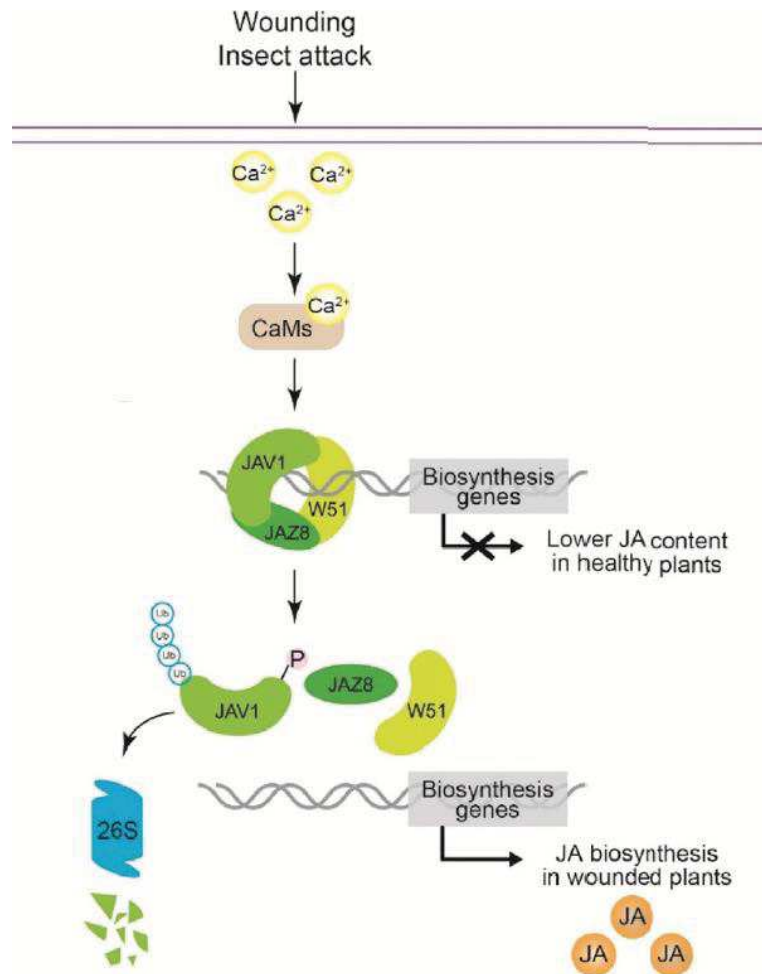


Figure 1.15. La répression médié par JAV1 et l'activation de la transcription des gènes de biosynthèse des jasmonates par les flux de calcium.

JAV1 forme un complexe répresseur avec JAZ8 et WRKY51 nommé JJW. JJW se lie aux promoteurs des gènes de biosynthèse des JAs qu'il réprime pour maintenir à un niveau basal l'accumulation des JAs. JAV1 et WRKY51 interagissent directement avec les promoteurs cibles et conduisent le répresseur transcriptionnel JAZ8 sur le FT cible. La perception d'éliciteurs issus des herbivores entraîne un flux de calcium perçu par les CaMs qui vont pouvoir interagir avec JAV1 (Yan *et al.*, 2018a). Cette interaction phosphoryle JAV1 ce qui cause la dissociation du complexe JJW (Yan *et al.*, 2018a). JAV1 dissocié et phosphorylé est accessible pour la polyubiquitination par JUL1 et sa dégradation par le protéasome 26. Le complexe JJW dissocié ne réprime plus les gènes de biosynthèse des JAs qui pourront être transcrits (Yan *et al.*, 2018a).

Tirée de Yan *et al.*, 2018a.

26S = protéasome 26S ; Ca^{2+} = calcium ; CaMs = calmoduline ; JA = acide jasmonique ; JAV1 = *jasmonate-associated VQ motif gene 1* ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; JJW = JAV1-JAZ8-WRKY51 ; JUL1 = *JAV1-associated ubiquitin ligase1* ; P = phosphate ; Ub = ubiquitine ; W51 = WRKY51.

et al., 2017). MED25 est toutefois capable de se lier faiblement à un autre domaine de MYC2 lorsque celui-ci interagit déjà avec un JAZ, comme MED25 se lie également à COI1 cela permet d'amener la F-box là où se situent les JAZ favorisant ainsi la formation du corécepteur tripartite lors d'une synthèse de JA-Ile (An et al., 2017). Certains JAZ possèdent un domaine Jas divergent, tel JAZ7, 8 et 13, ce qui ne permet pas la liaison à COI1 et bloque leur dégradation induite par COI1-JA-Ile, permettant une répression stable des FT cibles (Chini et al., 2016).

Le second domaine conservé d'interaction protéique des JAZ est le domaine *Zinc finger protein expressed in Inflorescence Meristem* (**ZIM**) (Figure 1.14A) (Nishii et al., 2000; Chung et Howe, 2009) qui est impliqué dans l'homo- et l'hétéro-dimérisation des répresseurs, supposée jouer un rôle de régulation des réponses selon les interactions entre JAZ formées (Chini et al., 2009; Chung et Howe, 2009). Mais surtout le domaine ZIM permet le recrutement de l'adaptateur spécifique *NOVEL INTERACTOR OF JAZ* (**NINJA**) (Figure 1.14B) qui recrute via le motif *ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR-associated amphiphilic repression* (**EAR**) le corépresseur général *TOPLESS* (**TPL**) ou *TPL-Related* (**TPR**) ce qui définit un second mécanisme de répression (Figure 1.14B) (Pauwels et al., 2010; Chini et al., 2016). TPL est un régulateur négatif d'un grand nombre de FT mais la façon dont il restreint l'expression des gènes n'est pas encore élucidée, la participation d'histones déacétylases et déméthylases a été proposée (Pauwels et Goossens, 2011).

Récemment il a été caractérisé *jasmonate-associated VQ motif gene 1* (**JAV1**) qui comme les JAZ a une fonction de répresseur de la signalisation JAs (Figure 1.15) (Hu et al., 2013a). JAV1 montre, tout comme les JAZ, une localisation dans le noyau, est induit par un traitement JA et est dégradé de façon JAs, COI1 et protéasome dépendante (Hu et al., 2013a; Ali et al., 2019). Cependant JAV1 montre une spécificité de répression pour les réponses défensives régulées par les JAs là où les JAZ répriment également les réponses développementales. En effet, le mutant *jav1* est plus sensible à l'infection par *Botrytis* mais ne montre pas un allongement racinaire plus important par rapport au sauvage, comme ça peut être observé chez certains mutants *jaz* (Pauwels et Goossens, 2011; Hu et al., 2013a). JAV1 ne possède pas les domaines Jas et ZIM, qui sont essentiels pour la répression médiée par les JAZ, signifiant que son mode d'action et de dérèglement sont différents (Zhu et Zhu, 2013). Ce répresseur est reconnu par une E3 ubiquitine ligase qui lui est spécifique appelé *JAV1-ASSOCIATED UBIQUITIN LIGASE1* (**JUL1**) qui appartient à un complexe de type *REALLY INTERESTING NEW GENE* (**RING**) causant la polyubiquitination et la dégradation par protéasome 26S de JAV1 (Ali et al., 2019). Cette dégradation est COI1 dépendante car l'expression de *JUL1* est dérèprimée par les JAs suite à la dégradation des JAZ par le complexe SCF^{COI1} (Zhu et Zhu, 2013; Ali et al., 2019). L'action de répression de JAV1 est due à son interaction avec d'autres

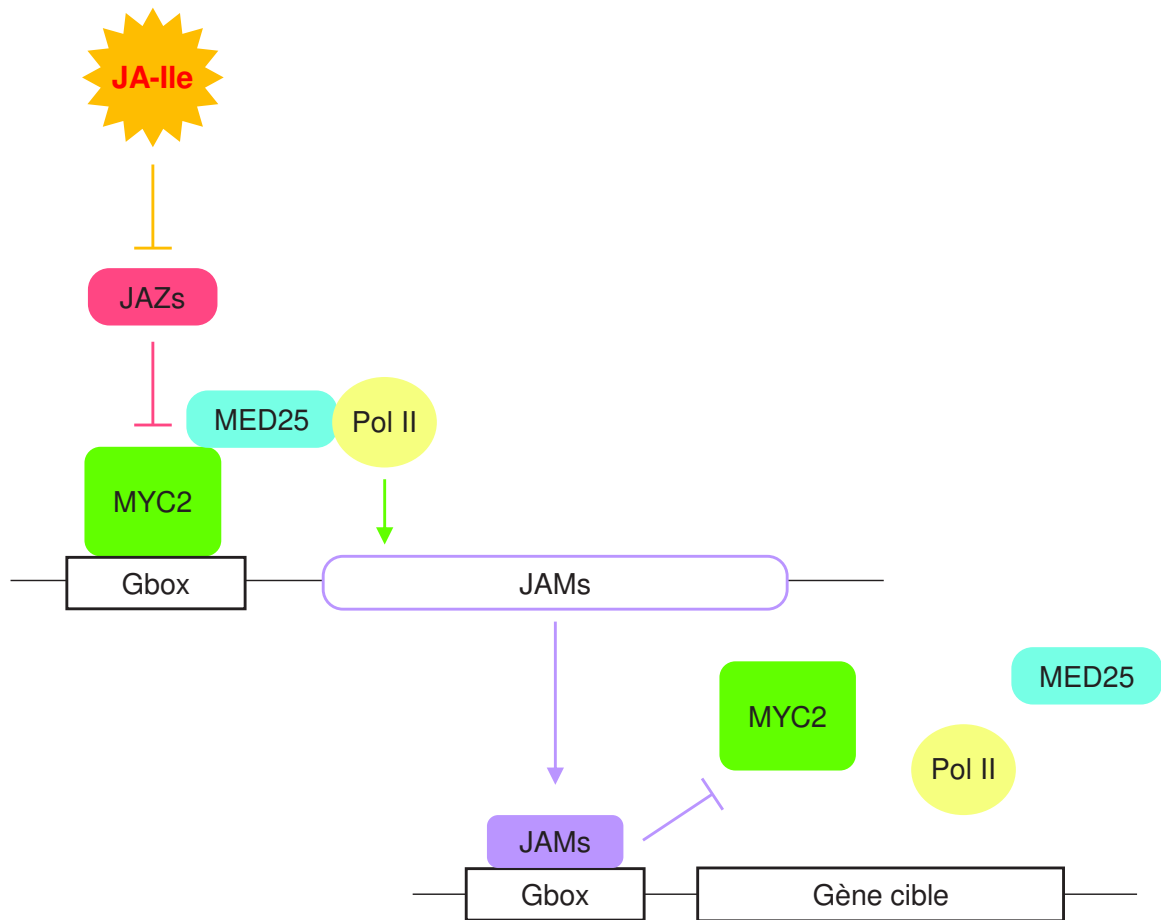


Figure 1.16. La répression médiée par les JAM.

L'expression des JAM est induite suite à la dérégulation de MYC2 par JA-Ile. Ce sont trois facteurs de transcription négatifs de type bHLH017, 013 et 03 pour JAM1, JAM2 et JAM3 respectivement. Ils répriment la transcription des gènes cibles par compétition en se liant sur la séquence G-box à la place des MYC. Les JAM ne permettent pas le recrutement de la polymérase (Fonseca *et al.*, 2014 ; Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2014).

JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAM = *jasmonate-associated myc2-like1* ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; MED25 = MEDIATOR 25 ; Pol II = ARN Polymérase II.

FT. Dernièrement il a été montré que JAV1 peut interagir simultanément avec WRKY51 et JAZ8 ce qui forme le complexe JAV1-JAZ8-WRKY51 (**JJW**) (Figure 1.15) (Yan et al., 2018a). WRKY51 est un FT qui participe à inhiber les réponses de défenses induites par les JAs et augmente la sensibilité à *Botrytis* (Gao et al., 2011). Le complexe JJW joue un rôle dans la répression des gènes responsables de la biosynthèse des JAs (Yan et al., 2018a).

2.3.2.2. Les compétiteurs

En plus des JAZ et de JAV1, une sous-classe de FT a été identifiée récemment qui réprime la transcription des gènes cibles des JAs par un phénomène de compétition (Goossens et al., 2017). Il s'agit de trois bHLH de la sous-classe III_d appelés *JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1* (**JAM1**), JAM2 et JAM3 (Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013). Les JAM ont une localisation nucléaire et ils ont un effet antagoniste de MYC2 sur la signalisation JAs (Sasaki-Sekimoto et al., 2013; Song et al., 2013a). Ils sont capables de se lier aux motifs G-box à la place de MYC2 mais ne permettent pas le recrutement du complexe médiateur et de l'ARN polymérase II (Figure 1.16) (Song et al., 2013a; Fonseca et al., 2014; Goossens et al., 2017). Les JAM sont donc des régulateurs négatifs de la transcription par compétition avec les FT bHLH positifs, et principalement MYC2, sur les gènes de réponses cibles des JAs. Il a été montré que les JAM participent à la répression de la signalisation JAs en réponse à plusieurs stimuli tel la défense contre les nématodes et les insectes, la croissance racinaire ou encore la fertilité mâle (Nakata et Ohme-Takagi, 2013; Song et al., 2013a; Fonseca et al., 2014). L'action répressive des JAM sur la signalisation est régulée à la fois par MYC2 qui active leur transcription et par l'action des JAZ qui les répriment (Fonseca et al., 2014; Sasaki-Sekimoto et al., 2014). En effet l'expression des JAM est induite par les JAs et est dépendante de MYC2 ce qui suppose une rétroaction négative des JAM sur l'activité de MYC2 (Figure 1.16) (Fonseca et al., 2014). De plus à cela JAM1 et JAM2, mais pas JAM3, sont capables d'interagir avec certains JAZ car ils possèdent le domaine JID (Song et al., 2013a; Fonseca et al., 2014; Sasaki-Sekimoto et al., 2014) et il est montré que la liaison de JAZ1 à JAM1 régule négativement son action répressive (Song et al., 2013a). Le mécanisme permettant cet effet n'est pas encore clairement élucidé mais il est supposé que la liaison de JAZ à JAM bloque sa capacité de liaison au motif G-box des promoteurs des gènes cibles (Goossens et al., 2017).

2.4. La transcription

2.4.1. Les cascades de transcription

De très nombreux FT ont été identifiés pour être la cible de la signalisation JAs et des répresseurs JAZ (Figure 1.17) (Pauwels et Goossens, 2011; Chini et al., 2016; Wasternack et



Répresseurs JAZ

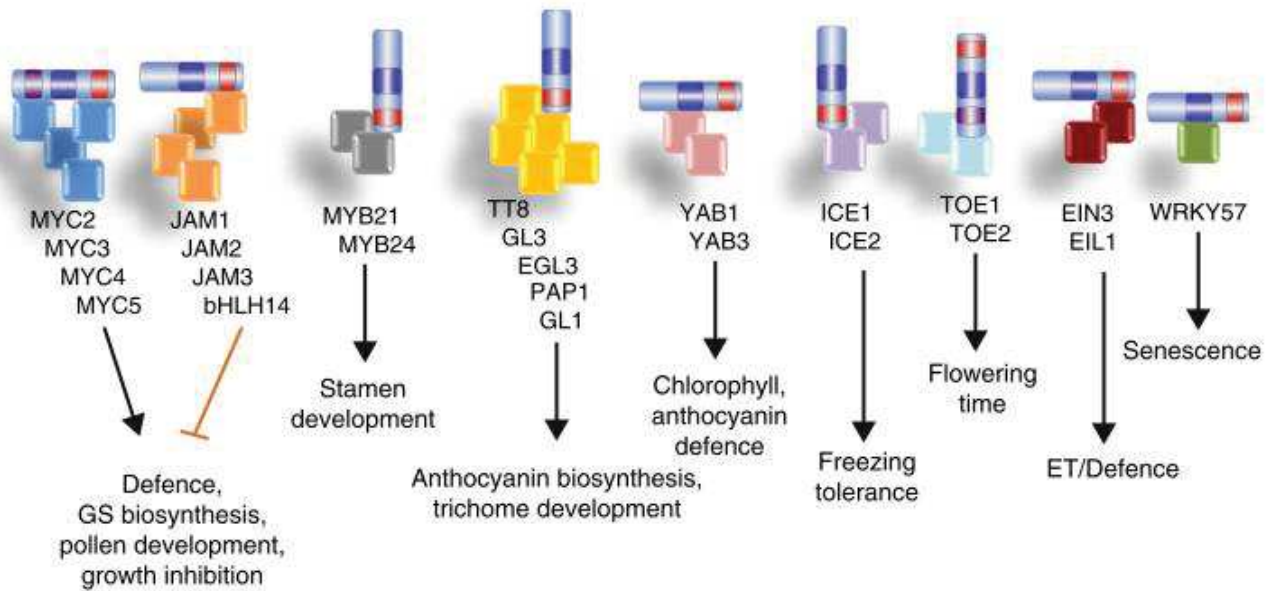


Figure 1.17. Les facteurs de transcription cibles et leurs rôles biologiques réprimés par les répresseurs JAZ.

Adaptée de Chini *et al.*, 2016.

ET = éthylène ; GS = glucosinolates,

Feussner, 2017). Chacun de ces FT a un rôle biologique et une localisation spécifique dans la plante, par exemple MYB21 et MYB24 jouent sur le développement des étamines dans les fleurs (Figure 1.17) (Pauwels et Goossens, 2011). Chaque JAZ a la capacité d'interagir avec un panel spécifique de FT (Pauwels et Goossens, 2011; Chini et al., 2016), ces multiples interactions permettent une grande plasticité de signalisation et contribuent à la spécificité des réponses au JAs dans diverses situations. L'ensemble de ces interactions ne sont pas déréprimées au même moment à la suite de la synthèse de JAs, la dérépression est dépendante du stimulus perçu, de l'organe ainsi que de la fonction du FT considéré et de ses gènes cibles (Wasternack et Hause, 2013). En effet on peut distinguer les gènes de réponses dits précoces, qui sont les premiers induits et qui ont une action immédiate et des gènes dits tardifs dont l'action interviendra après celle des gènes précoces (Windram et al., 2012; Hickman et al., 2017). Les JAs induisent une cascade transcriptionnelle où plusieurs vagues d'induction, ou de répression, ont été caractérisées chez *Arabidopsis*, le tabac et la pervenche (Pauwels et Goossens, 2011). La première vague transcriptionnelle est une vague précoce qui est uniquement inductive des FT primaires de la signalisation JAs, elle ne cause aucune répression de gènes (Pauwels et Goossens, 2011). La dérépression FT primaires, dont MYC2, va permettre d'induire des gènes et des FT dont certains pourront à leur tour induire ou réprimer des gènes de réponses (Hickman et al., 2017). Ceci définit les vagues transcriptionnelles suivantes qui impliquent d'autres familles de FT qui régulent positivement mais aussi négativement l'expression des gènes en fonction du stimulus perçu (Pauwels et Goossens, 2011).

La chronologie des différentes vagues transcriptionnelles a été déterminée suite à un traitement au MeJA d'*Arabidopsis* (Hickman et al., 2017). Lors de la première vague, à la suite de la dérépression de MYC2, sont induits des FT dont MYC2 lui-même ce qui révèle un rétrocontrôle positif de l'action du JA-Ile sur la signalisation et les réponses JAs dépendantes. Les vagues suivantes vont impacter plusieurs familles de FT qui vont à leur tour interférer sur l'expression de leurs gènes cibles qui régulent essentiellement des gènes du métabolisme primaire et des régulateurs de la transcription. Les vagues qui suivent quant à elles touchent, en plus des gènes précédant, ceux qui impactent le métabolisme spécialisé et ceux qui interviennent dans les crosstalk hormonaux entre le JA et d'autres hormones (Hickman et al., 2017). Dans le cas de l'infection par un pathogène nécrotrophe comme *Botrytis cinerea*, la première vague concerne l'induction de gènes impliqués dans le transport des lipides, qui sont supposés avoir un rôle dans la défense bien que ça n'a pas encore été démontré (Windram et al., 2012). Les vagues successives vont permettre l'induction des gènes au stimulus nécrotrophes comme ceux permettant la synthèse d'ET ou de composés antifongiques telle la camalexine. En parallèles

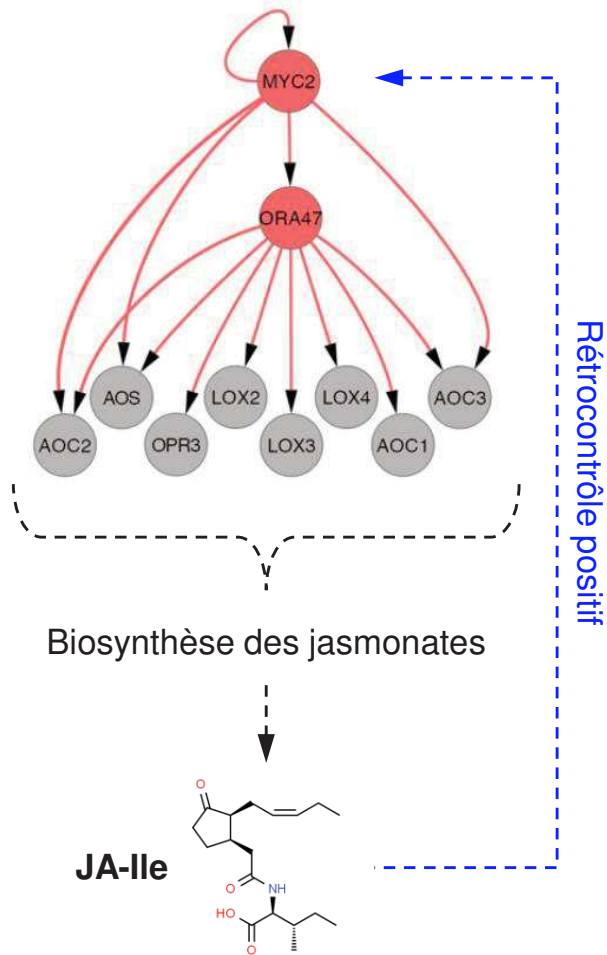


Figure 1.18. L'induction des gènes de biosynthèse des jasmonates par les jasmonates.

La dérépression JA-Ile dépendante de MYC2 active la transcription du FT ORA47 qui est un régulateur positif des gènes LOX, AOS, AOC et OPR3 nécessaires à la biosynthèse des jasmonates. L'induction de la transcription de ces gènes par ORA47 suppose une plus forte biosynthèses des jasmonates résultant en une accumulation plus importante, entre autre, de JA-Ile amplifiant la dérépression par la dégradation des répresseurs. Cette boucle de rétrocontrôle positif des jasmonates sur leur propre biosynthèse reste à démontrer.

Adaptée de Hickman *et al.*, 2017.

AOS = allène oxydes synthases de type 13 ; AOC = allène oxydes cyclase ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; LOX = lipoxygénase ; OPR3 = 12-oxophytodiénoate réductase 3.

sont réprimés des gènes du métabolisme primaire comme ceux qui codent pour la synthèse de chlorophylle ou l'organisation structural des chloroplastes (Windram et al., 2012).

2.4.2. L'induction des gènes de la voie jasmonates et de répression

Hickman *et al.*, 2017 ont démontré que la dérèglement de MYC2 permet, dès la première vague transcriptionnelle, l'induction du FT ORA47 qui régule positivement l'expression de plusieurs gènes de la biosynthèse des JAs : les LOX, AOS, les AOC et OPR3 (Figure 1.18) (Hickman et al., 2017). Il est communément admis que les JAs induisent leur propre synthèse et cette boucle de rétroaction positive est supposée servir à maintenir et à booster les niveaux de JAs afin de favoriser la réponse hormonale (Figure 1.18) (Wasternack, 2015). Néanmoins cette hypothèse est remise en doute par une étude basée sur le coronalon (CRL), un analogue structural de la coronatine (Figure 1.11), plus simple à produire, et permet à faible concentration d'induire les réponses JAs-dépendantes (Schüler et al., 2004). L'étude de Scholz *et al.*, 2015 démontre qu'après un traitement CRL, différents JAs, dont le JA, le JA-Ile et le 12OH-JA, ne sont pas accumulés (Scholz et al., 2015). En revanche, LOX2 et AOS sont induits par CRL, dès 1 h, ce qui corrèle là aussi avec les résultats de transcriptomique de Hickman *et al.*, 2017 (Scholz et al., 2015; Hickman et al., 2017). En définitive l'hypothèse que les JAs induisent une boucle de rétrocontrôle positive sur leur propre synthèse n'est pas clairement confirmée.

Étonnamment, la première vague transcriptionnelle comprend également l'expression des gènes répresseurs de la signalisation, *JAZ* et *JAM1* (Browse, 2009a; Hickman et al., 2017). Ce résultat confirme l'observation de longue date qu'ils sont inductibles par les JAs et où MYC2 est un régulateur positif de l'expression des *JAZ* (Chini et al., 2007), des *JAM* (Sasaki-Sekimoto et al., 2013) et de *JAV1* (Hu et al., 2013a). Cela signifie que les JAs induisent une boucle précoce de rétroaction négative sur la signalisation. On pouvait s'attendre à ce que la néosynthèse des répresseurs apparaisse dans les vagues transcriptionnelles plus tardives afin d'éteindre la signalisation hormonale seulement lorsqu'elle n'est plus nécessaire. Cette boucle de rétroaction négative donne le caractère transitoire (sous forme de pulsation) de la réponse hormonale qui est perdue chez les mutants *jaz* qui présentent une signalisation hormonale constitutive (Browse, 2009b; Campos et al., 2016). Malgré tout, cette rétroaction négative induite lors de la première vague transcriptionnelle ne bloque pas, dans un premier temps, l'activation de la signalisation hormonale permettant des réponses de défenses efficaces (Wasternack et Hause, 2013; Koo, 2017).

Les mécanismes d'activation et de répression co-existent donc dans une fenêtre temporelle assez étroite. Un modèle mathématique basé sur les deux boucles de rétroaction a été

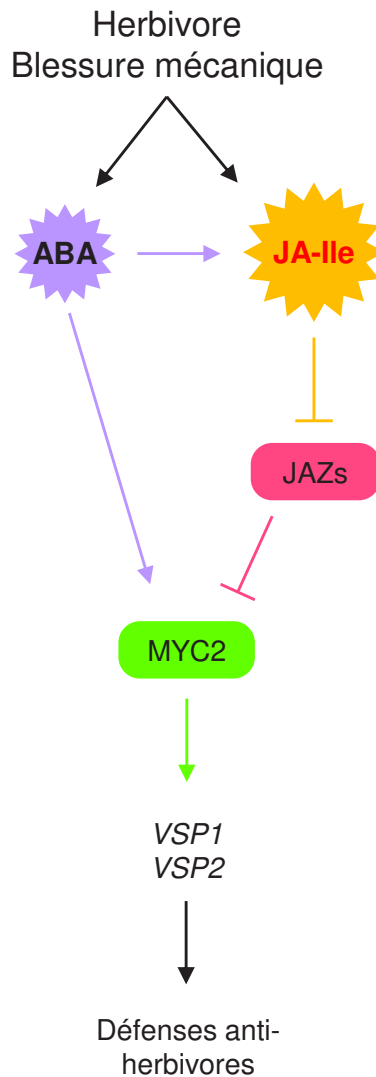


Figure 1.19. L'activation des défenses anti-herbivores régulée par les interactions hormonales.

La perception d'un herbivore, ou d'une blessure mécanique, entraîne une synthèse de JA-Ile et d'ABA qui vont tout deux agir en synergie pour promouvoir l'activation des défenses. L'ABA et le JA-Ile favorisent la fonction de MYC2, par dérépression des JAZ dans le cas du JA-Ile ce qui active la transcription des gènes de défenses anti-herbivores, représenté par l'induction des marqueurs VSP (Lorenzo *et al.*, 2004 ; Adi *et al.*, 2007 ; Pieterse *et al.*, 2012 ; Vos *et al.*, 2019).

ABA = acide abscissique ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; VSP = *vegetative storage protein*.

développé : la boucle négative où MYC2 active la transcription des répresseurs et la boucle positive où MYC2 induit la transcription des gènes de biosynthèse des JAs et lui-même (Banerjee et Bose, 2011). Ce modèle a pour but d'étudier la dynamique de la signalisation JAs et en accord avec les observations expérimentales il indique une expression transitoire des gènes de réponses (Banerjee et Bose, 2011; Wasternack et Hause, 2013). Ceci appuie le fait que l'induction précoce des systèmes de répression de la signalisation JAs dépendantes n'est pas un frein aux réponses biologiques.

3. Rôles biologiques des Jasmonates

3.1. L'adaptation aux stress biotiques

3.1.1. La défense contre les herbivores

L'activation de la défense contre les herbivores est initiée suite à la perception d'éliciteurs exogènes, telle les sécrétions orales des herbivores, appelés *Herbivore-associated molecular pattern (HAMP)* ou par des molécules endogènes de la plante, les *Damage-associated molecular pattern (DAMP)*, produits à partir des fragments des cellules endommagées (Jones et Dangl, 2006; De Vos et Jander, 2009; Zhang et al., 2018). Les HAMP et les DAMP déclenchent l'*Herbivore-triggered immunity (HTI)* (Erb et al., 2012) qui fonctionne entre autres par la synthèse et la signalisation JAs qui est spécifiquement nommée la *JA-triggered immunity (JATI)* (Campos et al., 2014). À la suite de la perception d'un stimulus tel la blessure, l'accumulation des JAs est importante et très rapide, elle commence à être quantifiable dans les deux minutes qui suivent le stress (Glauser et al., 2008). La blessure mécanique induit un panel de réponse similaire mais non identique à celui induit par l'attaque d'herbivore car les HAMP des insectes permettent d'induire d'autres réponses, en plus d'amplifier celles également induites par la blessure (Giri et al., 2006; Howe et Jander, 2008; Bricchi et al., 2010; Schäfer et al., 2011; Erb et al., 2012).

La défense est principalement médiée par la régulation d'une partie du métabolisme spécialisé de la plante qui a le plus souvent un effet toxique sur l'herbivore (Wasternack et Strnad, 2019). Par exemple chez les espèces du genre *Nicotiana*, l'agression par les insectes herbivores entraîne la synthèse de la nicotine, un alcaloïde toxique à propriété anti-nutritive (Baldwin et al., 1994), via la signalisation JAs qui libère les FT régulant positivement ses gènes de biosynthèse, (Steppuhn et al., 2004). Les Brassicacées se défendent notamment par la synthèse des glucosinolates (Manzaneda et al., 2010; Chen et al., 2019), une famille de composés toxiques constituée des glucosinolates indoliques ou aliphatiques (Wasternack et Strnad, 2019) dont la biosynthèse est directement régulée par MYC2 (Schweizer et al., 2013).

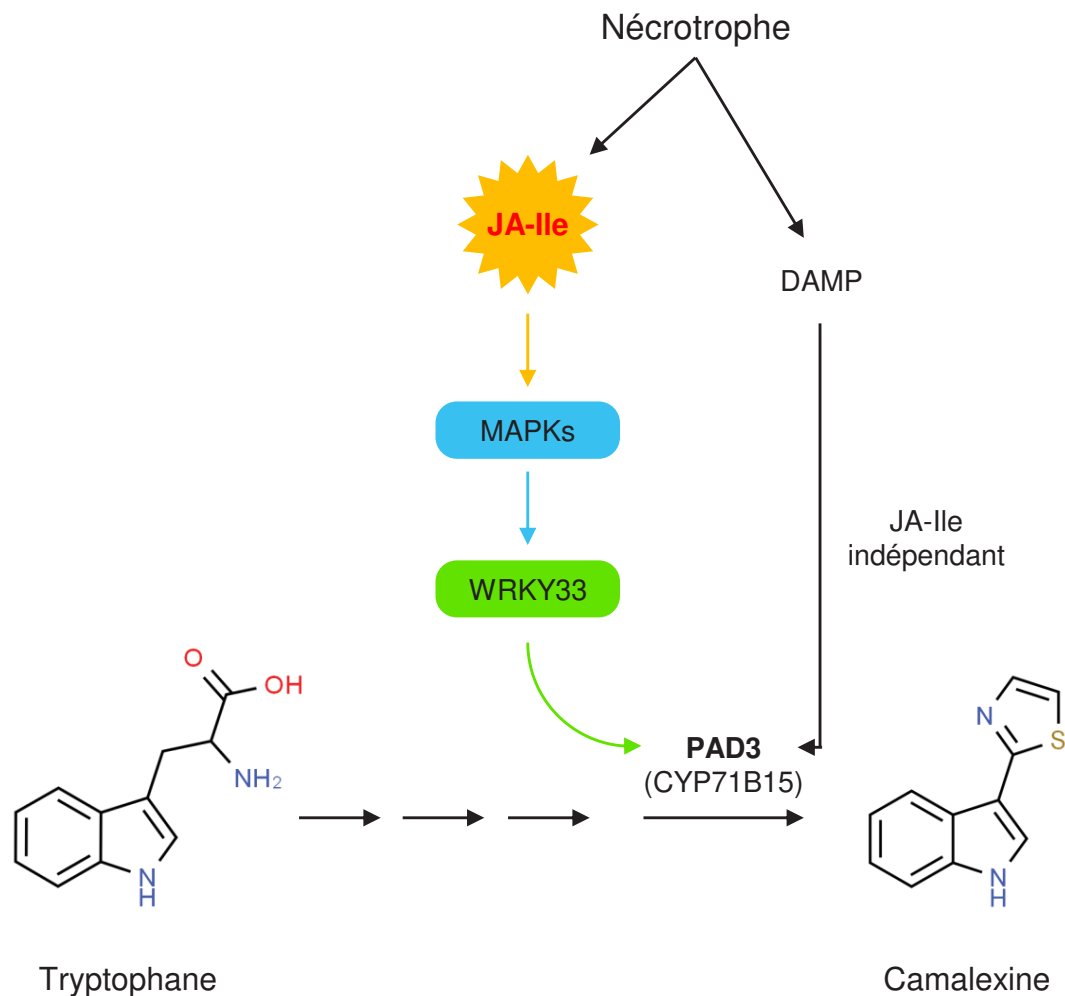


Figure 1.20. Voie de biosynthèse simplifiée de la camalexine.

La camalexine est une phytoalexine antifongique issue de la métabolisation du tryptophane et dont la dernière étape de formation est catalysée par PAD3 (Schuhegger et al., 2006). *PAD3* peut être induit par la signalisation JA-Ile qui active des MAPK permettant l'activation du facteur de transcription WRKY33 régulant positivement l'expression de *PAD3* (Takahashi et al., 2007 ; Mao et al., 2011). Ce gène peut également être induit par la perception de DAMP de façon JA-Ile indépendante (Ferrari et al., 2007).

CYP71 = cytochrome P450 de la famille 71 ; DAMP = *Damage-associated molecular pattern* ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; MAPK = *mitogen-activated protein kinase* ; PAD3 = *phytoalexine deficient 3*.

La synthèse de ce type de métabolites spécialisés représente une défense directe de la plante, mais les JAs permettent d'induire également une défense indirecte médiée par les VOCs qui peuvent attirer des carnivores, des parasitoïdes ou des prédateurs des herbivores (Howe et Jander, 2008; Wasternack et Hause, 2013). Par exemple chez le maïs à la suite de l'attaque par *Spodoptera littoralis* (Noctuelle méditerranéenne), la signalisation JAs induit la synthèse et l'émission de composés aromatiques et terpéniques qui attirent l'un de ses prédateurs, l'hyménoptère carnivore, *Cotesia marginiventris* (Ton et al., 2006). Bien que les défenses médiées par les JAs soient efficaces elles permettent la résistance seulement contre certains types d'insectes. Les études démontrent qu'elles agissent essentiellement contre les insectes herbivores de type mâcheurs, quelques piqueurs-suceurs se nourrissant dans le phloème, des crustacées détritvires terrestres, des mollusques et des mammifères comme *Sylvilagus nuttallii* (lapin de Nuttall) (Farmer et Dubugnon, 2009; Wasternack et Hause, 2013; Falk et al., 2014; Machado et al., 2016).

De plus l'efficacité des défenses n'est pas constante au cours de la journée, les herbivores étant soumis au cycle circadien, les plantes ont optimisé leurs défenses en fonction des phases actives de leurs prédateurs (Kazan et Manners, 2011; Wasternack et Hause, 2013). Par exemple chez *Arabidopsis*, des plantes qui ne sont pas soumises au cycle circadien se révèlent plus sensibles à *Trichoplusia ni* (Fausse-arpenteuse du chou) et montrent plus de dégâts foliaires (Goodspeed et al., 2012). Les plantes qui se sont développées dans une alternance jour-nuit sont plus résistantes et il apparaît que l'accumulation du JA est elle-même dépendante du cycle circadien, avec un pic d'accumulation au milieu de la période diurne correspondant à la période où *T. ni* est actif et a besoin de se nourrir (Goodspeed et al., 2012). Ceci dévoile que la perception de la lumière par la plante régule les réponses JAs dépendante en modulant l'accumulation au cours du jour. Par exemple *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN1 (VSP1)* et *VSP2* sont deux gènes induits par la signalisation JA-Ile suite à la blessure ou à l'attaque d'un herbivore et dont l'expression est régulée positivement par *MYC2* et la lumière (Pieterse et al., 2012). *VSP1* et *VSP2* codent pour des phosphatases acides dont l'activité altère le développement des insectes et augmente leur mortalité (Liu et al., 2005). L'expression et l'accumulation de *MYC2* sont elles-mêmes régulées par le cycle circadien et montrent, tout comme l'accumulation de JA, un pic d'expression et d'accumulation au milieu de la période jour (Robson et al., 2010; Shin et al., 2012; Kazan et Manners, 2013).

Finalement si les JAs sont les inducteurs majeurs des réponses de défenses anti-herbivores ce n'est pas la seule classe hormonale à participer à l'activation de ces défenses, l'ABA agit en synergie avec les JAs (Figure 1.19), comme démontré par exemple chez *Arabidopsis*, la tomate, ou le tabac (Nguyen et al., 2016; Vos et al., 2019). L'interaction entre les JAs et l'ABA se retrouve d'abord au niveau de *MYC2* et de ses homologues, *MYC3* et *MYC4*, qui sont

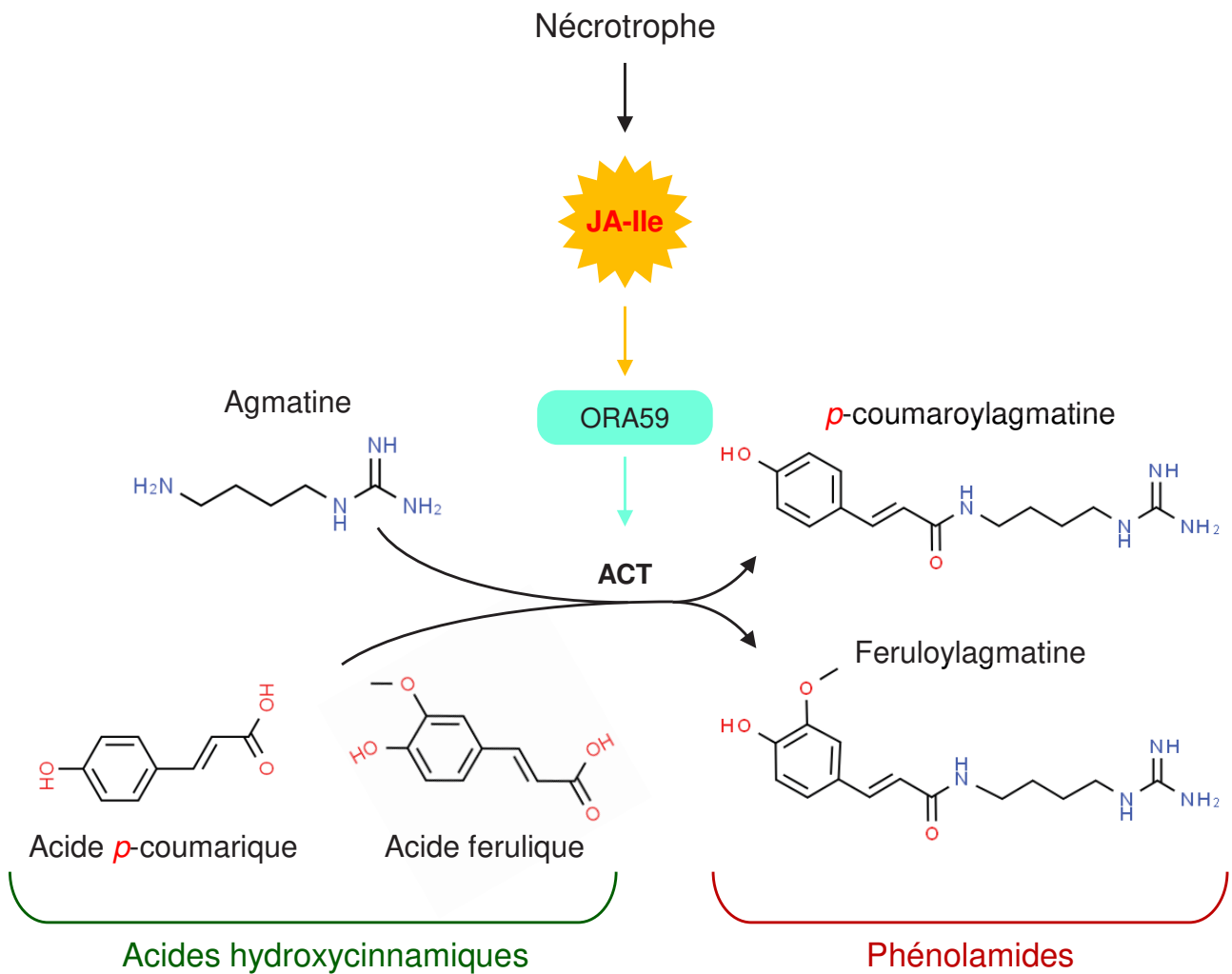


Figure 1.21. Voie de biosynthèse simplifiée des phénolamides.

Les phénolamides comme la *p*-coumaroylagmatine et la feruloylagmatine sont des composés anti-nécrotrophes issus de la conjugaison entre une molécule de polyamine telle l'agmatine et d'un acide hydroxycinnamique qui dérive de la voie des phénylpropanoïdes (Muroi *et al.*, 2009). La conjugaison est catalysée par l'enzyme ACT dont l'expression est régulée positivement par le facteur de transcription ORA59 qui est induit par la signalisation JA-Ile (Muroi *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2018).

ACT = *agmatine coumaroyltransferase* ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-iso-leucine ; ORA59 = *octadecanoid-responsive arabidopsis ap2/erf59*.

induits suite à un traitement ABA de façon COI1 dépendante (Figure 1.19) (Lorenzo et al., 2004; Nguyen et al., 2016). De plus l'agression par un herbivore tel *Pieris rapae* (Piéride de la rave) d'*Arabidopsis* résulte en une hausse des quantités endogènes d'ABA ce qui favorise la branche anti-herbivores MYC2-VSP (Vos et al., 2019). Ajouté à l'effet régulateur sur l'induction des réponses de défenses, des données transcriptomiques suggèrent que l'ABA intervient aussi dans l'induction de la biosynthèse des JAs, il a d'ailleurs été caractérisé récemment que deux lipases induites par l'ABA permettent la libération du précurseur PUFA des JAs (Wang et al., 2018). Ces données révèlent un second niveau d'interaction entre les deux voies hormonales (Figure 1.19) (Adie et al., 2007; Nguyen et al., 2016).

3.1.2. La défense contre les pathogènes nécrotrophes

La défense contre les nécrotrophes induite par les JAs présente de nombreuses similitudes avec la défense contre les herbivores. Les éliciteurs impliqués peuvent être des DAMP ou des *Pathogen-associated molecular pattern* (**PAMP**) qui correspondent à des molécules ou épitopes du pathogène qui permettent d'induire la réponse appropriée à l'agresseur perçu via la JATI et les flux de calcium (Erb et al., 2012; Wasternack et Hause, 2013; Campos et al., 2014). La JATI contre les nécrotrophes fonctionne également par la régulation du métabolisme spécialisé JAs dépendant, tel la synthèse d'alcaloïdes, de terpénoïdes, de phénylpropanoïdes ainsi que des protéines anti-nutritives ou des protéines *pathogenesis-related* (**PR**) dotés d'activités antimicrobiennes (Howe et Jander, 2008; Campos et al., 2014). Chez *Arabidopsis* et d'autres Brassicacées est produite une phytoalexine antifongique majeure, la camalexine un composé de type indole alcaloïde (Kuc, 1995; Schuhegger et al., 2006). Sa synthèse est initiée depuis le tryptophane et la dernière étape de sa formation est catalysée par le CYP71B15 aussi appelé *phytoalexin deficient 3* (**PAD3**) (Figure 1.20) (Zhou et al., 1999; Schuhegger et al., 2006). La déficience de *PAD3* cause une perte de la synthèse de camalexine et une augmentation de la sensibilité de la plante aux nécrotrophes (Rowe et al., 2010). L'expression de *PAD3* est régulé par le FT WRKY33 en réponse à une cascade de phosphorylation induite par l'infection (Mao et al., 2011) médié par les *mitogen-activated protein kinase* (**MAPK**) kinase 3 et 6 qui sont activées par les JAs (Figure 1.20) (Takahashi et al., 2007). Néanmoins une déficience de la synthèse ou de la signalisation des JAs cause une diminution et non une perte de l'accumulation de camalexine dû à une induction moins forte de *PAD3* suite à une infection (Rowe et al., 2010). De plus des DAMP issus des parois des cellules infectées permettent d'induire *PAD3* de façon JA-Ile indépendante (Figure 1.20) (Ferrari et al., 2007) signifiant que d'autres facteurs que les JAs régulent l'expression de ce gène.

Les composés de type amide d'acide hydroxycinnamique sont des conjugués d'acide hydroxycinnamique et de polyamine telle l'agmatine (Figure 1.21) (Muroi et al., 2009). La

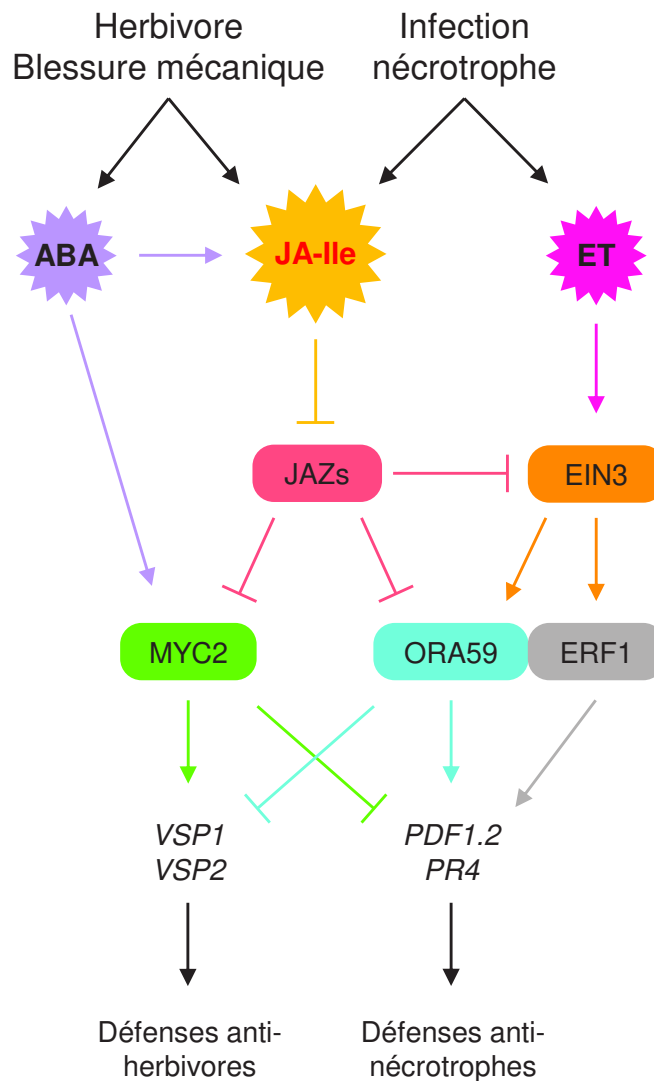


Figure 1.22. L'activation des défenses anti-nécrotrophes régulées par les interactions hormonales.

La perception d'un pathogène nécrotrophe entraîne une synthèse de JA-Ile et d'ET qui vont tous deux agir en synergie pour promouvoir l'activation des défenses. L'ET et le JA-Ile favorisent la fonction des facteurs de transcriptions ORA59 et de ERF1, par la dérégulation des JAZ dans le cas du JA-Ile et par l'induction du facteur de transcription positif EIN3 dans le cas de l'ET. ORA59 et ERF1 activent la transcription des gènes de défenses anti-nécrotrophes tel que PDF1.2 et PR4 (Potter *et al.*, 1993 ; Penninckx *et al.*, 1996 ; Lorenzo *et al.*, 2004 ; Pré *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 2011).

ABA = acide abscissique ; EIN3 = *ethylene insensitive 3* ; ERF1 = *ethylene response factor 1* ; ET = éthylène ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-iso-leucine ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; ORA59 = *octadecanoid-responsive arabidopsis ap2/erf59* ; PDF1.2 = *plant defensine 1.2* ; VSP = *vegetative storage protein*.

conjugaison est catalysée par l'*agmatine coumaroyltransferase* (**ACT**) qui peut former entre-autre de la *p*-coumaroylagmatine ou de la feruloylagmatine (Muroi et al., 2009), des composés de type phénolamides (**Figure 1.21**). L'expression d'ACT est dépendante du FT *OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59* (**ORA59**) (**Figure 1.21**) (Li et al., 2018) ce qui démontre que la signalisation JAs est nécessaire pour l'expression de ce gène, et en aval à la synthèse des phénolamides, des composés antifongiques qu'on retrouve dans de nombreuses plantes.

Les JAs agissent en synergie avec une autre hormone, l'ET, pour permettre une défense optimale contre les nécrotrophes (**Figure 1.22**), au même titre que les interactions ABA-JAs contre les herbivores (**Figure 1.19**) (Nguyen et al., 2016). Le JA et l'ET régulent positivement les FT *ORA59*, *ETHYLENE INSENSITIVE 3* (**EIN3**) et *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1* (**ERF1**) (Lorenzo et al., 2004; Pré et al., 2008; Nguyen et al., 2016). *ORA59* et *ERF1* induisent *plant defensin 1.2* (**PDF1.2**) et *pathogenesis-related 4* (**PR4**) (**Figure 1.22**), deux marqueurs de la défense anti-nécrotrophes (Lorenzo et al., 2004; Pré et al., 2008). *PDF1.2* est une défensine de plante, un petit peptide antimicrobien, exprimée à la suite d'une infection foliaire (Penninckx et al., 1996; Thomma et al., 2002; Pré et al., 2008) et *PR4* est une protéine antifongique de type chitinase induite par l'infection nécrotrophe (Potter et al., 1993; Thomma et al., 1998).

3.1.3. Antagonismes et interactions hormonales

Les JAs permettant la défense contre deux grands types d'agresseurs, il existe des phénomènes d'inhibitions entre la branche anti-herbivores et la branche anti-nécrotrophes afin que seules les défenses adaptées à l'agresseur perçu soient induites. La branche de signalisation anti-herbivores est définie par *MYC2*, ainsi que *MYC3* et *MYC4*, qui activent la transcription des FT *abscisic-acid-responsive NAC 019* (**ANAC019**) et *ANAC055* qui à leur tour induisent l'expression des gènes de défenses représentés par le marqueur *VSP1* (**Figure 1.23**) (Bu et al., 2008; Pieterse et al., 2012; Kazan et Manners, 2013; Wasternack et Hause, 2013). La signalisation JAs anti-nécrotrophes est intégrée par les FT *ORA59* et *ERF1* qui induisent un spectre de gènes défensifs dont *PDF1.2* (**Figure 1.23**) (Pré et al., 2008; Wasternack et Hause, 2013). Plusieurs niveaux d'inhibition ont été décrit entre les acteurs de ces deux branches (Kazan et Manners, 2013; Wasternack et Hause, 2013; Nguyen et al., 2016). Premièrement les FT *MYC* vont réprimer l'induction des gènes anti-nécrotrophes et deuxièmement *ERF1* et *ORA59* eux-mêmes répriment ceux anti-herbivores (**Figure 1.23**) (Lorenzo et al., 2004; Dombrecht et al., 2007; Pré et al., 2008; Kazan et Manners, 2013; Wasternack et Hause, 2013). Cet antagonisme est dû à l'inhibition mutuelle des *MYC* avec *ERF1* et *ORA59*, néanmoins tous ces FT sont réprimés par les *JAZ* et induits par le JA-Ile (**Figure 1.23**) (Wasternack et Hause, 2013; Nguyen et al., 2016). La balance définissant

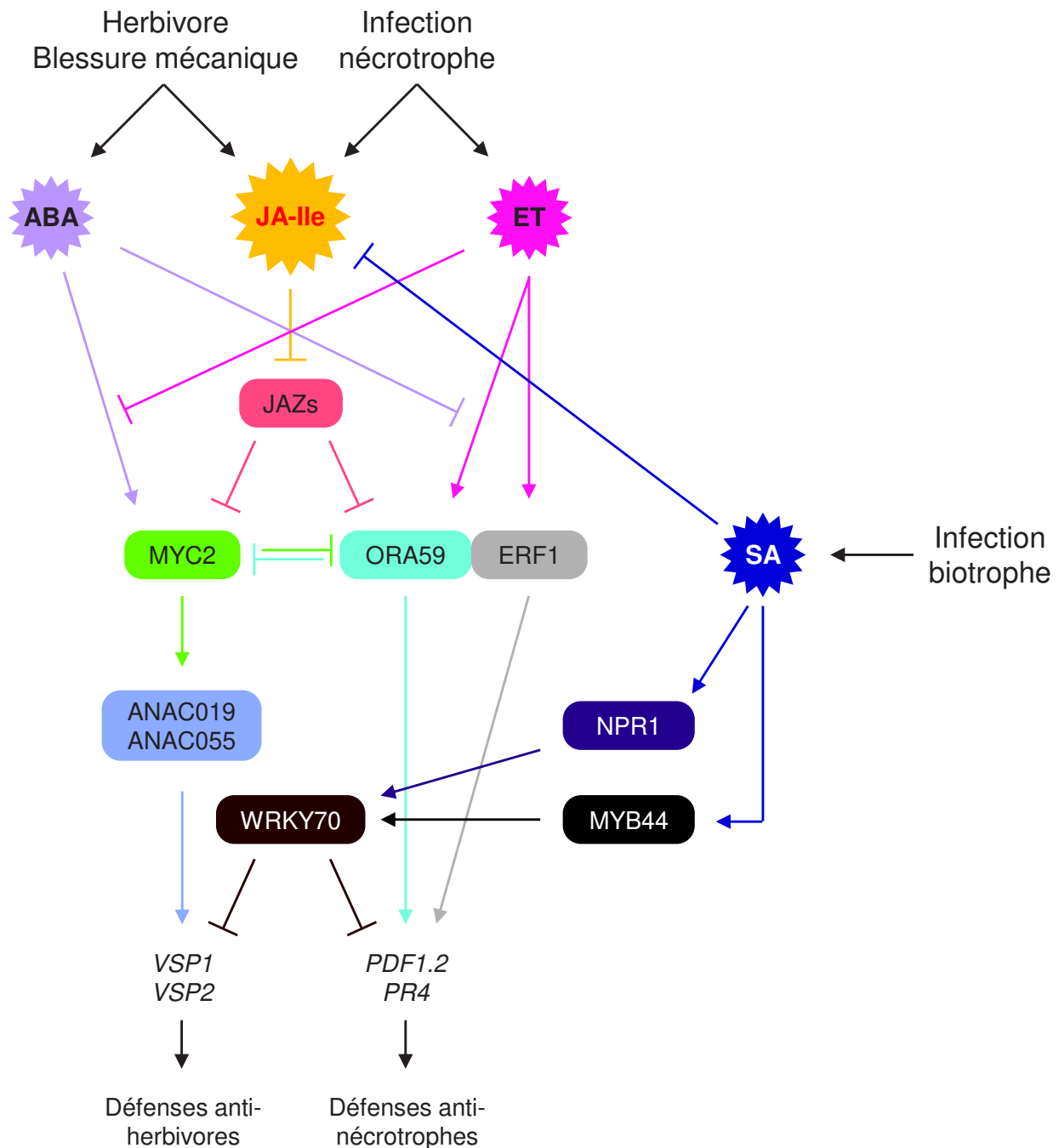


Figure 1.23. Antagonismes et inhibitions hormonales des réponses de défenses.

L'action combinée du JA-Ile et de l'ET permet d'activer les défenses anti-nécrotrophes par l'intermédiaire des facteurs de transcriptions ORA59 et ERF1 qui ont un effet répresseur sur MYC2 et ses homologues, bloquant ainsi les défenses anti-herbivores (Bu *et al.*, 2008 ; Kazan et Manners, 2013 ; Nguyen *et al.*, 2016). De façon similaire et antagoniste, les effets associés du JA-Ile et de l'ABA activent les défenses anti-herbivores par l'intermédiaire de MYC2 qui a un effet répresseur sur ORA59 et sur ERF1, empêchant l'induction des défenses anti-nécrotrophes (Pré *et al.*, 2008 ; Vos *et al.*, 2013 ; Wasternack et Hause, 2013 ; Nguyen *et al.*, 2016). Le SA est une hormone qui va inhiber les deux branches de défenses induites par les jasmonates. Cette hormone est synthétisée suite à une infection par un pathogène biotrophe, elle inhibe la biosynthèse des jasmonates ainsi que la signalisation JA-Ile dépendante. Le SA active le récepteur NPR1 et le facteur de transcription MYB44 qui régulent positivement WRKY70 qui réprime l'expression des défenses anti-herbivores et anti-nécrotrophes (Leon-Reyes *et al.*, 2010 ; Pieterse *et al.*, 2012 ; Shim *et al.*, 2013 ; Nguyen *et al.*, 2016).

ABA = acide abscissique ; ANAC = *abscisic-acid-responsive NAC* ; ERF1 = *ethylene response factor 1* ; ET = éthylène ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; NPR1 = *non expresser of pathogenesis related genes 1* ; ORA59 = *octadecanoid-responsive arabidopsis ap2/erf59* ; PDF1.2 = *plant defensin 1.2* ; PR4 = *pathogenesis-related4* ; SA = acide salicylique ; VSP = *vegetative storage protein*.

l'induction de l'une ou l'autre branche est contrôlée par les *crosstalks* avec l'ABA ou l'ET (Wasternack et Hause, 2013; Nguyen et al., 2016). La synthèse d'ET est induite par les nécrotrophes et cette hormone induit, avec le JA-Ile, l'expression d'ORA59, d'ERF1 et d'EIN3 qui inhibent l'action des MYC et l'induction de ces cibles (Figure 1.23) (Penninckx et al., 1996; Anderson et al., 2004; Lorenzo et al., 2004; Pré et al., 2008; Zhu et al., 2011; Nguyen et al., 2016). A l'opposé l'ABA est produit suite à une attaque herbivore et en synergie avec JA-Ile ils induisent l'expression des MYC réprimant ainsi les défenses anti-nécrotrophes au profit de la défense contre les herbivores (Figure 1.23) (Anderson et al., 2004; Vos et al., 2013; Song et al., 2014; Nguyen et al., 2016; Vos et al., 2019). Pour renforcer ces effets, l'ET et l'ABA montrent aussi une inhibition mutuelle, la signalisation de chacune permet de réguler la biosynthèse, la signalisation et le catabolisme de l'autre (Figure 1.23) (Anderson et al., 2004; Cheng et al., 2009b; Wasternack et Hause, 2013; Nguyen et al., 2016).

La défense contre les pathogènes de type biotrophe est essentiellement induite par la signalisation SA. Il existe un antagonisme connu de longue date entre la voie SA et la voie JAs ou chacun inhibe l'action de l'autre afin de favoriser un type de défense en fonction de l'agresseur perçu (Pieterse et al., 2012; Wasternack et Hause, 2013). Cet antagonisme peut moduler les réponses JAs dépendantes dans les cas où la plante subit une infection simultanée des deux types de pathogènes. Le SA peut bloquer l'action des JAs à plusieurs niveaux, il peut inhiber l'expression des gènes de biosynthèse des JAs mais également celle des gènes de réponses JA-Ile dépendant (Figure 1.23) (Leon-Reyes et al., 2010). L'un des mécanismes élucidés montre que le récepteur *NON EXPRESSER OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1* (**NPR1**) essentiel à signalisation SA dépendante permet d'induire le FT WRKY70 qui régule négativement *PDF1.2* et *VSP1* (Figure 1.23) (Shim et al., 2013).

3.1.4. L'influence du transport

Les réponses de défenses sont induites localement au point d'infection ou d'herbivorie mais il se produit aussi une induction dans des parties distantes saines de la plante, supposant un transport de JAs et/ou un signal induisant une biosynthèse des JAs (Farmer et al., 2014; Koo, 2017; Wang et al., 2019). Il a été mis en évidence que la blessure mécanique induit la signalisation JAs dans les cellules voisines de celles stimulées signifiant qu'il existe un mouvement de cellule à cellule qui permet d'induire la signalisation JAs sur de courtes distances (Gasperini et al., 2015a). Une signalisation est aussi perçue dans des tissus ou des organes plus éloignés de la zone stimulée signifiant un mouvement à longue distance.

Après une blessure, une accumulation de JA est mesurable dans des feuilles distales non stimulées dans les minutes qui suivent le stress, en particulier dans celles qui ont une

connexion vasculaire avec la feuille blessée (Glauser et al., 2008, 2009). Le JA-Ile est lui aussi détectable dans des feuilles distales et c'est corrélé avec une expression d'enzyme permettant sa biosynthèse comme OPR3 et JAR1 (Koo et al., 2009). De plus le mutant *jar1* perd l'accumulation systémique de JA-Ile, l'ensemble de ces données suggère que la réponse systémique est dû à un signal qui induit la néosynthèse de JAs (Koo et al., 2009; Koo, 2017). Il est suspecté que c'est un signal électrique qui permet la synthèse systémique de JAs car il est observé une corrélation entre la dépolarisation membranaire et la signalisation JAs dépendante dans les feuilles vasculaire connectée avec celle ayant subi une blessure mécanique (Mousavi et al., 2013; Koo, 2017). De plus l'absence des canaux ioniques *GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE (GLR)* cause une déficience dans l'activité électrique des feuilles blessées ainsi qu'une réduction de la signalisation JAs dans les feuilles systémiques (Mousavi et al., 2013; Campos et al., 2014; Farmer et al., 2014). Une dépolarisation entraîne bien souvent une ouverture des canaux ionique tels les GLR qui sont impliqué dans les flux de calcium. Plusieurs études récentes démontrent que la blessure mécanique et l'alimentation par un insecte herbivore crée un flux de calcium qui se propage dans la plante et le blocage de ce flux atténue la signalisation JAs systémique (Toyota et al., 2018; Wang et al., 2019). L'ensemble de ces recherches supposent le modèle comme suit : un stimulus induisant les JAs cause un signal électrique qui se propage de façon systémique dans la plante permettant une ouverture de canaux ioniques et influant les flux de calcium (Wang et al., 2019). La perception du calcium induisant la dégradation de JAV1 et la dissociation du complexe JJW qui réprime les gènes de biosynthèse des JAs (Figure 1.15) (Yan et al., 2018a), cela suppose que c'est le complexe JJW qui fait le lien entre la perception du flux de calcium et la synthèse systémique de JA et de JA-Ile. Ce modèle reste à démontrer.

En parallèle de signaux systémiques induisant la néosynthèse de JAs, certains dérivés du JA montrent une capacité de mouvement dans la plante (Wang et al., 2019). En effet le MeJA peut être transporté par le phloème et le xylème ce qui permet une répartition systémique de ce composé (Thorpe et al., 2007). Il est possible que dans les feuilles systémiques non stimulé le MeJA exporté soit déméthylé en JA (Stuhlfelder et al., 2004). Le JA-Ile lui-même présente un transport distal dans la plante depuis la zone de blessure chez le tabac et la tomate, le même résultat a été observé pour le JA même s'il présente une mobilité moindre que le JA-Ile (Sato et al., 2011). Ces résultats sont soutenus par la découverte récente du transporteur JAT1 qui permet l'export dans l'apoplasme du JA (Figure 1.10) (Li et al., 2017). De plus JAT1 permet l'import nucléaire du JA-Ile, il est donc possible qu'il permette aussi l'export dans l'apoplasme du JA-Ile. En plus des dérivés il a été montré que le précurseur OPDA présente une mobilité dans des plantules d'*Arabidopsis*, la blessure au niveau d'un cotylédon entraîne le transport par le phloème d'OPDA vers les racines (Schulze et al., 2019). Il est envisageable que l'OPDA,

à l'image du JA, du JA-Ile et du MeJA, puisse subir un transport systémique vers des feuilles distales non stimulées. Il est supposé que le signal électrique permet une accumulation systémique et une signalisation rapide là où le mouvement des JAs agirait plutôt pour une signalisation tardive (Thorpe et al., 2007; Wang et al., 2019).

3.2. L'adaptation aux stress abiotiques

Bien que la défense contre les herbivores et les pathogènes nécrotrophes soit le rôle majeur de la signalisation JAs, ils démontrent également une importance dans l'induction des réponses adaptatives contre divers stress abiotiques tel la lumière, la chaleur, le froid, la sécheresse ou encore l'excès de sel (Santino et al., 2013; Ruan et al., 2019). L'excès de lumière cause, entre autre, une dégradation de l'appareil photosynthétique (Kazan et Manners, 2011) dont elles se protègent en produisant des pigments capables d'absorber l'excès de lumière et de protéger l'appareil photosynthétique. Les anthocyanes ont ce rôle phytoprotecteur et leur synthèse est régulée par la lumière d'une part mais aussi par les JAs de façon COI1-dépendante (Chen et al., 2007; Shan et al., 2009; Kazan et Manners, 2011). Les JAs ont également une implication dans la résistance aux stress thermiques particulièrement aux basses températures. Une application de MeJA permet d'augmenter la résistance au froid en réduisant les dommages notamment chez la tomate, le riz, le bananier, la grenadier ou encore le manguier (Santino et al., 2013; Ruan et al., 2019). L'un des effet induit par le froid chez *Arabidopsis* est l'induction de l'expression de trois FAD, ce qui corrèle avec une augmentation du taux du précurseurs des JAs, le C18:3 (Shi et al., 2011). Une autre étude sur *Arabidopsis* démontre aussi que les JAZ répriment le FT *INDUCER OF CBF EXPRESSION (ICE)* essentiel pour induire la résistance au froid, démontrant l'implication des JAs dans la résistance au stress thermique froid (Hu et al., 2013b).

Le stress hydrique ainsi que le stress salin causent notamment un stress osmotique et on observe une similarité dans les réponses induites. Il est observé une accumulation transitoire des JAs suite à la perception du stress hydrique (Ruan et al., 2019), par exemple chez *Cicer arietinum* (pois chiche) qui est corrélée avec une hausse de l'expression des gènes de biosynthèse des JAs (De Domenico et al., 2012). De plus l'application de MeJA ou de JA permet une augmentation de la résistance au stress hydrique pour *Oryza sativa*, *Glycine max* et *Brassica oleracea* (Ruan et al., 2019). Chez *Arabidopsis* le stress hydrique entraîne la synthèse d'acétate qui va servir de signal pour induire la synthèse de JA et de JA-Ile ce qui favorise la tolérance au stress hydrique de façon COI1 dépendante (Figure 1.24A) (Kim et al., 2017). Par ailleurs un traitement des plantes à l'acide acétique permet d'accroître le taux de survie face à la déshydratation corrélé à une suraccumulation de JAs par rapport à des plantes non traitées (Kim et al., 2017). Les rôles biologiques des JAs en réponse à ces deux stress

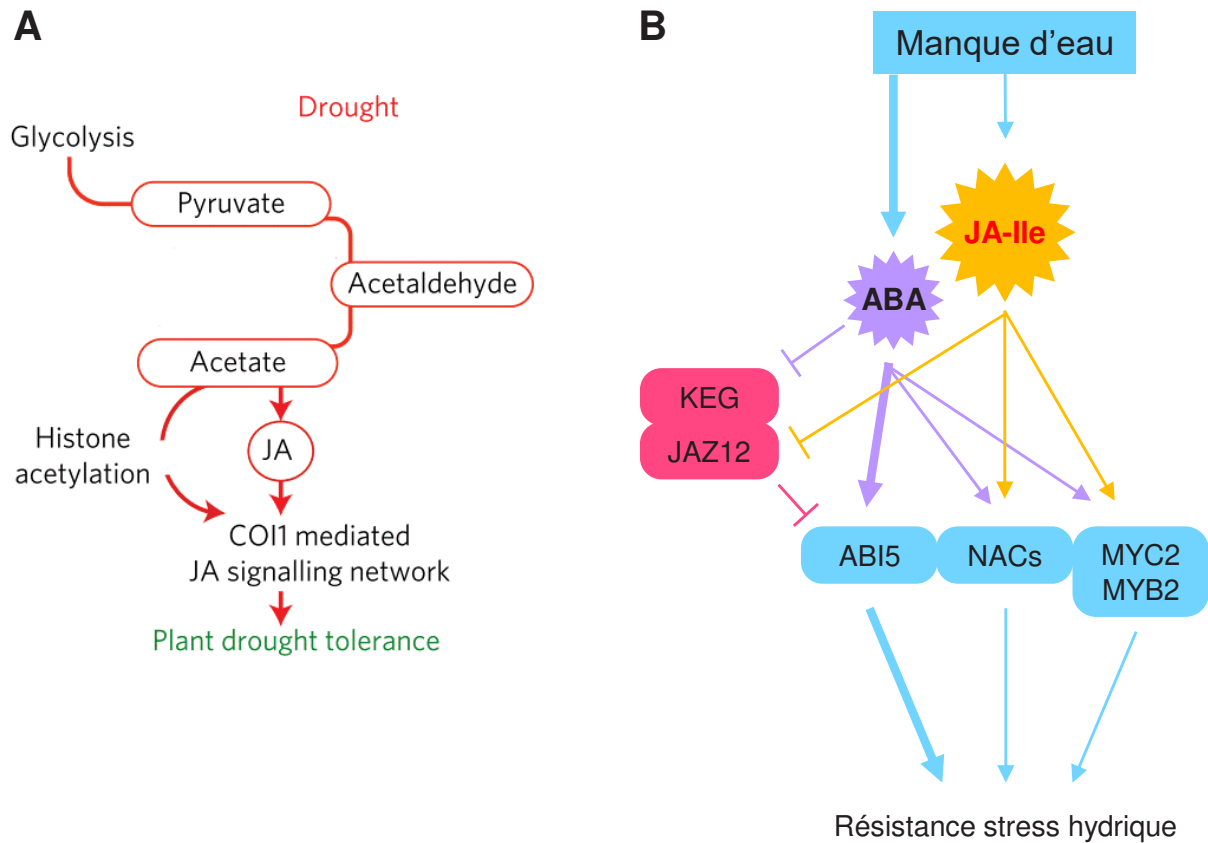


Figure 1.24. La résistance aux stress hydrique JA-Ile dépendante.

A, la perception du stress hydrique par manque d'eau cause une redirection du pyruvate formé par glycolyse pour le cycle de Krebs vers la synthèse d'acétate (Kim *et al.*, 2017). L'acétate ainsi formé favorise l'activation des gènes de la synthèse et de la signalisation des JAs, participant à la tolérance à la déshydratation (Kim *et al.*, 2017).

Adapté de Kim *et al.*, 2017.

B, la résistance contre la déshydratation et le sel est médiée par les jasmonates et par l'ABA. L'ABA induit trois voies de signalisation de résistance au stress hydrique, la voie majeure régulée par le facteur de transcription ABI5 et les deux voies mineures régulées par NAC ou par MYC2 et MYB2 (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007 ; Skubacz *et al.*, 2016). La signalisation JA-Ile active également ces trois voies. Dans le cas de la voie majeure autant le JA-Ile que l'ABA permettent de dégrader JAZ12 et KEG, respectivement, ce qui les dissocie et lève la répression qu'ils exercent sur ABI5 (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007 ; Pauwels *et al.*, 2015 ; Skubacz *et al.*, 2016).

ABA = acide abscissique ; ABI5 = *abscisic acid insensitive5* ; COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; KEG = *keep on going*.

sont encore mal connus et nécessitent de plus amples investigations. Néanmoins un effet observé est dû à l'interaction avec l'ABA, l'hormone majeure pour l'induction des réponses de résistances face à ces stress (Figure 1.24B) (Golldack et al., 2014). Trois voies de résistance au stress hydrique connues sont dépendantes de la signalisation ABA. Plusieurs interactions directes entre ABA et JAs sont connues entre ces trois voies (Skubacz et al., 2016), par exemple via JAZ12 et le répresseur *KEEP ON GOING (KEG)* qui réprime le FT *ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 (ABI5)* nécessaire à la signalisation de la voie majeure ABA dépendante de résistance au stress hydrique (Figure 1.24B) (Pauwels et al., 2015; Skubacz et al., 2016). Les deux autres voies sont mineures, l'une fonctionne par l'induction du FT NAC et une seconde par les FT MYB et MYC2, qui sont tous trois également régulés par la signalisation ABA et JA-Ile (Figure 1.24B) (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007; de Ollas et Dodd, 2016). Un effet biologique démontré et qui est initié par les deux hormones est la fermeture des stomates pour limiter la déperdition en eau. Un traitement d'*Arabidopsis* au MeJA induit la fermeture des stomates par la production de ROS et de monoxyde d'azote (**NO**), de façon COI1 dépendante, induisant l'ouverture des canaux calciques pour permettre la plasmolyse des cellules de garde nécessaire à la fermeture du stomate (Munemasa et al., 2007). L'action de l'ABA entraîne également la production de ROS et de NO pour induire la fermeture des stomates. Bien que ce soit le même mécanisme qui est induit, les auteurs ont démontré que l'action du JA et de l'ABA sont indépendant l'un de l'autre (Munemasa et al., 2007). Cela démontre que la résistance au stress hydrique par la fermeture des stomates est régulée par les deux voies hormonales ABA et JAs mais pour l'instant sans interaction directe connue entre-elles.

3.3. Les réponses développementales

3.3.1. Le développement racinaire

Les JAs sont connus pour avoir un effet inhibiteur de la croissance racinaire (Wasternack et Hause, 2013; Huang et al., 2017). La déficience des JAZ, ou du corépresseur NINJA, donne un phénotype de racine plus courtes par rapport au WT là où la surexpression des répresseurs entraîne des racines plus longues (Chini et al., 2007; Chung et Howe, 2009; Thireault et al., 2015; Huang et al., 2017). Le JA-Ile permet la dérégulation de MYC2 et de ses homologues MYC3 et MYC4 qui sont exprimés dans les racines, dans des couches cellulaires spécifiques (Gasperini et al., 2015b). MYC2 dé-réprimé va se lier aux promoteurs de *PLETHORA 1 (PLT1)* et *PLT2* et réprimer leur transcription (Chen et al., 2011). Ce sont deux FT essentiels pour la division et la différenciation des cellules souches du méristème apical racinaire (Scheres et Krizek, 2018). Leur répression par les JAs inhibe la croissance racinaire en aval au profit de la défense contre, par exemple, les nématodes (Wasternack, 2014). D'autre part l'adaptateur

NINJA réprime la signalisation JAs, ce qui dans les racines a pour effet de favoriser l'élongation des cellules (Acosta et al., 2013), révélant qu'en plus de réprimer la différenciation, les JAs répriment aussi l'élongation cellulaire et ces deux actions combinées constituent la fonction d'inhibition de la croissance racinaire des JAs.

La signalisation JAs a aussi un effet sur la formation et le développement des racines latérales et des racines adventives (Wasternack et Hause, 2013; Huang et al., 2017). Elle inhibe la formation des racines adventives chez *Arabidopsis* via MYC2 suite à un stimulus auxine dépendant (Gutierrez et al., 2012). Concernant les racines latérales, la signalisation JAs va au contraire favoriser leur développement via une action combinée avec l'ET et l'auxine (Cai et al., 2014; Huang et al., 2017). Le JA-Ile va induire l'ERF109 qui sera activé par la signalisation ET et régulera positivement deux gènes essentiels de la synthèse de l'auxine qui promouvra la formation des racines latérales (Cai et al., 2014; Huang et al., 2017). L'impact des JAs dans le développement des différents types racinaires fait qu'ils sont des acteurs de la rhizotaxie des plantes (Lakehal et al., 2020)

3.3.2. La reproduction

Les JAs ont une fonction importante dans le développement des organes reproducteurs des végétaux, les fleurs, néanmoins selon l'espèce considérée ils ont une fonction différente voir même opposée (Wasternack et Hause, 2013). Chez les Brassicacées, la signalisation JAs est induite par les GA et impliquée dans le développement des étamines et la viabilité du pollen, donc les JAs permettent la fertilité mâle (Park et al., 2002; Wasternack et Hause, 2013). Les GA vont induire la dégradation des répresseurs DELLA qui inhibent l'expression de DAD1, la phospholipase libérant le précurseur C18:3 des JAs dans les fleurs (Ishiguro et al., 2001; Cheng et al., 2009a). L'action des GA entraîne la synthèse, et la signalisation, des JAs qui vont dé-réprimer les FT MYB21, MYB24 et les MYC qui régulent positivement MYB108 (Cheng et al., 2009a; Mandaokar et Browse, 2009; Qi et al., 2015; Huang et al., 2017). MYB108 induit l'allongement du filament de l'étamine afin de permettre la pollinisation du stigmate, augmente la viabilité du pollen et la fécondité (Mandaokar et Browse, 2009; Wasternack et Hause, 2013). Chez les Solanacées, il a été montré qu'un mutant de tomate dans la perception du JA-Ile est femelle stérile, dû à un arrêt du développement embryonnaire et de la graine (Li et al., 2004; Wasternack et Hause, 2013). Le développement de l'ovule est compromis car le FT MYB21 ne régule plus ces cibles (Schubert et al., 2019). Chez les Poacées plusieurs fonctions des JAs ont été démontrées, chez le riz par exemple la signalisation est essentielle pour permettre le développement de l'inflorescence (Li et al., 2009; Huang et al., 2017). Une déficience en JAs entraîne un épillet anormal qui présente entre autres des étamines malformées avec un défaut de déhiscence (Li et al., 2009; Huang et al., 2017). Chez le maïs en revanche les JAs

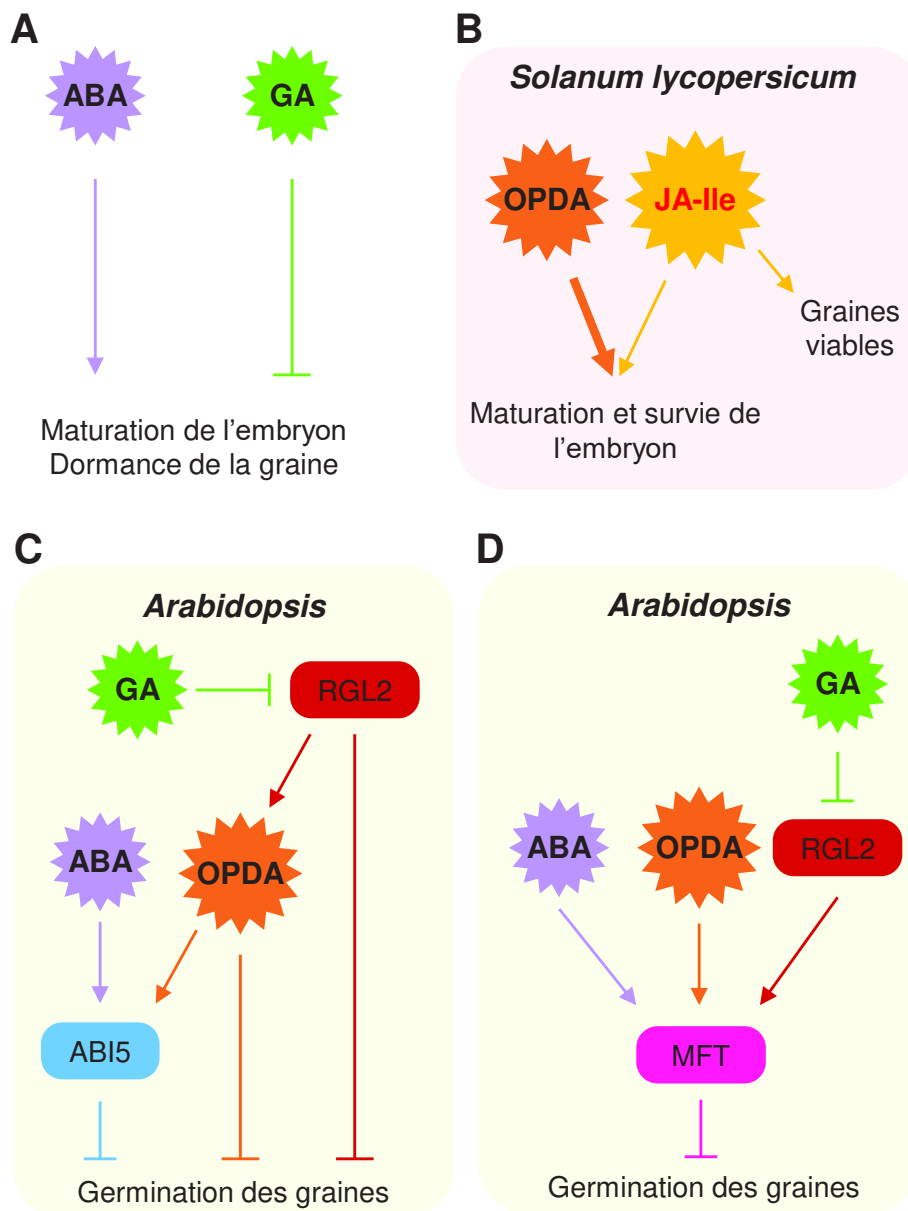


Figure 1.25. Effets connus des jasmonates sur la biologie des graines.

A, le développement de la graine est régulée par des balances hormonales notamment la balance GA et ABA qui réprime et induit, respectivement, la maturation et la dormance de la graine (Rajjou *et al.*, 2012).

B, chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) la signalisation de plusieurs jasmonates intervient dans le cycle de la graine. L'OPDA et le JA-Ile agissent de concert pour assurer la maturation de l'embryon et diminuer la mort cellulaire programmée, néanmoins l'OPDA montre un rôle prédominant par rapport au JA-Ile pour ces fonctions (Goetz *et al.*, 2012). Cependant le JA-Ile a un impact sur la viabilité des graines matures (Scalschi *et al.*, 2015).

C, pour *Arabidopsis* l'OPDA démontre un effet inhibiteur de la germination et un maintien de la dormance. Cet effet est suspecté être régulé par ABI5, un facteur induisant la dormance sous le contrôle de l'ABA qui est induit également par l'OPDA (Dave *et al.*, 2011). L'accumulation de l'OPDA est permise par l'action du répresseur RGL2 et est bloquée par les GA qui causent la dégradation de RGL2 (Dave *et al.*, 2011).

D, le facteur MFT promeut la dormance des graines, il est régulé positivement par l'ABA, par l'OPDA et par RGL2 et régulé négativement par les GA (Dave *et al.*, 2016).

ABA = acide abscissique ; ABI5 = *abscisic acid insensitive5* ; GA = gibbérellines ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; MFT = *mother-of-ft-and-TFL1* ; OPDA = acide *cis*-(+)-12-oxo-phytodiénoïque ; RGL2 = *RGA like 2*.

contrôlent le déterminisme sexuel des fleurs. Chez le WT, les fleurs femelles se retrouvent à la base de l'inflorescence et s'organisent en épi et les fleurs mâles apicales sont en panicule d'épillet. Différents mutants de maïs affectés dans la biosynthèse de JAs, ou avec un catabolisme exagéré, présentent une féminisation des fleurs mâles dû à une absence d'avortement du pistil (Yuan et Zhang, 2015). Le mutant du gène *tasselseed1*, l'homologue de LOX2 d'*Arabidopsis*, est déficient en JAs et présente uniquement des fleurs femelles (Acosta et al., 2009). (Les fleurs à devenir mâle chez le mutant ne présentent plus un avortement du pistil et ne développent plus d'étamines, ce qui démontre que les JAs sont impliqués dans le développement des étamines et la suppression de la biogénèse du pistil (Acosta et al., 2009; Yan et al., 2012).) Ces résultats soulignent le caractère essentiel de la signalisation JA dans la reproduction, ainsi que la diversité des processus sexuels régulés selon les espèces.

3.3.3. Le développement de la graine

La graine est un organe végétal chez lequel un rôle des JAs a été peu étudié. La maturation et la germination de la graine sont régulées par diverses balances hormonales, en particulier la balance ABA/GA (Gutierrez et al., 2007; Preston et al., 2009; Rajjou et al., 2012). L'ABA promeut la maturation et le développement de l'embryon ainsi que la dormance, à l'inverse les GAs répriment la maturation et favorisent la germination (Figure 1.25A) (Gutierrez et al., 2007; Rajjou et al., 2012). Depuis une dizaine d'année plusieurs études montrent un potentiel rôle des JAs dans la biologie de la graine. Chez la tomate le mutant de perception *jai1*, l'homologue de COI1 d'*Arabidopsis*, montre une stérilité femelle due à un défaut du contrôle de la maturation des graines (Li et al., 2004). Un mutant de tomate de la biosynthèse des JAs a par ailleurs une mort cellulaire programmée de l'embryon plus importante qu'une plante sauvage (Goetz et al., 2012). Ceci démontre que les JAs participent à la maturation des graines et de l'embryon et diminuent les risques d'avortements (Figure 1.25B). Néanmoins il n'est pas clair si la signalisation menant à ces effets est conduite uniquement par le JA-Ile ou aussi par l'OPDA (Goetz et al., 2012; Scalschi et al., 2015; Huang et al., 2017). En effet une plante ne produisant aucun JAs montre un développement anormal des embryons là où un mutant produisant uniquement de l'OPDA révèle un développement embryonnaire similaire au sauvage (Figure 1.25B) (Goetz et al., 2012). A l'inverse, une autre étude où un mutant de *silencing* d'*OPR3* qui produit que de l'OPDA montre une réduction de la quantité de graines viables produites, signifiant que la signalisation JA-Ile intervient pour la viabilité des graines (Figure 1.25B) (Scalschi et al., 2015). En définitive les JAs sont nécessaires pour une maturation optimale des graines, mais l'implication de l'OPDA et/ou du JA-Ile ainsi que leur(s) rôle(s) nécessite des recherches supplémentaires (Figure 1.25B) (Huang et al., 2017).

Au-delà de la maturation les JAs jouent également un rôle dans le contrôle de l'inhibition de la germination des graines. Le mutant du transporteur *cts* d'*Arabidopsis* montre une suraccumulation de l'OPDA dans les graines, mais aussi du JA et du JA-Ile, et un retard de germination (Figure 1.25C) (Dave et al., 2011). L'analyse du double mutant *cts.opr3* qui ne peut produire que l'OPDA montre toujours ce retard de germination, signifiant que c'est l'OPDA plus que le JA/JA-Ile qui porte la fonction de signalisation de répression de la germination (Figure 1.25C) (Dave et al., 2011). L'action de l'OPDA est agoniste avec celle de l'ABA et antagoniste de celle des GA. L'ABA est l'hormone majeure de maintien de la dormance et de répression de la germination, dont un FT essentiel à sa signalisation, ABI5, est fortement induit et accumuler par un traitement OPDA (Figure 1.25C) (Dave et al., 2011). L'accumulation d'OPDA dans les graines nécessite l'action du répresseur DELLA, *RGA LIKE 2* (**RGL2**), qui est dégradé par les GA au moment de la germination pour atténuer l'effet répresseur de l'OPDA et en aval celui de l'ABA (Figure 1.25C) (Dave et al., 2016). De plus, l'OPDA, l'ABA et RGL2 agissent de concert et régulent positivement le FT qui favorise la dormance *MOTHER-OF-FT-AND-TFL1* (**MFT**) démontrant que l'OPDA réprime la germination en favorisant le maintien de la dormance (Figure 1.25D) (Dave et al., 2016).

Comme pour la reproduction, l'action des JAs sur la graine peut être diversifiée voir opposée selon l'espèce. Chez *Triticum aestivum* (blé) ils ne répriment pas la germination mais au contraire l'induisent, des graines traités au MeJA vont montrer une germination précoce par rapport au sauvage (Jacobsen et al., 2013). Il a été montré qu'après la stratification des graines de blé, il y a une accumulation de JA induisant la répression de deux gènes essentiels pour la biosynthèse de l'ABA ainsi que l'activation d'un gène de sa dégradation (Jacobsen et al., 2013; Xu et al., 2016). Cela résulte en une diminution des quantités d'ABA et donc de son effet de maintien de la dormance des graines (Xu et al., 2016). En résumé plusieurs résultats montrent des rôles des JAs dans la biologie de la graine, mais selon l'étape, la maturation ou la germination, et l'espèce considérée ce ne sont pas les mêmes molécules qui sont impliqués et le précurseur OPDA montre un rôle prédominant. Cela signifie que le métabolisme des JAs dans les graines est essentiel et doit probablement être finement régulé.

3.3.4. Autres impacts développementaux et interactions biotiques

Les JAs ont également une fonction dans d'autres processus développementaux des plantes (Wasternack et Hause, 2013; Huang et al., 2017). Ils participent à l'initiation de la formation des trichomes en activant le FT GLABRA3 par dégradation des JAZ qui le répriment (Yoshida et al., 2009; Qi et al., 2011). Les JAs agissent mutuellement et en synergie avec les GAs dont les répresseurs DELLA inhibent également le complexe formé avec GLABRA3 permettant l'initiation du développement des trichomes (Qi et al., 2014). La formation des trichomes est

partiellement régulée par la signalisation JAs car ils représentent un moyen de résistance contre les herbivores, ils sont le siège de la synthèse de plusieurs familles des molécules à rôles défensifs comme des alcaloïdes ou des terpénoïdes par exemple (Wasternack et Hause, 2013). Les JAs ont aussi un effet signalétique pour induire la sénescence chez plusieurs espèces (Wasternack et Hause, 2013). Les JAs répriment la Rubisco activase, favorisant un jaunissement des feuilles et une diminution de l'accumulation de la chlorophylle, deux « symptômes » de la sénescence (Shan et al., 2011). Ces réponses font intervenir l'ET qui induit aussi l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme de la chlorophylle (Zhang et al., 2016c; Huang et al., 2017). Il existe encore de nombreux processus biologiques dans lesquels des études démontrent que les JAs ont un rôle mineur, en synergie avec d'autres hormones, tel que les mouvements d'ouverture et de fermeture des stomates, le gravitropisme, l'allongement de l'hypocotyle, le remodellement de la paroi cellulaire post stress... (Wasternack et Hause, 2013; Huang et al., 2017; Mielke et Gasperini, 2019).

Les JAs intervient également dans l'élaboration de plusieurs interactions biotiques entre la plante et divers microorganismes ou insectes afin de favoriser son cycle de vie (Wasternack et Hause, 2013). La mise en place des mycorhizes arbusculaires (**AM**), essentielles pour la captation des éléments minéraux, est basée sur la symbiose entre les racines végétales et un champignon et est favorisé par la signalisation JAs. Par exemple un traitement de JA sur des tomates révèle une accroissement de la formation d'AM (Leon-Morcillo et al., 2012; Wasternack et Hause, 2013). Un effet similaire des JAs est retrouvé pour la formation des nodules, essentiels pour la captation de l'azote atmosphérique, qui correspondent à la symbiose entre des bactéries et les racines de Fabacées. Comme pour les AM, un traitement JA induit l'expression des gènes *nod* nécessaire à la nodulation (Mabood et al., 2006) mais au niveau du JA endogène il n'est pas observé de différence d'accumulation entre des plants de Luzerne avec ou sans nodules (Zdyb et al., 2011). Les mycorhizes et les nodules étant des associations plantes – microorganismes, il est possible que leur mise en place régulée par les JAs soit dû à l'évolution d'un mécanisme de défense contre ces microorganismes vers un mécanisme de symbiose.

L'ensemble des rôles des JAs démontre qu'au cours de l'évolution a eu lieu une grande diversification des fonctions des JAs. Bien que leurs rôles dans la défense soient majeurs, d'autres fonctions de la signalisation JAs au sein du développement de la plante peuvent être vitales. La déficience de la synthèse ou de la perception des JAs peut entraîner des conséquences néfastes à la plante. Mais à l'inverse une synthèse et/ou une signalisation excessives peut également être préjudiciables, suggérant l'importance d'une régulation optimale de la perception et du métabolisme des JAs.

4. Régulation et inactivation des jasmonates

4.1. La régulation

Les réponses JAs dépendantes sont efficaces si leur synthèse et la signalisation sont contrôlées parfaitement dans le temps, l'espace, et dans leur amplitude. Comme les JAs permettent des réponses à plusieurs situations physiologiques, qu'elles soient défensives ou développementales, ça signifie que seule une partie du panel de réponses régulées par les JAs doit être induit en réponse à un stimulus donné. (Wasternack et Feussner, 2017; Wasternack et Strnad, 2018). Cela signifie qu'une même quantité d'hormone induira des réponses différentes en fonction des organes et des stimuli, par exemple la période de floraison pour les fleurs doit être un stimulus qui, au niveau des réponses JAs dépendantes, induit l'allongement des étamines et non pas la synthèse de composés défensifs. Pour permettre les réponses optimales, adaptées à chaque situation physiologique, plusieurs processus vont permettre de réguler la biosynthèse de l'hormone, afin de produire la quantité nécessaire pour une amplitude adéquate des réponses. D'autre part la signalisation, c'est-à-dire la dépression et l'induction des réponses JA-Ile dépendantes, est elle-même également régulée par plusieurs mécanismes de façon que seules les réponses au stimulus soient induites.

Cependant même en absence de stimulus, un niveau basal de JAs est mesuré dans les plantes. Par exemple l'étude sur la caractérisation de PLA1 a démontré une accumulation basale de JA chez *Arabidopsis* (Yang et al., 2007) et d'autres recherches ont montré plus précisément cette accumulation dans des tissus foliaires non blessés et non infectés (Hyun et al., 2008; Rodríguez et al., 2010; Gan et al., 2014). Ces résultats confortent ceux qui démontrent que les gènes de biosynthèse des JAs ont également une expression basale en absence de stimulus comme AOS ou OPR3 (Chung et al., 2008; Koo et al., 2011). Bien que plus faible par rapport à leur expression post-stimulus, cette expression est suffisante pour permettre la synthèse basale de JAs. Notamment d'OPDA et de dnOPDA dont les formes estérifiées aux galactolipides, les arabidopsides, s'accumulent chez *Arabidopsis* en absence de stimulus (Stelmach et al., 2001). La présence de JA basal dans les plantes suppose qu'en absence de stress il est également possible de retrouver certains dérivés du JA qui pourraient avoir une action biologique dans d'autres organes (Figure 1.9) (Miersch et al., 2008). *JAR1* présente une expression basale et de façon concordante, une faible quantité de JA-Ile est détectée en absence de stimuli (Suza et Staswick, 2008; Qiu et al., 2012). Des acteurs de la signalisation JA-Ile tel que *MYC2* et certains *JAZ* montrent également une expression basale (Chung et al., 2008). L'ensemble de ces données démontre qu'il existe une biosynthèse basale du JA-Ile, et possiblement une signalisation basale associée. Tout comme la biosynthèse et

la signalisation induite, la biosynthèse et la supposée signalisation basale doivent disposer de mécanismes de régulations.

4.1.1. Régulation de la biosynthèse du JA-Ile

4.1.1.1. Régulation de la biosynthèse basale

Les mécanismes de régulation de la biosynthèse des JAs ont principalement été étudiés et définis par suite d'un stimulus induisant les JAs, peu des données existent sur la régulation de la biosynthèse basale bien que quelques pistes sur des éléments de régulation se trouvent. Par exemple la caractérisation du mutant *plai* révèle une accumulation moindre de JA basal et donc l'acyl hydrolase PLAI est impliquée dans la biosynthèse de JA basal, par libération des OPDA estérifiés en arabidopsides (Yang et al., 2007). En revanche *plai* ne montre pas une accumulation modifiée de JA suite à un stimulus infection, bien que le mutant présente des symptômes plus important traduisant une plus grande sensibilité au pathogène (Yang et al., 2007). Cette étude prouve que l'action d'une lipase régule la synthèse basale et non la synthèse induite de l'hormone et donc que la régulation de ces deux types de biosynthèses peut utiliser des mécanismes différents. Une étude montrant un résultat approchant est la caractérisation de *DONGLE* (**DGL**), une lipase homologues de DAD1, identifiée comme responsable de la synthèse basale de JA en absence de stimulus (Hyun et al., 2008). Une analyse approfondie ultérieure a montré que, comme PLAI, DGL n'est pas essentielle à la synthèse des JAs en réponse à l'infection ou à la blessure (Ellinger et al., 2010). Une autre recherche a montré que la déficience d'un gène impliqué dans la formation des thylakoïdes, dont les membranes fournissent le précurseur C18:3, induit une suraccumulation basale de ce dernier mais aussi d'OPDA et de JA, et c'est corrélé avec une surexpression de phospholipases (Gan et al., 2014). La synthèse de ses études semblent montrer que la libération du précurseurs C18:3 serait une étape pivot de la régulation de la synthèse basale des JAs, actuellement il n'y a pas de données sur une régulation à d'autres étapes de la voie de biosynthèse en absence de stimuli.

Si toutes ces recherches démontrent une régulation, au niveau du précurseur, sur la synthèse basale de JAs, très peu d'informations existent sur l'existence, et l'effet, d'une signalisation JA-Ile basale. Ces rares informations sont centrées sur l'expression basale des gènes codants les enzymes impliquées dans la biosynthèse des JAs (Yang et al., 2007; Gan et al., 2014). Néanmoins, il est montré qu'une perturbation des flux de Ca^{2+} au niveau des canaux transmembranaires peut résulter en une signalisation JA-Ile basale, le marqueur *VSP2* est surexprimé chez un mutant possédant une telle perturbation (Lenglet et al., 2017). Les travaux de Yang *et al.*, (2017) montrent également que l'expression de *VSP2* diminue drastiquement

chez le mutant altéré dans l'accumulation basale de JA *plai*. Ces résultats signifient que l'hormone peut induire des réponses en absence de stimuli et que la signalisation basale pourrait être active s'il n'y a pas de mécanismes de régulation ou que ceux-ci sont dérégulés (Lenglet et al., 2017). La démonstration de l'existence de tels mécanismes nécessite de nouvelles recherches.

4.1.1.2. Régulation de la biosynthèse induite

La perception des éliciteurs qui induisent la synthèse des JAs représente chronologiquement le premier point de contrôle influant leur biosynthèse et celle de l'hormone JA-Ile (Huffaker et al., 2013; Koo, 2017). Ces éliciteurs entraînent une augmentation du flux de calcium qui intervient comme messenger secondaire en réponse à divers stress biotiques et abiotiques (Dodd et al., 2010) et dont plusieurs études révèlent que ce flux impacte la biosynthèse des JAs (Figure 1.15) (Wasternack et Hause, 2013; Koo, 2017). Chez *Nicotiana attenuata* le flux de Ca^{2+} active deux *calcium-dependent protein kinases* (**CDPK**) qui limitent l'accumulation du JA et du JA-Ile (Yang et al., 2012) alors que chez *Arabidopsis* il est impliqué dans l'activité de l'enzyme LOX2. Le flux de Ca^{2+} permet la fixation de LOX2 aux membranes via son domaine *Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin* (**PLAT**) ce qui est essentiel pour l'activité de l'enzyme (Newcomer et Brash, 2015). En plus de l'activité, le Ca^{2+} influe également l'expression de LOX2 (Bonaventure et al., 2007) et des autres gènes codants pour les enzymes impliqués dans la biosynthèse des JAs via le complexe JJW et la dégradation de JAV1 (Figure 1.15) (Yan et al., 2018a). L'augmentation du flux de Ca^{2+} est perçue par la calmoduline qui va interagir avec JAV1 et entraîner sa phosphorylation calmoduline-dépendante et sa dissociation du complexe JAZ8-WRKY51. JAV1 est alors exporté dans le cytoplasme permettant sa polyubiquitination et sa dégradation, dé-reprimant ainsi les gènes de biosynthèse des JAs (Figure 1.15) (Campos et al., 2014; Yan et al., 2018a). Par ailleurs la déficience dans les flux de Ca^{2+} est associée, suite à l'agression par l'herbivore *Spodoptera litura* (Noctuelle rayée), à une accumulation moindre de JA-Ile et à une réduction de l'expression des défenses anti-herbivores JAs dépendantes (Meena et al., 2019). La synthèse de JAs est donc au moins partiellement initiée par ce mécanisme calcium-dépendant, mais elle est aussi dépendante de la disponibilité du substrat C18:3 LeA. Un traitement de plants de riz avec le précurseur LeA entraîne sa conversion en OPDA, JA puis JA-Ile (Christeller et Galis, 2014). Cependant, lorsque qu'*Arabidopsis* est traité à la COR, il est observé une augmentation de l'expression des gènes de biosynthèse des JAs mais sans augmentation des quantités des composés, signifiant qu'il existe par ailleurs un mécanisme mal décrit qui régule la disponibilité des acides gras précurseurs des JAs (Koo et al., 2009). Il est probable que ce mécanisme impact l'activité ou la disponibilité des lipases qui permettent de mobiliser ces précurseurs, de nombreuses études suggèrent que leur implications dans la biosynthèse des

JAs a une action spécifique dépendant du stimulus et de l'organe, démontrant qu'il existe des mécanismes de régulations de ces enzymes (Wasternack et Song, 2017). Ceci contredit donc la boucle de rétrocontrôle positif du JA-Ile qui est souvent admise, mais contestée par le fait que même si l'hormone induit l'expression des gènes de sa propre biosynthèse aucune suraccumulation des JAs n'est mesurée par la suite d'un stimulus (Scholz et al., 2015).

Un deuxième nœud de régulation de la biosynthèse en JA et JA-Ile se situe au niveau de la compétition au substrat entre les activités AOS, HPL et DES pour la métabolisation des HPO. En particulier pour la métabolisation du 13-HPOT ce qui régule l'accumulation du 12,13-EOT et la formation du JA en aval (Figure 1.2) (Feussner et Wasternack, 2002; Heitz et al., 2019). Les niveaux d'activités respectifs de ces enzymes vont impacter le flux vers des produits de clivage (branche HPL), des divinyl éthers (branche des DES) ou des JAs (branche AOS) (Figure 1.2) (Feussner et Wasternack, 2002; Heitz et al., 2019).

L'activité des enzymes AOS, AOC et LOX définit un troisième niveau de régulation de la synthèse des JAs et peut être modifiée par plusieurs mécanismes. Premièrement il y a une spécificité tissulaire d'expression de ces enzymes, notamment par la localisation plastidiale du précurseur (Pollmann et al., 2019). Par exemple chez la tomate il a été démontré qu'au niveau des fleurs AOC est transcrit entre autres dans le pistil mais pas dans les étamines (Hause et al., 2000; Stenzel et al., 2008) ce qui est cohérent avec le rôle des JAs dans la fertilité femelle des Solanacées (Li et al., 2004). De plus il est connu une dynamique temporelle de leur expression, chez *Arabidopsis* LOX, AOS et AOC montrent une accumulation enzymatique plus abondante chez les feuilles matures par rapport aux feuilles en cours de développement (Stenzel et al., 2003). Enfin les enzymes AOC chez *Arabidopsis* et OPR3 chez la tomate peuvent former des dimères ce qui influe sur leur fonction (Breithaupt et al., 2006; Stenzel et al., 2012). La cristallisation d'OPR3 de tomate a démontré que cette enzyme peut s'homodimériser et cela induit une perte de son activité enzymatique *in vitro*; ce mécanisme est supposé être réversible *in vivo* et nécessiter une phosphorylation de l'enzyme (Breithaupt et al., 2006). Les quatre AOC d'*Arabidopsis* sont capables d'homo et d'hétérodimérisation avec chacune des autres AOC, ces dimères auraient un impact sur la régulation temporelle et spatiale de la formation des JAs (Stenzel et al., 2012).

Le dernier mode de régulation qui impact la biosynthèse de JA-Ile est la métabolisation du JA en d'autres composés ce qui va modifier son accumulation et donc la proportion disponible à la conjugaison à l'Ile. Comme décrit précédemment la pro-hormone JA peut être métabolisée en un panel de composés (Figure 1.9) (Wasternack et Strnad, 2016) et selon le patron d'activité spatio-temporelle des différentes enzymes impliquées cela impactera l'accumulation du JA, donc la quantité de JA qui pourra être lié à l'Ile (Wasternack et Hause, 2013;

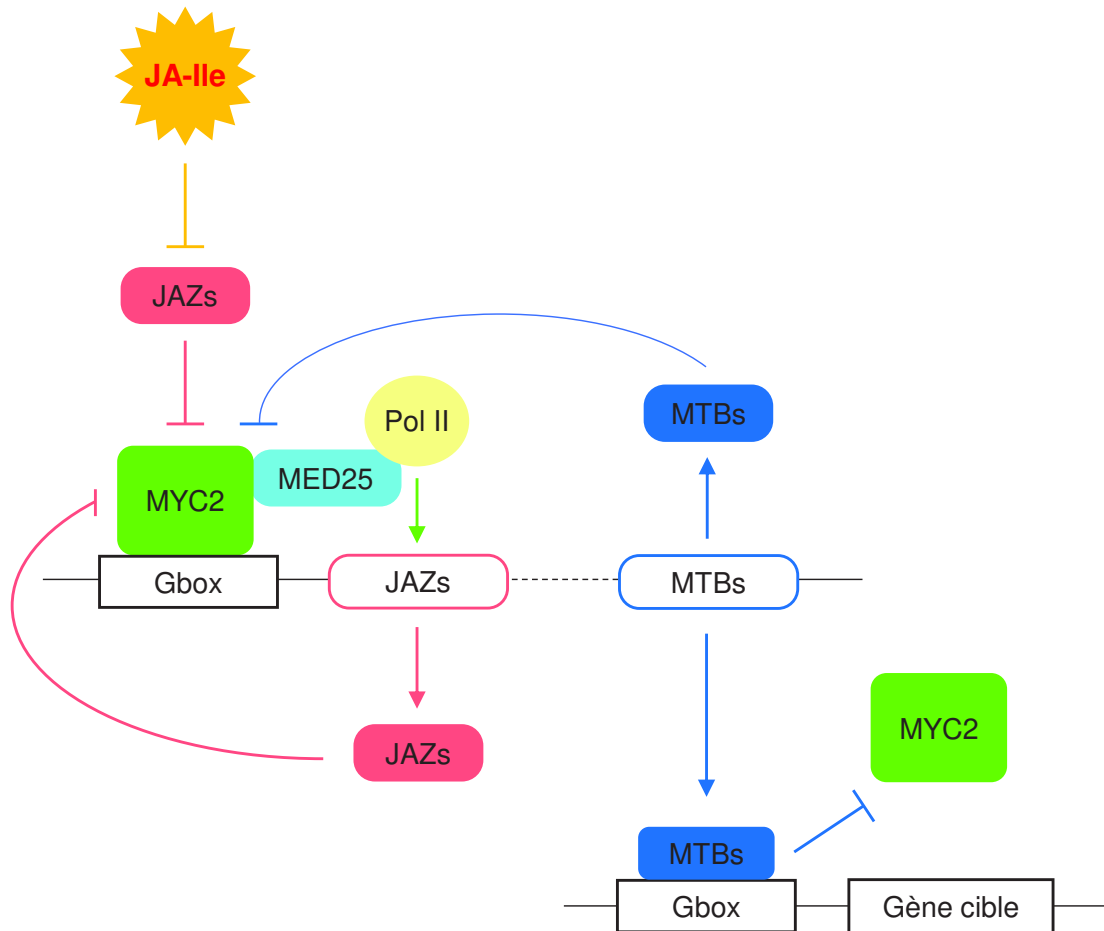


Figure 1.26. Le rétrocontrôle négatif médié par les JAZ et MTB.

Après un stimulus l'expression des *JAZ* chez *Arabidopsis* et leurs homologues *MTB* chez la tomate est induite suite à la dérégulation de *MYC2* par *JA-Ile* (Chini *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2019). Chacun définit une boucle de rétrocontrôle négatif de la signalisation car les *JAZ/MTB* nouvellement formés vont réprimer les facteurs de transcriptions cibles du *JA-Ile* en se fixant sur les promoteurs cibles de *MYC2* par exemple (Chini *et al.*, 2007 ; Chini *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2019). De plus chez la tomate il est démontré que les *MTB* vont déstabiliser le complexe *MYC2-MED25*, bloquant le recrutement de la polymérase II (Liu *et al.*, 2019).

JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; *JAZ* = *jasmonate-zim domain* ; *MED25* = *MEDIATOR25* ; *MTB* = *myc2-targeted bHLH1* ; *Pol II* = ARN Polymérase II.

Wasternack et Strnad, 2016, 2019). De plus, l'épimérisation du JA-Ile de la forme (+) vers la forme (-) qui est induite par un changement de pH pourrait être un mécanisme pour réguler l'activité hormonale (Figure 1.5) (Sheard et al., 2010) car seul l'isomère (+)-7-iso-JA-Ile est efficient pour l'assemblage du corécepteur tripartite, le (-)-7-iso-JA-Ile est inactif (Fonseca et al., 2009). Associés à ces différents processus qui régulent la synthèse et l'accumulation de l'hormone active JA-Ile, on trouve de nombreux mécanismes qui permettent de moduler l'activité de signalisation de JA-Ile. Le plus souvent l'activation de la signalisation est mesurée par l'augmentation de l'accumulation de l'hormone, lorsque la biosynthèse excède le catabolisme, et par l'induction des gènes de réponses JAs dépendant à la suite d'un stimulus.

4.1.2. Régulation de la signalisation JA-Ile dépendante

4.1.2.1. Les mécanismes de rétrocontrôle

Parmi les mécanismes régulant la signalisation JA-Ile, l'un des mieux caractérisé est celui des boucles de rétrocontrôle, en particulier le rétrocontrôle négatif médié par les répresseurs JAZ et JAM (Figure 1.26). En absence de stimulus, ces protéines répriment entre autres les FT MYC ; or l'induction de leur expression est elle-même dépendante des MYC (Figure 1.26) (Chini et al., 2007; Sasaki-Sekimoto et al., 2013; Chini et al., 2016), ce qui démontre que le stimulus induit non seulement les réponses JAs dépendantes, mais également les systèmes de répression qui vont atténuer ces réponses au niveau transcriptionnel. Récemment un second mode de rétrocontrôle négatif a été identifié chez la tomate : MYC2 permet d'activer l'expression de trois FT appelés les *MYC2-TARGETED BHLH1* (**MTB1**), MTB2 et MTB3 dont la fonction est d'altérer la formation du complexe MYC2-MED25 ce qui bloque la transcription des gènes cibles de MYC2 (Figure 1.26) (Liu et al., 2019). Ces MTB correspondent aux homologues des JAM d'*Arabidopsis*, ils peuvent donc se lier aux FT ciblent, définissant un premier mode de régulation négatif de la transcription. Les MTB font également de la compétition à MYC2 sur ses promoteurs cibles ce qui constitue un deuxième mode de régulation négatif de la transcription pour les MTB (Figure 1.26) (Liu et al., 2019). Les répresseurs JAM/MTB et JAZ définissent deux boucles de rétrocontrôle négatif qui ont pour fonction de terminer la signalisation JAs dépendante pour limiter l'effet négatif que pourrait avoir une expression constitutive des réponses.

La voie JAs semble disposer également d'une boucle de rétrocontrôle positive car la plupart des gènes impliqué dans la biosynthèse des JAs sont également régulés par MYC2 (Figure 1.18) (Hickman et al., 2017), néanmoins aucune démonstration d'une augmentation de l'accumulation des JAs suite à un stimulus, due à l'induction des gènes de biosynthèse, n'a pu être avancée (Scholz et al., 2015). On peut supposer que cette boucle de rétrocontrôle positive

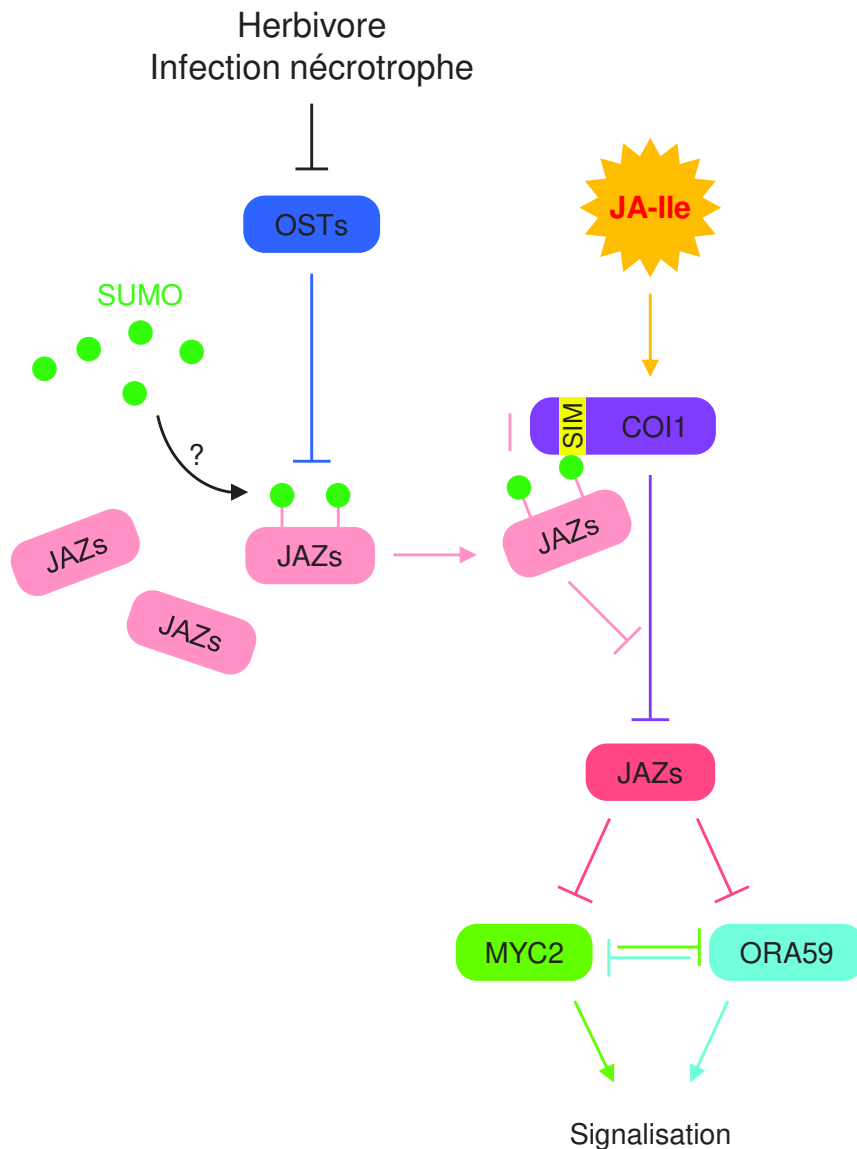


Figure 1.27. La SUMOylation réprimant la signalisation JA-Ile.

Les JAZs nouvellement produits peuvent être conjugués aux peptides SUMO ce qui leur permet d'interagir avec le domaine SIM de COI1, inhibant son action (Srivastava *et al.*, 2018). L'enzyme catalysant cette SUMOylation est inconnue. L'infection nécrotrophe et l'herbivorie activent la dégradation des OST, des protéases des conjugués SUMO, stoppant leur action et favorisant ainsi la répression SUMO-JAZ pour terminer les réponses suite au stress (Srivastava *et al.*, 2018).

COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; ORA59 = *octadecanoid-responsive arabidopsis ap2/erf59* ; OST = *overly tolerant to salt* ; SIM = *SUMO interacting motifs* ; SUMO = *Small Ubiquitin-like Modifier*.

pourrait permettre des réponses JAs dépendantes efficaces malgré les boucles de rétrocontrôles négatives, dont les acteurs JAZ et JAM sont exprimés dans les premières vagues transcriptionnelles induites suite à la dérépression JA-Ile dépendante (Hickman et al., 2017; Liu et al., 2019). Cependant les interactions entre les boucles de rétrocontrôle positives et négatives sont encore peu connues et des études supplémentaires sont nécessaires pour définir leurs effets combinés sur la signalisation JAs.

4.1.2.2. La régulation des acteurs de la signalisation

Cette régulation concerne les acteurs du corécepteur tripartite tel que les répresseurs ou COI1, ainsi que les FT cibles. La stabilité de COI1 impacte celle du corécepteur soluble, sa liaison au complexe SCF^{COI1} est nécessaire pour éviter sa dégradation par le protéasome 26S (Yan et al., 2013) et permettre une formation stable du corécepteur tripartite. De plus COI1 peut être inactivée par les protéines *Small Ubiquitin-like Modifier* (**SUMO**) conjugué à des JAZ (Figure 1.27), l'enzyme permettant la sumoylation des JAZ n'est pas connue (Srivastava et al., 2018). COI1 possède un domaine nommé *SUMO interacting motif* (**SIM**) sur lequel peut se fixer la protéine SUMO, du conjugué SUMO-JAZ, ce qui inhibe l'activité de COI1, bloque la dégradation des JAZ et entraîne une augmentation de leur abondance suite à un stimulus (Figure 1.27) (Srivastava et al., 2018). Ce processus de régulation s'associe à celui du rétrocontrôle négatif de la néosynthèse des JAZ car la SUMOylation semble opérer uniquement suite à un stimulus et sur les JAZ nouvellement formés (Srivastava et al., 2018).

Pour les répresseurs JAZ, le contrôle de leur fonction peut se faire de plusieurs façons. Tout d'abord chaque JAZ présente une localisation tissulaire et un patron d'expression et d'induction propre. Dans les feuilles d'*Arabidopsis*, *JAZ6* et *JAZ9* ont une expression plus forte par rapport à *JAZ1* par exemple en absence de stimulus mais à la suite d'une blessure c'est *JAZ1* qui est le plus fortement induit (Chung et al., 2008). Ensuite chaque JAZ démontre une affinité différente pour leurs cibles, chez *Arabidopsis* *JAZ2* et *JAZ10* ont une constante de dissociation du corécepteur COI1-JA-Ile faible ce qui indique une interaction forte et une haute affinité par rapport aux autres JAZ (Takaoka et al., 2019). A l'inverse *JAZ1* et *JAZ5* présentent une affinité faible avec COI1-JA-Ile, nécessitant une accumulation plus importante de JA-Ile pour promouvoir la formation de ce corécepteur tripartite (Takaoka et al., 2019). Il est possible que ces JAZ permettent de maintenir la répression des cibles en absence de stimulus, lorsque la concentration basale de JA-Ile est insuffisante pour provoquer l'assemblage de COI1-JA-Ile-JAZ1/5. Les dimérisations des JAZ peuvent également limiter les interactions avec leurs cibles et/ou leur cofacteurs en diminuant l'accessibilité aux domaines de liaisons Jas et ZIM respectivement (Melotto et al., 2008; Pauwels et al., 2010). L'interaction des JAZ avec les JAM résulte en une diminution de leurs effets répresseurs et correspond probablement à une forme

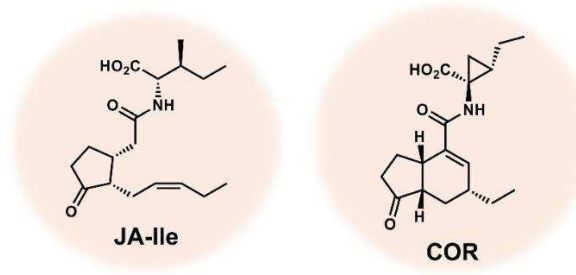
de séquestration (Song et al., 2013a; Sasaki-Sekimoto et al., 2014). Enfin, les divergences des séquences JAZ et/ou structures de leurs domaines protéiques, ou l'épissage alternatif sont à l'origine de particularités fonctionnelles. Par exemple parmi les treize JAZ d'*Arabidopsis*, JAZ7 et JAZ8 possèdent un domaine Jas divergeant qui ne permet pas la liaison à COI1 et empêche leur dégradation induite par COI1-JA-Ile, ce qui résulte en une stabilisation du répresseur (Chini et al., 2016). De façon similaire, plusieurs JAZ génèrent des variants d'épissages, tels JAZ2, 3 et 10 qui sont stables et qui ne possèdent pas le domaine Jas ou une version tronquée stabilisant la répression (Chung et Howe, 2009; Chung et al., 2010). L'ensemble de ces données prouve que les répresseurs représentent le nœud de la régulation de la signalisation JAs dépendante et la combinaison des différents paramètres impliqués (la localisation tissulaire, le patron d'expression, les capacités d'interactions, la divergence évolutive et l'épissage alternatif) démontre une forte complexité et une très large gamme de niveaux de régulations potentielles. Cela a d'autant plus d'impact sur la plante que les JAZ représentent les régulateurs centraux non seulement pour la signalisation JAs, mais aussi des *crosstalk* avec les autres hormones végétales.

Les derniers acteurs de la signalisation étant régulés sont les FT cibles eux-mêmes. Par exemple le FT régulateur central des réponses induites par les JAs, MYC2, peut subir des modifications post-traductionnelles qui impactent son activité, notamment sa phosphorylation qui cause la protéolyse de la protéine (Zhai et al., 2013). MYC2 est polyubiquitiné par la *PLANT U-BOX PROTEIN10 (PUB10)* (Jung et al., 2015) ou le complexe E3 ubiquitine ligase CUL3 (Chico et al., 2020) et dégradé de façon protéasome dépendante ce qui va réguler les réponses de façon stimulus dépendante (Zhai et al., 2013). En effet MYC2 réprime le FT ORA59 et la branche anti-nécrotrophes associée ; la dégradation de MYC2 permet donc d'activer les réponses anti-nécrotrophes (Figure 1.23) (Kazan et Manners, 2013; Zhai et al., 2013). A l'inverse, comme MYC2 active les FT ANAC, sa dégradation réprime les réponses anti-herbivores là où sa stabilisation les favorise (Figure 1.23) (Kazan et Manners, 2013; Zhai et al., 2013). Ceci démontre qu'un même mécanisme peut avoir des effets antagonistes dépendants du stimulus perçu et probablement aussi des autres processus de régulation. La caractérisation des différents acteurs qui régulent la signalisation JAs a ouvert la voie à la production d'analogues de synthèse avec des effets spécifiques sur l'induction des réponses JAs dépendantes.

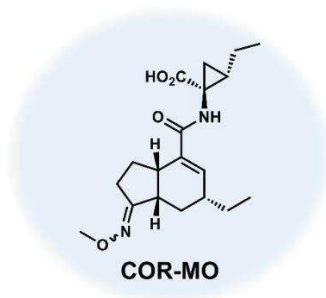
4.1.2.3. La chimie biologique pour comprendre la signalisation JA-Ile

Le domaine de la chimie biologique a permis de développer plusieurs molécules en laboratoire qui modifient la signalisation JA-Ile. Le plus souvent se sont des analogues structuraux de composés naturels comme par exemple le CRL qui est un analogue de la COR (Figure 1.11).

agonist



antagonist



selective agonist

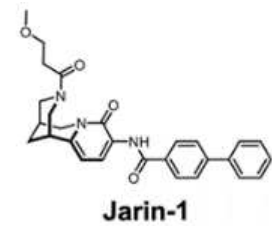
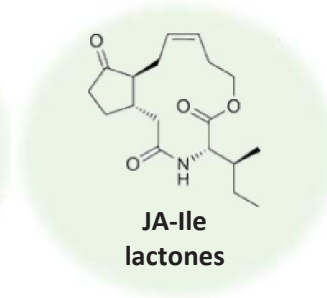
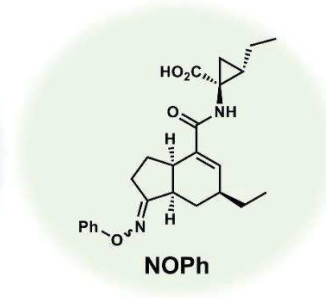


Figure 1.28. Analogues structuraux chimiques du JA-Ile et de la COR.

Le JA-Ile et la COR sont deux molécules naturelles capables de promouvoir l'assemblage du corécepteur tripartite avec COI1 et les JAZ. Depuis quelques années plusieurs molécules sont synthétisées en laboratoire et correspondent à des analogues structuraux du JA-Ile ou de la COR et qui ont la capacité de modifier la signalisation COI-JAZ dépendante (Ueda *et al.*, 2020). Certaines molécules sont des antagonistes et impactent négativement la signalisation telle que la COR-MO, d'autres molécules permettent en revanche d'induire un panel spécifique des réponses COI1 dépendantes comme les agonistes NOPh et JA-Ile lactones (Jimenez-Aleman *et al.*, 2015 ; Ueda *et al.*, 2020). Il existe également des molécules qui, sans être un analogue structural du JA-Ile ou de la COR, impact la signalisation COI1 comme l'inhibiteur chimique jarin-1 qui inhibe JAR1 (Meesters *et al.*, 2014).

Adaptée de Jimenez-Aleman *et al.*, 2015 et Ueda *et al.*, 2020.

COR = coronatine ; COR-MO = coronatine-O-méthoxyoxime ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; NOPh = O-phényl oxime.

Ces dernières années il a été développé des molécules qui peuvent agir comme agonistes ou comme antagonistes de la signalisation JA-Ile (Ueda et al., 2020). Le développement de ces molécules a un intérêt pour aider à la découverte et à la caractérisation des différents mécanismes et acteurs de la régulation, en complément des études génétiques, mais elles montrent également un intérêt dans le domaine de la recherche appliquée (Ueda et al., 2020). C'est par exemple le cas de la coronatine-O-méthyl oxime (**COR-MO**) qui est un dérivé synthétique de la coronatine (Figure 1.28) et qui peut former le complexe COI1-COR-MO (Monte et al., 2014). Cette molécule est un antagoniste de la COR et du JA-Ile car elle va considérablement réduire la capacité de liaison des JAZ à COI1, elle agit donc par compétition et bloque ainsi la dérépression des FT et la signalisation (Monte et al., 2014). L'application de COR-MO sur les plantes permet de réduire l'action de la phytotoxine COR sécrétée par les bactéries, ce qui limite leur capacité infectieuse (Monte et al., 2014). Traiter des cultures avec cet antagoniste pourrait favoriser la résistance des plantes aux pathogènes biotrophes qui induisent la voie JAs pour affaiblir la voie SA (Figure 1.23) (Geng et al., 2014). Parmi les molécules qui présentent un effet antagoniste de la signalisation on retrouve l'inhibiteur chimique jarin-1, c'est une petite molécule identifiée lors d'un crible d'inhibition des réponses JAs dépendantes (Meesters et al., 2014). Cette molécule altère spécifiquement l'activité de JAR1 bloquant la synthèse du JA-Ile (Meesters et al., 2014).

Le CRL est quant à lui un agoniste de la signalisation, tout comme son dérivé méthylé qui permet aussi d'induire les réponses JAs dépendantes (Schüler et al., 2004; Pluskota et al., 2007). Ces analogues structuraux chimiques régulent un panel de gènes spécifique, bien qu'il soit proche de celui régulé par les JAs (Pluskota et al., 2007). On peut supposer que ces différences sont dues à des interactions distinctes avec la poche de surface d'interaction de COI1. Cette liaison induit le *switch* structural de COI1 pour permettre l'interaction avec les répresseurs, il est donc possible que la surface d'interaction formée à la suite du *switch* affecte différenciellement la stabilité avec certains JAZ. Ceci pourrait expliquer comment des analogues structuraux du JA-Ile régulent un set de gènes propre. Le design de molécules régulant un set ciblé de gènes en réponse à un stimulus ouvre un champ de recherche biotechnologique appliqué pour la création de nouveaux produits avec un potentiel antifongique ou antimicrobien (Kombrink, 2012; Ueda et al., 2020). Par exemple Takaoka et al., (2018) ont développé plusieurs ligands qui sont des stéréoisomères de COR et l'un d'entre eux nommé O-phényl oxime ou **NOPh** (Figure 1.28) permet de lier spécifiquement COI1 à JAZ9 ou JAZ10. Cela active en particulier la voie EIN3 et ERF1/ORA59 induisant donc les réponses de défenses contre les pathogènes nécrotrophes (Figure 1.22) (Takaoka et al., 2018; Ueda et al., 2020). Les plantes traitées sont plus résistantes à l'infection et surtout il n'est pas observé d'inhibition de la croissance. Les auteurs définissent la synthèse d'agoniste du JA-Ile

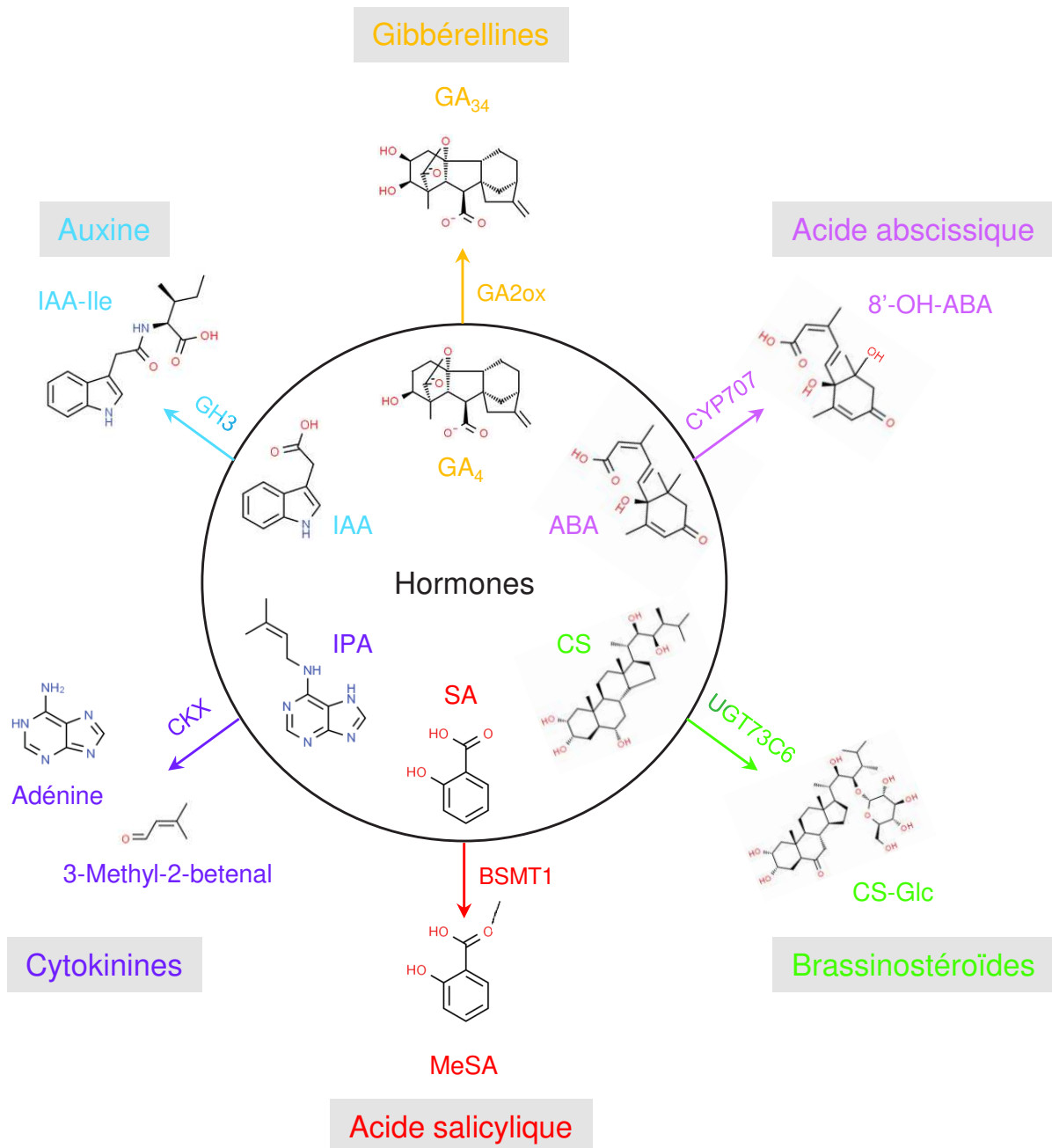


Figure 1.29. Exemple de types de catabolismes des phytohormones.

Le catabolisme phytohormonale se constitue d'une diversité de voies enzymatiques qui par leurs actions diverses permettent d'inactiver la forme hormonale active. L'oxydation est l'une des voies majeures d'inactivation des hormones, elle peut être médiée par des 2-ODD comme pour les GAs (Rieu *et al.*, 2008) ou par des cytochrome P450 tel que pour l'ABA (Kushiro *et al.*, 2004). La conjugaison est une autre forme majeur du catabolisme des hormones, il existe plusieurs type de conjugaison. Par exemple le brassinostéroïde CS peut être conjuguée à un glucose (Husar *et al.*, 2011), c'est une glycosylation. La méthylation est un autre type de conjugaison et elle inactive, par exemple, le SA (Zhang *et al.*, 2017). La conjugaison aux acides amines existe également pour le catabolisme des hormones, notamment pour l'auxine qui peut être conjuguée à l'Ile, mais aussi à Glu, Asp, Met, Trp, Phe, Gly, Gln, Tyr et Val (Zhang et Peer, 2017). Enfin la dégradation de l'hormone active est un autre mécanisme de catabolisme, c'est le cas pour les cytokinines telle l'IPA qui subit un clivage oxydatif, produisant de l'adénine et du 3-méthyle-béténal (Werner *et al.*, 2006).

2-ODD = 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases ; 8'-OH-ABA = acide 8'-hydroxy abscessique ; ABA = acide abscessique ; BSMT1 = benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase 1 ; CS = castasterone ; CS-Glc = castasterone-23-O-glucoside ; CYP707 = cytochrome P450 de la famille 707 ; CKX = cytokinin oxidases/dehydrogenases ; GA = gibbérélline ; GA₂ox = GA₂ oxydases ; GH3 = Gretchen Hagen 3 ; IAA = acide indole-3-acétique ; IAA-Ile = acide indole-3-acétique_isoleucine ; IPA = Isopentenyladenine ; MeSA = méthyl salicylate ; SA = acide salicylique ; UGT73 = UDP-dependent glycosyltransferase de la famille 73.

avec une haute sélectivité d'interactions COI1-JAZ comme des régulateurs chimiques qui découplent l'antagonisme entre la croissance et la défense (Takaoka et al., 2018).

Les JA-Ile lactones (ou macrolactones) sont des molécules chimiques synthétisées en laboratoire qui permettent également de découpler cet antagonisme (Ueda et al., 2020). Elles présentent une liaison entre le carbone ω de la chaîne carbonée de leur moitié JA avec le groupe carboxyle de leur moitié Ile (Figure 1.28) (Jimenez-Aleman et al., 2015; Ueda et al., 2020). Ce sont des agonistes des réponses JA-Ile mais avec une plus grande spécificité de réponses. Traiter *Nicotiana attenuata* avec ces molécules permet l'accumulation COI1-dépendante de la nicotine comme un traitement au MeJA (Jimenez-Aleman et al., 2015, 2017a). Il en résulte un développement et une survie des larves de *Manduca sexta* (Sphinx du tabac) plus faible, traduisant une meilleure résistance (Jimenez-Aleman et al., 2017a). Une étude du traitement de JA-Ile-macrolactone sur *Camellia sinensis* (théier) démontre aussi une meilleure résistance aux larves herbivores d'*Ectropis obliqua* ainsi qu'au champignon nécrotrophe *Colletotrichum camelliae* (Lin et al., 2020). Le point intéressant est que ce traitement aux lactones induit l'activation des défenses mais sans impact négatif sur la croissance, les plantes traitées étant même plus grandes que les plantes non traitées (Jimenez-Aleman et al., 2017a; Ueda et al., 2020). Comparativement, un traitement avec du MeJA cause une réduction de croissance (Jimenez-Aleman et al., 2017a). Si le découplage entre la croissance et la défense induit par les lactones s'obtient également pour d'autres espèces, ces molécules chimiques auraient un très bon potentiel en tant que produit de protection phytosanitaire. De longue date, les effets d'inhibition de croissance et d'induction de senescence (Zhang et Xing, 2008) ont en effet empêché l'utilisation massive de MeJA pour protéger les plantes en agriculture.

4.2. L'inactivation par catabolisme du JA-Ile

Le catabolisme hormonal contribue à l'accumulation adéquate de la bonne quantité d'hormone active en la dégradant au bon moment pour chacun des processus biologiques régulés. Cela concerne toutes les hormones végétales et chacune possède le plus souvent plusieurs voies de catabolisme utilisant divers types de métabolisations enzymatiques et permet de transformer l'hormone active en dérivés inactifs. Cette diversité de voies cataboliques reflète l'importance biologique du processus d'inactivation de ligands hormonaux (Figure 1.29). Les voies de catabolisme du JA-Ile sont une découverte récente car ce n'est qu'en 2007 que le JA-Ile a été découvert comme l'hormone active, reléguant le JA au statut de pro-hormone (Chini et al., 2007). A partir de cette découverte, il devenait nécessaire et opportun de rechercher le catabolisme de l'hormone, ce qui a constitué la thématique de recherche principale de mon directeur de thèse. Les travaux de l'équipe ont fortement contribué à la

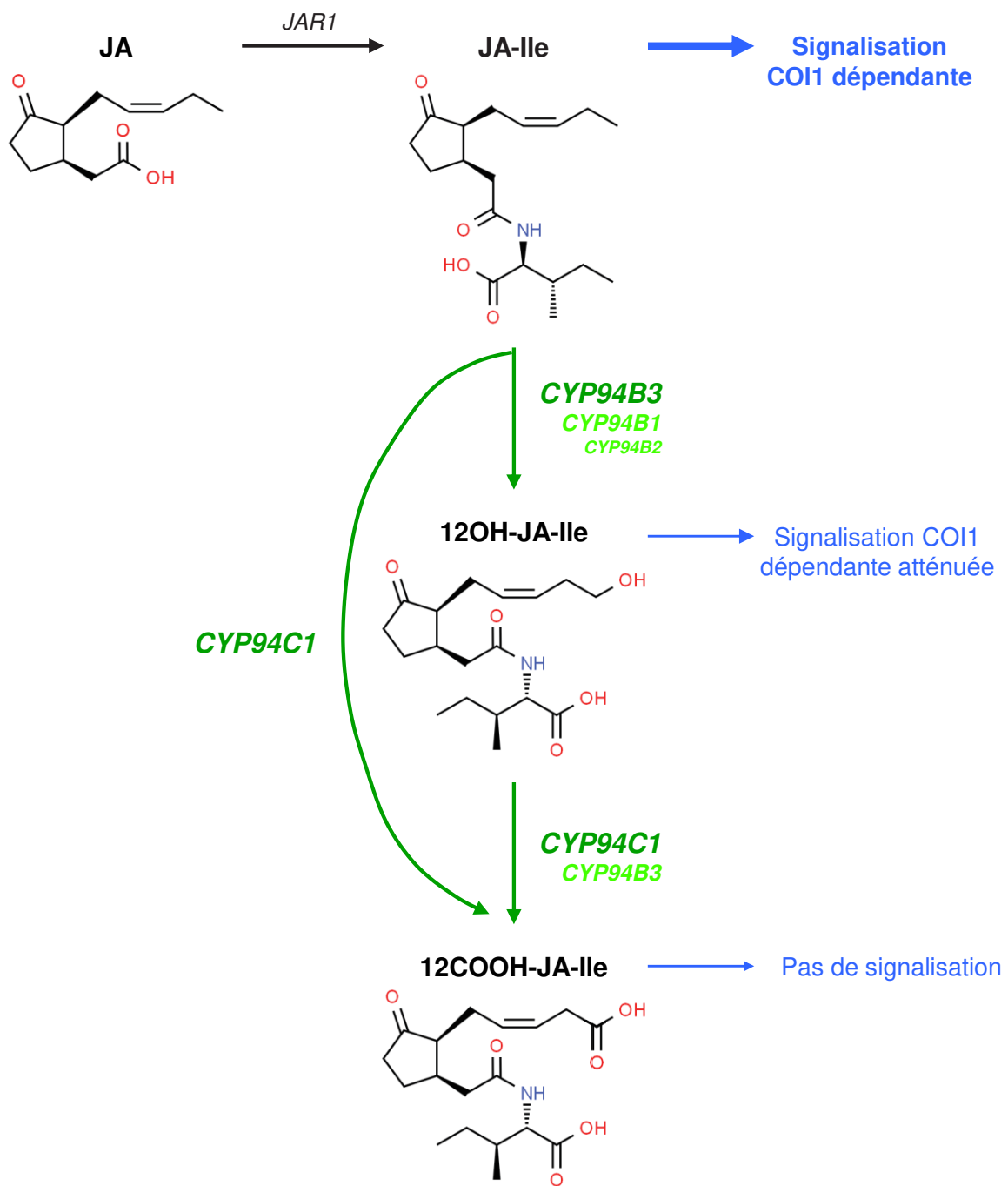


Figure 1.30. L'oxydation du JA-Ile.

La pro-hormone JA est conjugué à l'isoleucine par JAR1 pour former l'hormone active JA-Ile qui induit l'expression des gènes impliqués dans son inactivation par oxydation de façon COI1 dépendante (Heitz *et al.*, 2012). Le JA-Ile subit une première oxydation médiée par CYP94B3 majoritairement, par CYP94B1 minoritairement et de manière négligeable par CYP94B2 ce qui forme du 12OH-JA-Ile partiellement actif capable d'induire la signalisation jasmonates COI1 dépendantes (Kitaoka *et al.*, 2011 ; Koo *et al.*, 2011, 2014 ; Bruckhoff *et al.*, 2016 ; Jimenez-Aleman *et al.*, 2019 ; Poudel *et al.*, 2019 ; Takaoka *et al.*, 2019). Ce composé est ensuite oxydé par CYP94C1 majoritairement et CYP94B3 minoritairement ce qui produit le composé inactif 12COOH-JA-Ile qui est le catabolite à la fois du JA-Ile et du 12OH-JA-Ile. Le 12COOH-JA-Ile peut également se former directement à partir du JA-Ile par CYP94C1 (Heitz *et al.*, 2012).

12COOH-JA-Ile = 12-carboxy-jasmonoyl-L-isoleucine ; 12OH-JA-Ile = 12-hydroxy-jasmonoyl-L-isoleucine ; COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; CYP94 = cytochrome P450 de la famille 94 ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JA = acide (-)-jasmonique ; JAR1 = *jasmonate resistant 1*.

connaissance actuelle du catabolisme du JA-Ile (Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013; Aubert et al., 2015; Heitz et al., 2016, 2019).

4.2.1. Le catabolisme par oxydation

Le première voie catabolique de JA-Ile identifiée est une voie oxydative médiée par des cytochromes P450 (CYP). Les CYP sont des hémoprotéines membranaires du réticulum endoplasmique agissant comme monooxygénases dont la réaction majeure est l'incorporation d'un oxygène sur le substrat (Schuler, 1996; Nelson et Werck-Reichhart, 2011). Les CYP interviennent dans de nombreuses voies métaboliques végétales dont les voies hormonales, autant pour leur synthèse que pour le catabolisme, comme par exemple le CYP707 qui inactive l'ABA (Figure 1.29) (Nambara et Marion-Poll, 2005; Mizutani et Ohta, 2010; Nelson et Werck-Reichhart, 2011; Pinot et Beisson, 2011). Il n'est donc pas surprenant d'avoir identifié que l'oxydation du JA-Ile est catalysée par des CYP, particulièrement trois membres de la famille CYP94 (Wasternack et Hause, 2013; Heitz et al., 2016). Tout d'abord la découverte du 12-carboxy-JA-Ile (**12COOH-JA-Ile**) qui s'accumule, tout comme le 12-hydroxy-JA-Ile (**12OH-JA-Ile**), plus tardivement que le JA-Ile après blessure a amené l'hypothèse que ces deux composés pourraient être des catabolites de l'hormone (Figure 1.30) (Glauser et al., 2008). La caractérisation biochimique initiale de CYP94C1 avait montré qu'elle est une ω -hydroxylase d'acides gras linéaires *in vitro* (Kandel et al., 2007). Particulièrement, elle était une des seules enzymes connues à catalyser l'oxydation complète d'un méthyl terminal (ω) en carboxy (COOH). Au laboratoire, le ré-examen de son comportement à l'aide d'outils de co-régulation avait montré un lien transcriptionnel étroit de CYP94C1 avec la voie JA, et conduit à tester l'hypothèse que cette enzyme pouvait oxyder le carbone ω du JA-Ile.

L'action de CYP94 sur JA-Ile chez *Arabidopsis* a été décrite indépendamment par trois équipes, dont celle de l'IBMP, par des portes d'entrée un peu différentes. Ce catabolisme conduit à deux produits d'oxydation : premièrement l'hormone subit une hydroxylation catalysée par CYP94B3 majoritairement (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012) et dans une moindre mesure par CYP94B1 (Figure 1.30) (Koo et al., 2014; Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2015). Cette réaction forme le 12OH-JA-Ile et est réalisée à 95 % par (surtout) CYP94B3 et CYP94B1 dans les feuilles (Figure 1.30) (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011, 2014). Les 5 % restants sont attribués à CYP94B2 qui est le plus proche homologue de B1 et B3, d'après une étude dans les racines (Bruckhoff et al., 2016). JA-Ile et 12OH-JA-Ile sont aussi oxydés en 12COOH-JA-Ile par CYP94C1 majoritairement, et en faible proportion par CYP94B3 (Figure 1.30) (Heitz et al., 2012). Ceci confirme la suspicion initiale issue de l'activité de CYP94C1 décrite sur des acides gras linéaires *in vitro* (Kandel et al., 2007). La formation des deux dérivés oxydés de JA-Ile est dépendante de la synthèse et de la

signalisation de JA-Ile car les mutants *coi1* et *jar1* les accumulent moins, du fait de l'absence d'induction de l'expression des trois CYP94 après blessure (Heitz et al., 2012). Tous trois appartiennent à un clade de 6 gènes chez *Arabidopsis* (Nelson et Werck-Reichhart, 2011; Widemann et al., 2015), comprenant aussi *CYP94D1* et *D2*, mais seules *CYP94B3*, *B1* et *C1* sont induits par les stimuli entraînant l'accumulation des JAs, dont le 12OH- et le 12COOH-JA-Ile (Kandel et al., 2007; Kitaoka et al., 2011; Heitz et al., 2012; Koo et al., 2014; Aubert et al., 2015).

Ces gènes ont fait l'objet de multiples analyses fonctionnelles par génétique inverse. La perte de fonction de *CYP94B3* résulte en une hausse des quantités de JA-Ile, et une baisse de celle de 12OH-JA-Ile après blessure foliaire (Heitz et al. 2012). Des mutants déficients en CYP94 présentent une inhibition de l'allongement racinaire plus forte en présence de JAs exogène, démontrant qu'une réduction du catabolisme de JA-Ile augmente la sensibilité à ce traitement (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011, 2014; Heitz et al., 2012). Inversement, la surexpression ectopique de *CYP94B1* ou *CYP94B3* cause une série de phénotypes rappelant une déficience des réponses aux JAs, incluant une stérilité mâle chez *Arabidopsis* (Koo et al., 2011), un allongement racinaire plus important, une sensibilité accrue aux larves de *Spodoptera exigua* et au champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, corrélée à une forte réduction de l'induction de l'expression des gènes en réponse aux JAs (Koo et al., 2011; Aubert et al., 2015). Tous ces effets attestent que l'oxydation par CYP94B3 et B1 inactive le JA-Ile et correspond à une atténuation du signal (Figure 1.30) (Koo et al., 2011; Aubert et al., 2015). Le mutant *cyp94c1* présente une chute drastique de 60 % d'accumulation de 12COOH-JA-Ile et chez le double mutant *cyp94b3 c1*, la formation de 12COOH-JA-Ile est totalement abolie, corrélée avec une suraccumulation synergique de JA-Ile après blessure (Heitz et al., 2012). Ceci suggère que CYP94B3 facilite l'oxydation de 12OH-JA-Ile en 12COOH-JA-Ile (Figure 1.30). Cependant seule la surexpression de CYP94C1 et pas celle de CYP94B3 entraîne une suraccumulation de 12COOH-JA-Ile après infection fongique (Aubert et al., 2015), démontrant que CYP94C1 réalise majoritairement cette étape catabolique (Figure 1.30) (Heitz et al., 2012).

L'analyse du triple mutant *cyp94b1 b3 c1* qui est totalement bloqué dans l'oxydation du JA-Ile montre une suraccumulation de l'hormone mais une absence de sur-induction des réponses JA-Ile dépendantes en réponse à la blessure (Poudel et al., 2016). De façon surprenante, cette lignée montre même des phénotypes de déficience de JA-Ile comme par exemple une plus grande sensibilité aux herbivores (Poudel et al., 2016). A l'inverse, en réponse à l'infection par *Botrytis*, le triple mutant *cyp94b1 b3 c1* est plus résistant (Aubert et al., 2015). Ces deux jeux de données semblent en désaccord et indiquent que le niveau de l'hormone et son catabolisme ne corrèlent pas avec les niveaux de résistance. Le mutant *cyp94b1 b3 c1* répond pourtant normalement à un traitement avec du JA, par exemple il présente un allongement racinaire

moins par rapport au sauvage, signifiant que la signalisation est effective et que la hausse de JA-Ile chez le triple *cyp94* n'atteint pas le niveau de saturation de COI1 (Poudel et al., 2016). Une hypothèse serait que des mécanismes de régulation interviendraient pour contrecarrer l'impact d'une accumulation excessive de JA-Ile chez le triple mutant afin d'éviter les effets négatifs induits par une sur-stimulation des défenses. Un tel rétrocontrôle négatif pourrait être médié par les répresseurs JAZ. On peut imaginer qu'une accumulation plus importante d'hormone active chez le triple mutant *cyp94* entraîne une plus forte induction de l'expression des *JAZ* ce qui causerait une répression plus forte après stimulus, antagonisant les effets positifs de la surabondance de l'hormone. Une telle tendance a été décrite chez les mutants simples *cyp94* chez lesquels certains *JAZ* ont une expression plus forte après stress foliaire (Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012; Aubert et al., 2015). Cependant, ces observations n'expliquent pas pourquoi *cyp94b1 b3 c1* présente une réponse affaiblie à la blessure comparé au sauvage (Poudel et al., 2016).

Un autre aspect qui peut modifier l'impact du catabolisme oxydatif est que des travaux récents de deux équipes ont montré que le 12OH-JA-Ile est bioactif et qu'il pourrait moduler l'activité du JA-Ile (Jimenez-Aleman et al., 2019; Poudel et al., 2019). Au niveau moléculaire, 12OH-JA-Ile est apte à servir de ligand à COI1 et aux JAZ, à une concentration minimum plus élevée par rapport à celle nécessaire avec le JA-Ile (Koo et al., 2011; Aubert et al., 2015). Il a d'ailleurs été observé que lors d'un test d'inhibition de la croissance racinaire, le 12OH-JA-Ile réduit, de façon moindre par rapport à JA-Ile, l'allongement des racines (Kitaoka et al., 2014; Jimenez-Aleman et al., 2019). Un résultat similaire a aussi été obtenu concernant l'accumulation des anthocyanes, des glucosinolates et le développement des larves d'herbivores (Jimenez-Aleman et al., 2019; Poudel et al., 2019). Par ailleurs, un traitement des plantes au 12OH-JA-Ile cause la dégradation de JAZ1 et JAZ9 au niveau racinaire de façon COI1-dépendante (Jimenez-Aleman et al., 2019). Ces résultats montrent que l'oxydation du JA-Ile par les CYP94 en 12OH-JA-Ile ne supprime pas totalement les réponses mais les atténuent. Les auteurs proposent qu'après un stimulus induisant les réponses JAs, le 12OH-JA-Ile module les processus activés par le JA-Ile pour favoriser la résilience des plantes (Figure 1.30) (Jimenez-Aleman et al., 2019). Un mutant qui ne peut plus produire ni JA-Ile ni 12OH-JA-Ile se montre plus sensible à l'agression par des herbivores que lorsque seule la synthèse du JA-Ile est bloquée, affirmant que ces deux composés agissent en synergie (Poudel et al., 2019). De ces résultats on peut supposer que le phénotype de sensibilité aux larves de *Spodoptera exigua* observé chez *cyp94b1 b3 c1* qui suraccumule l'hormone (Poudel et al., 2016), serait dû à la carence en 12OH-JA-Ile. Cependant cette hypothèse ne s'applique pas à la résistance au nécrotrophe *Botrytis*, car le triple *cyp94* est plus résistant que le sauvage (Aubert et al., 2015). Les données contradictoires sur les deux systèmes biologiques sont donc inexpliquées et

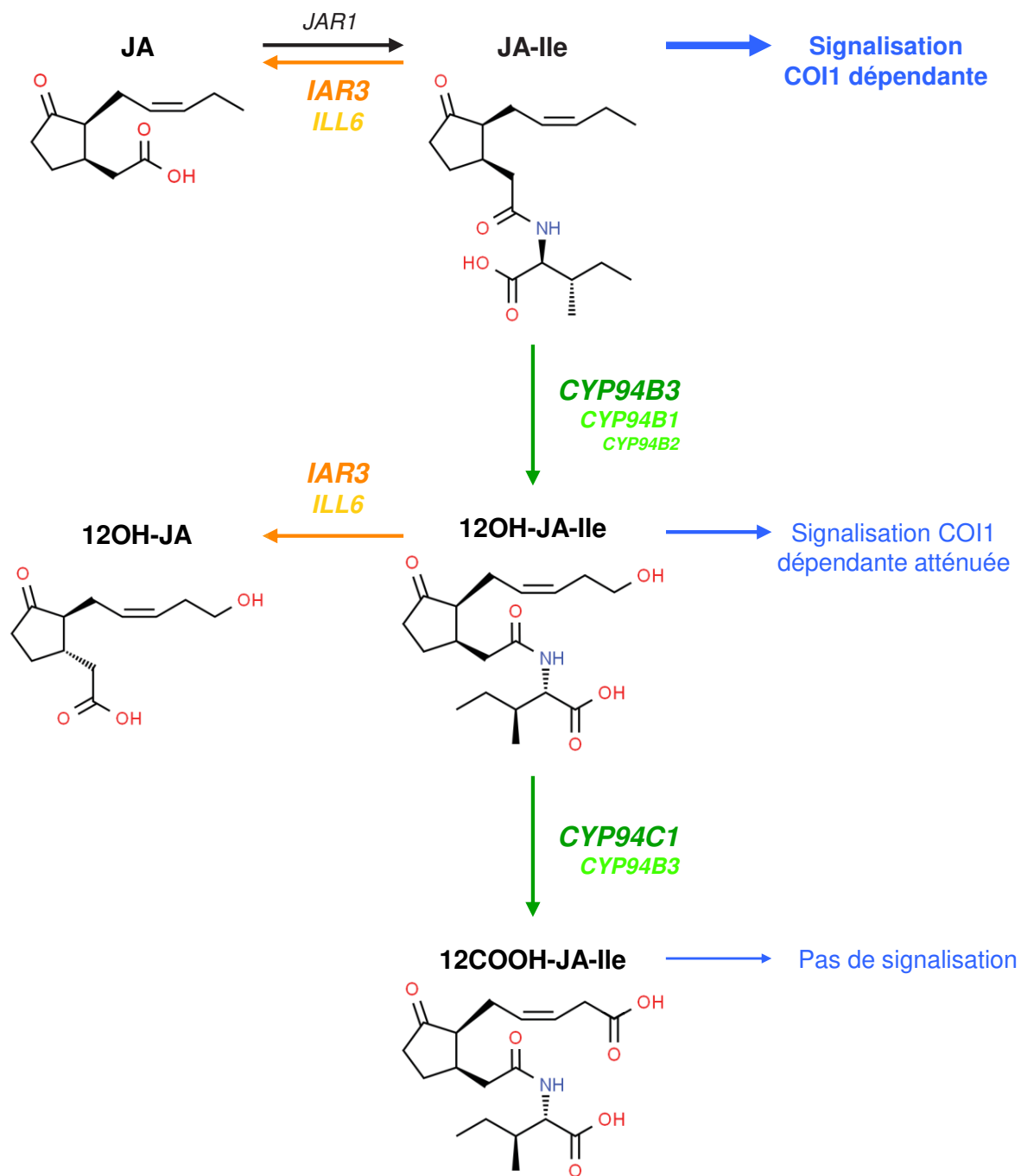


Figure 1.31. L'hydrolyse du JA-Ile.

La signalisation JA-Ile entraîne l'expression COI1 dépendante des gènes de son propre catabolisme. Les *CYP94s* qui sont impliqués dans le catabolisme par oxydation de l'hormone ce qui l'inactive graduellement (Kitaoka *et al.*, 2011 ; Koo *et al.*, 2011 ; Heitz *et al.*, 2012 ; Koo *et al.*, 2014 ; Bruckhoff *et al.*, 2016). Les amidohydrolases *IAR3* et *ILL6* clivent l'Ile des conjugués JA-Ile et 12OH-JA-Ile ce qui représente un catabolisme de l'hormone par hydrolyse (Widemann *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016a). Ce catabolisme hydrolytique forme respectivement du JA et du 12OH-JA qui deviennent disponible pour être converti en d'autres composés ou pour effectuer leur action biologique (Yoshihara *et al.*, 1989 ; Nakamura *et al.*, 2011 ; Wasternack et Strnad, 2018).

12COOH-JA-Ile = 12-carboxy-jasmonoyl-L-isoleucine ; 12OH-JA = 12-hydroxy-jasmonate ; 12OH-JA-Ile = 12-hydroxy-jasmonoyl-L-isoleucine ; COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; CYP94 = cytochrome P450 de la famille 94 ; *IAR3* = *IAA-alanine resistant 3* ; *ILL6* = *IAA-leucine resistant (ilr)-like gene 6* ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JA = acide (-)-jasmonique ; *JAR1* = *jasmonate resistant1*.

restent à consolider. Il est envisageable que la régulation des réponses chez le triple *cyp94* soit stimulus dépendante, ce qui nécessiterait une étude comparative pour l'établir.

En ce qui concerne le 12COOH-JA-Ile, aucune activité biologique ou capacité de liaison au corécepteur COI1-JAZ n'a été montrée, c'est donc un catabolite inactif du JA-Ile et du 12OH-JA-Ile (Figure 1.30) (Koo et al., 2014; Aubert et al., 2015). L'existence de deux niveaux d'oxydation indique une extinction graduelle de l'activité biologique du ligand. De plus, une deuxième voie d'inactivation du JA-Ile et du 12OH-JA-Ile a été décrite au laboratoire peu après, ce qui complexifie d'avantage les mécanismes cataboliques.

4.2.2. Le catabolisme par déconjugaison

La déconjugaison est un processus connu dans le métabolisme hormonal mais n'est généralement pas associée au catabolisme. Dans la plupart des cas, la conjugaison est un mécanisme qui inactive une hormone et qui permet de créer un stock transitoire en mesure de mobiliser le composé actif en cas de besoin et d'induire les réponses rapidement sans nécessiter une néosynthèse. Par exemple, l'auxine peut être conjuguée à des acides aminés tel l'Ala par des enzymes de type GH3, ce qui stoppe son activité, et l'amidohydrolase *IAA-alanine resistant 3 (IAR3)* permet la réaction inverse d'hydrolyse, ce qui libère l'auxine active (Davies et al., 1999). Comme chez les JAs la conjugaison à l'Ile par JAR1 fournit l'hormone bioactive (Figure 1.31), il est prévisible que la déconjugaison ait évolué pour cette famille de PhyH en un mécanisme catabolique (Koo, 2017).

La première mention d'une déconjugaison du JA-Ile a été publiée chez *Nicotiana attenuata*, et réalisé par la jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (*JIH1*) qui est l'homologue de IAR3 chez cette espèce (Woldemariam et al., 2012). Une lignée silencieuse pour *JIH1* présente des niveaux plus élevés de JA-Ile induit et une résistance accrue aux herbivores (Woldemariam et al., 2012). Cette publication est apparue pendant la caractérisation dans l'équipe de *IAR3* d'*Arabidopsis* et de son homologue *IAA-leucine resistant (ilr)-like gene 6 (ILL6)*. ILL6 avait été révélé avec un score élevé dans des analyses de corégulation utilisant CYP94C1 comme appât et apparaissait comme un bon candidat pour participer à l'homéostasie de JA-Ile. *IAR3* et *ILL6* appartiennent à un clade de sept gènes codant des amidohydrolases (**AH**) (Sanchez Carranza et al., 2016) et les activités de déconjugaison de JA-Ile de *IAR3* et *ILL6* ont été caractérisées au laboratoire (Figure 1.31) (Widemann et al., 2013). Les AH co-localisent avec les CYP94 au niveau du réticulum endoplasmique (Zhang et al., 2016b), ce qui démontre que cet organite est le siège du catabolisme du JA-Ile. *IAR3* montre une expression basale plus élevée qu'*ILL6*, et comme les *CYP94* ces deux AH sont induites par les stimulus JAs comme la blessure ou l'infection et leur expression est dépendante de la signalisation COI1-JA-Ile

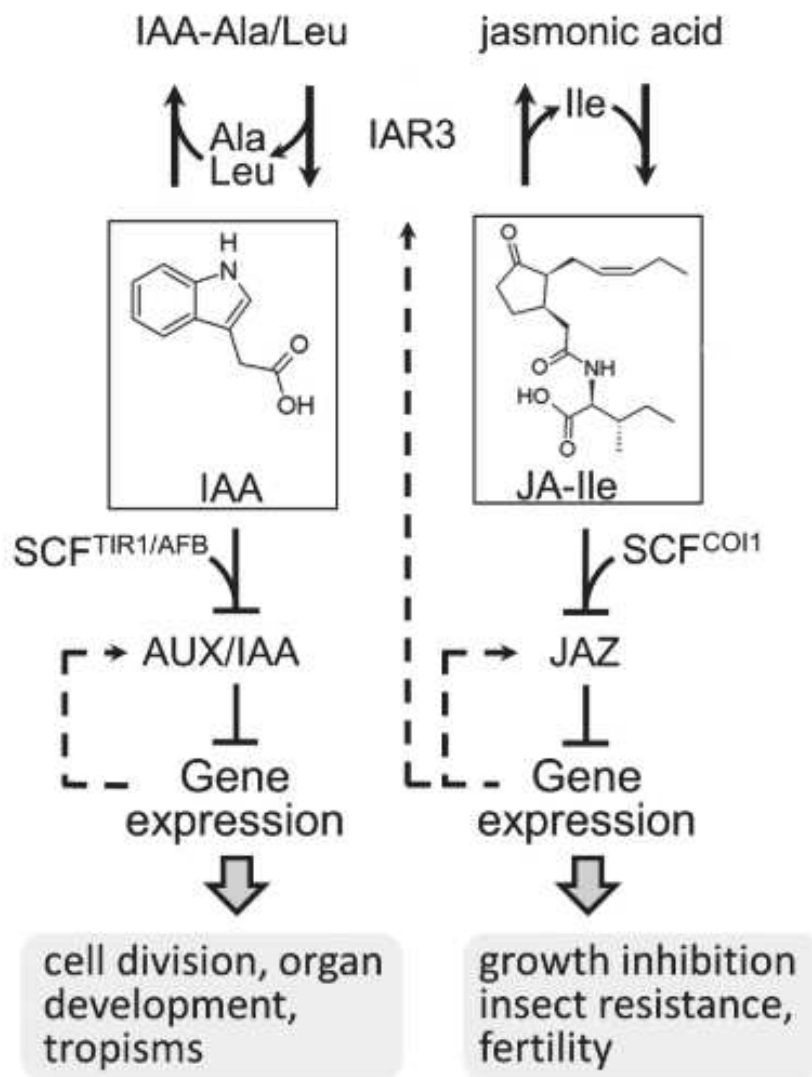


Figure 1.32. Crosstalk entre la croissance et la défense par IAR3.

Le JA-Ile induit les réponses défensives et il est inactivé par l'hydrolyse de l'Ile médié par IAR3 (Zhang *et al.*, 2016a). L'auxine est une hormone de croissance dont la fonction est réprimée lors de la défense. L'action de IAR3 permet de libérer de l'auxine libre à partir des conjugués IAA-Leu et IAA-Ala ce qui permet d'induire la signalisation pour la croissance dans le même temps qu'est stoppée la signalisation défensive par clivage IAR3 dépendant du JA-Ile (Zhang *et al.*, 2016a).

Adaptée de Zhang *et al.*, 2016a.

Ala = alanine ; COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; IAA = acide indole 3-acétique ou auxine ; IAA-Ala/Leu = auxine-alanine/leucine ; IAR3 = *IAA-alanine resistant 3* ; Ile = isoleucine ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; Leu = leucine ; SCF^{COI1} = *Skp, Cullin, F-box containing complex Coronatine-insensitive 1* ; SCF^{COI1} = *Skp, Cullin, F-box containing complex transport inhibitor response 1*.

(Widemann et al., 2013; Aubert et al., 2015). IAR3 montre une activité enzymatique *in vitro* plus importante qu'ILL6 pour le clivage du substrat JA-Ile (Figure 1.31), cependant parmi les mutants simples analysés, seul *iar3-5* montre une suraccumulation de l'hormone post-blessure, accentuée chez le mutant double *iar3 ill6*, illustrant une redondance fonctionnelle (Widemann et al., 2013; Zhang et al., 2016b). De plus, la surexpression de ces deux gènes cause une diminution de l'accumulation de JA-Ile corrélée avec des phénotypes de déficience en hormone (Zhang et al., 2016b). Ceci démontre l'implication de ces deux AH dans l'inactivation du JA-Ile et ce processus définit un catabolisme par clivage enzymatique (Figure 1.31).

IAR3 est une enzyme bifonctionnelle, impliquée à la fois dans le métabolisme du JA-Ile et de l'auxine (Figure 1.32) (Davies et al., 1999; Widemann et al., 2013; Zhang et al., 2016b), contrairement à ILL6 dont aucune activité n'est détectée sur des conjugués auxine-acides aminés (Sanchez Carranza et al., 2016; Zhang et al., 2016b). Ces données définissent IAR3 comme un acteur du *crosstalk* entre ces deux hormones et donc potentiellement un régulateur de la balance entre la croissance et la défense (Zhang et al., 2016b; Koo, 2017). Une hypothèse attractive prédit que IAR3 permet d'atténuer la signalisation défensive inactivant le JA-Ile et promeut la reprise de la croissance en clivant l'auxine-Ala pour fournir de l'auxine libre qui induit la division cellulaire (Figure 1.32) (Zhang et al., 2016b). Cette enzyme a donc un effet antagoniste entre les deux hormones et sur leur signalisation.

Notre équipe avait démontré que de façon intéressante, IAR3 et ILL6 sont également capables de cliver le 12OH-JA-Ile en 12OH-JA *in vitro* et *in planta* (Figure 1.31). Les mutants *iar3* et *ill6* présentent une surabondance du 12OH-JA-Ile corrélée avec une diminution de l'accumulation du 12OH-JA et de ses dérivés (Widemann et al., 2013). Cet effet est encore plus prononcé chez le double mutant *iar3 ill6* (Zhang et al., 2016b) démontrant là aussi la redondance fonctionnelle de ces deux enzymes (Figure 1.31). Cette métabolisation pourrait correspondre à un processus catabolique, au même titre que l'action des AH sur JA-Ile, et moduler l'activité de signalisation médiée par 12OH-JA-Ile (Jimenez-Aleman et al., 2019; Poudel et al., 2019; Takaoka et al., 2019). Néanmoins le 12OH-JA montre un rôle dans la tubérisation ainsi que son dérivé 12-O-Glc-JA qui induit également la nyctinastie ce qui signifie qu'il ne sont pas de simples catabolites du 12OH-JA-Ile (Yoshihara et al., 1989; Nakamura et al., 2011). Du fait que ces deux composés possèdent des propriétés biologiques, il semble logique que leur synthèse ne soit pas uniquement dépendante du catabolisme du JA-Ile. Il est possible que la plante synthétise également ces composés même lorsqu'il n'y a pas de synthèse de l'hormone active et dans ce cas c'est probablement par l'oxydation directe du JA (Figure 1.8).

La suraccumulation de JA-Ile et de 12OH-JA-Ile chez les deux mutants *iar3* et *ill6* est accompagnée par une surexpression de gènes en réponses aux JAs et tout particulièrement des *CYP94B1*, *B3* et *C1* (Widemann et al., 2013). Cela démontre que l'absence de catabolisme hydrolytique entraîne une signalisation accrue qui stimule plus fortement la voie oxydative. Ceci montre la plasticité métabolique pour maintenir l'homéostasie de JA-Ile. Néanmoins le patron et niveaux d'expression des *CYP94* et des *AH* pourraient permettre de moduler le catabolisme hormonal et l'impact de chacune des deux voies dans diverses situations. Il a par exemple été montré qu'en réponse à l'infection on observe principalement une accumulation des composés oxydés et suite à une blessure s'accumulent préférentiellement les composés oxydés et déconjugués (Widemann et al., 2016). Ce résultat démontre que l'action des deux voies cataboliques est stimulus dépendante, néanmoins leurs contributions respectives dans l'inactivation du JA-Ile en réponse à l'infection ou à l'herbivorie n'ont pas été déterminées. De plus, les recherches sur le mutant *cyp94b1 b3 c1* en réponse à l'un ou à l'autre de ces deux pathosystèmes ont été réalisées séparément dans des laboratoires distincts (Aubert et al., 2015; Poudel et al., 2016). Concernant les AH, l'impact des mutations *iar3 ill6* n'a été étudiée qu'en réponse à la seule blessure (Zhang et al., 2016b). Enfin, l'analyse du double mutant *cyp94b3 ill6* a commencé à montrer l'action coordonnée des deux voies cataboliques mais la redondance fonctionnelle entre les CYP94 et entre les AH doit dissimuler l'impact réel de chacune de ces voies lorsqu'elles agissent de concert sur le JA-Ile.

5. Objectif de thèse

Mes travaux de thèse portent sur l'homéostasie catabolique des JAs et mes buts ont été d'élucider et de mieux comprendre son impact en réponse aux stress. Il s'agissait de comprendre comment la dynamique de gestion de JA-Ile est élaborée, particulièrement par des activités enzymatiques en amont ou en aval de JA-Ile. Nous avons généré de nouveaux fonds génétiques mutants affectés dans ces étapes, et avons examiné leur comportement dans diverses situations, pré- et post-stress.

Dans une première partie, le chapitre deux, nous chercherons à approfondir la connaissance des voies cataboliques oxydatives et hydrolytique de JA-Ile. Par l'étude des mutants doubles *iar3 ill6*, triple *cyp94b1 b3 c1* et quintuple *cyp94b1 b3 c1 iar3 ill6*, nous essayerons de déterminer l'impact de chacune des deux voies d'élimination du JA-Ile lors de l'infection par un nécrotrophe ou lors de l'herbivorie, leurs effets respectifs sur la signalisation défensive et le niveau de tolérance à l'agresseur. Le but est une meilleure caractérisation de la régulation des réponses JA-Ile dépendantes par ces deux voies cataboliques et de comprendre l'impact pour la plante d'une absence partielle ou totale d'élimination de cette hormone. Il s'agit aussi

d'évaluer le potentiel d'amélioration de l'arsenal défensif en modulant la dynamique hormonale.

Le troisième chapitre sera consacré à la caractérisation d'une nouvelle voie d'oxydation directe du JA en 12OH-JA. L'objectif sera de trouver quelle enzyme est capable d'effectuer cette étape, de déterminer si comme pour les AH et les CYP94, plusieurs enzymes interviennent, et si elles présentent une redondance fonctionnelle. Enfin lorsque ces enzymes seront identifiées, l'étude de leurs mutants permettra de définir quel peuvent être les rôles biologiques pour la plante de cette étape oxydative. Une première caractérisation fonctionnelle de ces nouvelles oxydases a pu être publiée en début de thèse (Smirnova et al., 2017). J'ai pu depuis élargir la connaissance de leur spectre d'action, et notamment étudier leur impact sur la tolérance à d'autres stress, un volet qui sera présenté en chapitre quatre.

CHAPITRE II.
RÉSULTATS PARTIE 1

**FONCTIONS ET IMPACTS DES VOIES
CATABOLIQUES DU JA-ILE**

II. Résultats partie 1 : Fonctions et impacts des voies cataboliques du JA-Ile

1. Contexte

L'étude des deux voies cataboliques du JA-Ile et de leur impact sur la signalisation a été faite graduellement. La voie d'oxydation médiée par trois CYP94 a été la première découverte et caractérisée simultanément par trois équipes, dont mon laboratoire d'accueil (Figure 1.30) (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012). Peu de temps après au laboratoire a été caractérisées les deux AH redondantes IAR3 et ILL6 responsables de la déconjugaison du JA-Ile (Figure 1.31) (Widemann et al., 2013). L'identification des différents gènes impliqués a permis de commencer l'étude de l'impact des voies cataboliques sur les réponses JAs dépendantes à différents stress foliaires, en particulier l'infection par un nécrotrophe et l'herbivorie ou la blessure mécanique. Chaque laboratoire s'était focalisé sur l'un de ces deux stress et utilisait un panel de mutants simples et multiples *ah* et *cyp94* qui n'était pas systématiquement commun entre toutes les équipes. On peut citer par exemple l'équipe de Abraham Koo (Université du Missouri, USA) qui a travaillé avec le double *cyp94b1 b3* en réponse à la blessure (Koo et al., 2014), là où mon équipe d'accueil a étudié le double *cyp94b3 c1* (Heitz et al., 2012), ce qui diversifie les résultats mais ne facilite pas la comparaison entre les études. De plus la caractérisation de l'impact de la mutation *cyp94b3* a d'abord été réalisée en réponse à la blessure (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012) et dans un deuxième temps par mon équipe en réponse à l'infection fongique (Aubert et al., 2015). De même pour *CYP94C1*, son rôle biologique sur la signalisation a été défini en réponse aux deux stress biotiques dans notre laboratoire, d'abord après blessure (Heitz et al., 2012) et bien plus tard à la suite d'une infection (Aubert et al., 2015). Du fait que ces différentes études soient menées successivement par des équipes distinctes ne permet pas toujours une comparaison directe et une interprétation définitive de l'effet des deux stimuli sur l'activation du catabolisme oxydatif et de son impact sur la signalisation. Les études du rôle de la déconjugaison montrent aussi des contributions de plusieurs équipes mais avec moins de données disponibles. Les deux AH ont été caractérisées en réponse à la blessure au laboratoire (Widemann et al., 2013) et l'analyse du double mutant *iar3 ill6* a été effectuée par l'équipe de A. Koo (Zhang et al., 2016b), en revanche il y a pas encore d'informations publiées sur l'impact biologique de ces AH suite à une infection.

Dans la plupart des cas, les études indépendantes arrivent à des conclusions concordantes. L'exemple de la surexpression ectopique des *CYP94B3* et *94C1* montre comme attendu une réduction de l'accumulation de JA-Ile après blessure (Koo et al., 2011) et après infection

fongique (Aubert et al., 2015), corrélée avec une expression plus faible des gènes de défenses et une sensibilité plus grande à l'herbivorie (Koo et al., 2011) ou à l'infection (Aubert et al., 2015). Pour les mutants de perte de fonctions de ces gènes, on attend une accumulation de JA-Ile plus abondante corrélée avec une signalisation plus forte. Cependant, les mutants simples ne présentent pas systématiquement une surabondance de JA-Ile dû à la redondance fonctionnelle des enzymes ou une expression insuffisante chez le WT. *cyp94c1* et *cyp94b1* possèdent une accumulation de JA-Ile de type WT (Heitz et al., 2012; Koo et al., 2014) alors que le mutant *cyp94b3* suraccumule l'hormone après blessure (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012). Cette suraccumulation s'accroît chez les doubles *cyp94b1 b3* (Poudel et al., 2016) et *cyp94b3 c1* (Heitz et al., 2012) et encore plus chez le triple mutant *cyp94b1 b3 c1* (Poudel et al., 2016). Cette dernière lignée sera désignée **3cyp** dans la suite du présent document. De façon similaire, les mutants simples *iar3* et *ill6* présentent une suraccumulation de JA-Ile et de 12OH-JA-Ile (Widemann et al., 2013), qui est accentuée chez le double mutant *iar3 ill6* (Zhang et al., 2016b). Cette dernière lignée sera désignée **2ah** dans la suite du document. En revanche, nos deux équipes ont abouti à des conclusions contradictoires en apparence pour un même mutant, c'est notamment le cas de *3cyp* qui est déficient pour le catabolisme oxydatif de JA-Ile. L'étude menée par mon équipe a démontré que *3cyp* est plus résistant au nécrotrophe *Botrytis* (Aubert et al., 2015) alors que de façon étonnante, il est décrit comme plus sensible à des larves d'insectes en dépit d'une suraccumulation de l'hormone (Poudel et al., 2016). Les phénotypes opposés de *3cyp* dans les deux pathosystèmes sont incohérents à ce stade et ne se conforment pas au modèle standard de signalisation, qui prévoit une relation positive entre la quantité d'hormone JA-Ile, la formation du complexe tripartite et l'intensité des défenses et de la résistance (Thines et al., 2007; Wasternack et Hause, 2013). Leur obtention dans des laboratoires indépendants n'explique pas des tendances opposées, les équipes impliquées étant expérimentées dans les pathosystèmes employés.

En définitive malgré l'implication de plusieurs équipes, la description de l'action biologique des deux voies cataboliques reste inachevée et même insatisfaisante concernant leur impact sur la signalisation JA-Ile en réponse aux stress biotiques. En plus de cela les CYP94 et les AH qui ont le même substrat génèrent des produits différents, oxydés et déconjugés respectivement, ce qui signifie que ces deux familles enzymatiques ont un impact différent sur le profil global des JAs. L'infection résulte en une accumulation dominante des composés oxydés alors qu'après blessure s'accumulent autant les composés oxydés et déconjugés, suggérant que l'action des CYP94 et des AH, et donc la dynamique des JAs, est stimulus dépendante (Widemann et al., 2016). Mon équipe d'accueil a donc décidé d'élaborer un projet qui permettrait de réexaminer de façon simple et systématique les impacts du catabolisme

dans les deux pathosystèmes modèles. Premièrement, définir clairement la contribution de chacune des deux voies cataboliques en réponse à l'infection et à l'herbivorie dans la gestion (élimination et accumulation) de JA-Ile. Deuxièmement, quel est l'impact de l'absence d'élimination de JA-Ile par l'une, l'autre ou les deux voies sur les réponses de défense et la résistance anti-herbivore et anti-nécrotrophe ? Pour répondre à ces questions, nous avons comparé les niveaux d'accumulation des JAs, l'expression des défenses et la résistance à la suite des deux stress biotiques en analysant simultanément un nombre réduit de génotypes bloqués totalement dans l'oxydation (*3cyp*), ou dans la déconjugaison (*2ah*) ou dans les deux voies. Ce dernier point a nécessité la préparation du quintuple mutant, *cyp94b1 b3 c1 iar3 ill6*, appelé **5ko**, qui a été effectuée par Laure Poirier, une ingénieure d'étude du laboratoire. L'intérêt de *5ko* est qu'il permettra de voir les effets physiologiques d'une absence totale d'élimination du JA-Ile. Il existe en effet une compensation entre les voies cataboliques, par exemple les mutants *iar3* et *ill6* montrent une surexpression des trois *CYP94* (Widemann et al., 2013). De plus le double mutant *cyp94b3 ill6* présente une surabondance de JA-Ile plus importante après blessure par rapport à *ill6* et à *cyp94b3* ce qui révèle une action coordonnée des deux voies cataboliques (Koo et al., 2014). Cette coordination sera mieux appréhendée dans la présente étude car les génotypes employés sont génétiquement nuls pour les activités enzymatiques respectives. Le mutant *5ko* a été obtenu à mon arrivée au laboratoire ce qui m'a permis d'entreprendre son étude pendant ma thèse. Le fait d'étudier dans un même laboratoire les deux voies cataboliques, en parallèle pour les deux pathosystèmes, permettra d'identifier une logique corrélative entre les différents paramètres mesurés et de réconcilier les contradictions antérieures.

2. Publication : Stress- and pathway-specific impacts of impaired jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) catabolism on defense signalling and biotic stress resistance



ORIGINAL ARTICLE

Plant, Cell & Environment

WILEY

Stress- and pathway-specific impacts of impaired jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) catabolism on defense signalling and biotic stress resistance

Valentin Marquis¹ | Ekaterina Smirnova¹ | Laure Poirier¹ | Julie Zumsteg¹ | Fabian Schweizer² | Philippe Reymond² | Thierry Heitz¹

¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) du CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Department of Plant Molecular Biology, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

Correspondence

Thierry Heitz, IBMP-CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

Email: thierry.heitz@ibmp-cnrs.unistra.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: 12-BSV8-005; Centre National de la Recherche Scientifique; Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique; Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung, Grant/Award Number: 31003A_169278; Université de Strasbourg, Grant/Award Number: IdEx-2014-208e

Abstract

Jasmonate synthesis and signalling are essential for plant defense upregulation upon herbivore or microbial attacks. Stress-induced accumulation of jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), the bioactive hormonal form triggering transcriptional changes, is dynamic and transient because of the existence of potent removal mechanisms. Two JA-Ile turnover pathways operate in *Arabidopsis*, consisting in cytochrome P450 (CYP94)-mediated oxidation and deconjugation by the amidohydrolases IAR3/ILL6. Understanding their impacts was previously blurred by gene redundancy and compensation mechanisms. Here we address the consequences of blocking these pathways on jasmonate homeostasis and defenses in double-*2ah*, triple-*3cyp* mutants, and a quintuple-*5ko* line deficient in all known JA-Ile-degrading activities. These lines reacted differently to either mechanical wounding/insect attack or fungal infection. Both pathways contributed additively to JA-Ile removal upon wounding, but their impairment had opposite impacts on insect larvae feeding. By contrast, only the *ah* pathway was essential for JA-Ile turnover upon infection by *Botrytis*, yet only *3cyp* was more fungus-resistant. Despite building-up extreme JA-Ile levels, *5ko* displayed near-wild-type resistance in both bioassays. Molecular analysis indicated that restrained JA-Ile catabolism resulted in enhanced defense/resistance only when genes encoding negative regulators were not simultaneously overstimulated. This occurred in discrete stress- and pathway-specific combinations, providing a framework for future defense-enhancing strategies.

KEYWORDS

Arabidopsis, *botrytis*, catabolism, defense, feedback, jasmonate, resistance, signalling, wounding

1 | INTRODUCTION

Jasmonates (JAs) have been recognized for more than two decades as powerful regulators of inducible defense responses protecting plants

from damage inflicted by herbivorous insects or microbial pathogens (Campos, Kang, & Howe, 2014; Wasternack & Hause, 2013). Even before the identification of jasmonoyl-(L)-isoleucine (JA-Ile) as the critical bioactive form in 2007 (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007), many derivatives of jasmonic acid (JA) were described, resulting from hydroxylation, conjugation to sugars (Miersch, Neumerkel, Dippe,

Valentin Marquis and Ekaterina Smirnova contributed equally to the work

Stenzel, & Wasternack, 2008), amino acids or amino cyclopropane carboxylic acid (ACC) (Staswick & Tiryaki, 2004), sulfation (Gidda et al., 2003), decarboxylation, and many more (Wasternack & Song, 2017). The enzymes responsible for these modifications have not all been identified and the functions of these derivatives, if any, are generally unknown. The master regulator JA-Ile results from a specific conjugation reaction of JA by the enzyme JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1) (Staswick & Tiryaki, 2004). In the core perception and signalling pathway, JA-Ile acts as a ligand promoting the assembly of the co-receptor CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) with distinct JASMONATE ZIM-DOMAIN PROTEIN (JAZ) that otherwise powerfully represses target transcription factors (TF) and their cognate responses. After its formation, the COI1-JA-Ile-JAZ complex is recruited into the E3 ubiquitin ligase SCF^{COI1} that tags JAZs for proteolytic degradation and provides the basis for JA-Ile-responsive gene de-repression (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). Several hundreds to thousands of genes are under this control, and depending on developmental stage, organ, nature of stimulus, and crosstalks with other hormones, the existence of a wide array of JAZ-TF combinations provides specificity to the system with only one major hormonal ligand (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016). Distinct JA-Ile-triggered networks regulate leaf defenses against various aggressors and are integrated by separate sets of TFs. MYC2, a bHLH type TF, integrates (together with MYC3 and MYC4) simultaneous JA/abscisic acid (ABA) stimuli and defines a wound/insect-specific branch, including the induction of typical responses such as vegetative storage proteins (VSPs) or glucosinolates (Fernandez-Calvo et al., 2011; Schweizer et al., 2013); ERF1/ORA59 TFs integrate concomitant JA/ethylene (ET) signals into a microbe-specific branch controlling expression of plant defensins, typically PDF1.2 (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon-Reyes, & Van Wees, 2012; Wasternack & Hause, 2013).

JA signalling, like any hormonal pathway, needs to be tightly controlled in time and space, particularly because defense upregulation is costly and connected to overall growth inhibition (Guo, Major, & Howe, 2018). This antagonism was long thought to be merely imposed by limited resources that need to be re-allocated from developmental to defensive sinks (Havko et al., 2016), but recent advances have evidenced hardwire connections in the control of growth-defense tradeoffs (Campos et al., 2014; Guo et al., 2018). For appropriate control of JA responses, plants rely on several negative feedback mechanisms. In addition to JAZ repressor proteins, other negative regulators were identified that repress JA responses at the level of gene promoters, including JAV1 (Yan et al., 2018), and the JAM subclass of bHLH proteins that compete with MYC2/3/4 TFs (Sasaki-Sekimoto et al., 2013). Another way to repress or terminate jasmonate action is at the metabolic level, either by diverting the flux to hydroxy-JA rather than to JA-Ile (Smirnova et al., 2017) or by modifying JA-Ile to alleviate its receptor-binding properties. The characterisation of JA-Ile catabolic pathways has shed light on hormone homeostasis regulation and has also provided a framework explaining additional complexity in the JA metabolic grid (Heitz et al., 2016). Two distinct enzymatic pathways are known to modify or degrade JA-Ile. One consists in a two-step oxidation of the terminal (ω) carbon of the

JA moiety by cytochrome P450 monooxygenases of the CYP94 family. In Arabidopsis, CYP94B3 and to a minor extent CYP94B1 generate 12OH-JA-Ile as a main product, whereas CYP94C1 also catalyzes the full oxidation of JA-Ile to 12COOH-JA-Ile (Figure 1) (Bruckhoff et al., 2016; Heitz et al., 2012; Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2014; Koo, Cooke, & Howe, 2011). The first oxidation product retains weak receptor-assembly capacity and gene-inducing activity (Aubert, Widemann, Miesch, Pinot, & Heitz, 2015; Koo et al., 2011; Poudel et al., 2019), but the second product proved fully inactive (Aubert et al., 2015; Koo et al., 2014). The second pathway is a deconjugation of JA-Ile by an amidohydrolase initially reported in *Nicotiana attenuata* (Woldemariam, Onkokesung, Baldwin, & Galis, 2012) of which the Arabidopsis orthologs IAR3 and ILL6 (Figure 1) (Widemann et al., 2013). These enzymes act on JA-Ile and other JA-amino acid conjugates but also on 12OH-JA-Ile generated by CYP94Bs, releasing JA and 12OH-JA, respectively (Widemann et al., 2013; Zhang et al., 2016). The interconnection of the two catabolic pathways generates increased metabolic complexity because many of the above-mentioned JAs are derived, in fact, from JA-Ile catabolism (Heitz et al., 2016; Widemann et al., 2013). Expression of both JA-Ile oxidases and amidohydrolases (AH) genes is induced by environmental cues and co-regulated with the central regulon defined by JA pathway biosynthetic and signalling genes. Their simultaneous enzymatic action shapes specific jasmonate patterns in different tissues and stress conditions (Aubert et al., 2015; Heitz et al., 2012; Koo et al., 2014; Koo & Howe, 2012; Widemann et al., 2013; Widemann, Smirnova, Aubert, Miesch, & Heitz, 2016).

Manipulating JA-Ile catabolic routes could be an attractive tool to engineer plants for enhanced pathogen resistance or modulate other JA-dependent processes. Loss- or gain-of-function mutant lines in CYP94 or AH genes have revealed profound impacts on JA metabolism but contrasted consequences on JA responses. Arabidopsis lines ectopically overexpressing CYP94 or AH generally have reduced JA-Ile levels and a metabolic shift towards oxidized and/or cleaved derivatives. As expected, increased turnover is correlated with attenuated JA responses, for example, increased sensitivity to *Botrytis* infection or to insect larvae feeding (Aubert et al., 2015; Koo et al., 2011; Zhang et al., 2016). In comparison, analysis of single, double, or triple knock out mutant lines has not led to a unified conclusion as to how JA-Ile responses are impacted by gradual impairment of JA-Ile catabolism. Deficiency in CYP94 or AH expression impacts JA homeostasis consistently with their in vitro enzymatic activities. For example, *cyp94b3* or *b3c1* mutations lead to more JA-Ile accumulation upon leaf wounding, concomitantly to reduced 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile levels (Heitz et al., 2012; Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011). Double *cyp94b3c1* and triple *cyp94b1b3c1* mutant plants displayed slightly enhanced defense responses and tolerance to fungal infection (Aubert et al., 2015). Strikingly, in another study, the double *cyp94b1b3* and triple *cyp94b1b3c1* mutants exhibited deficient JA responses, questioning the current signalling model (Poudel et al., 2016). On the other hand, AH-deficient lines have not yet been tested for defense and resistance responses, so the contribution and impacts of this pathway are unknown.

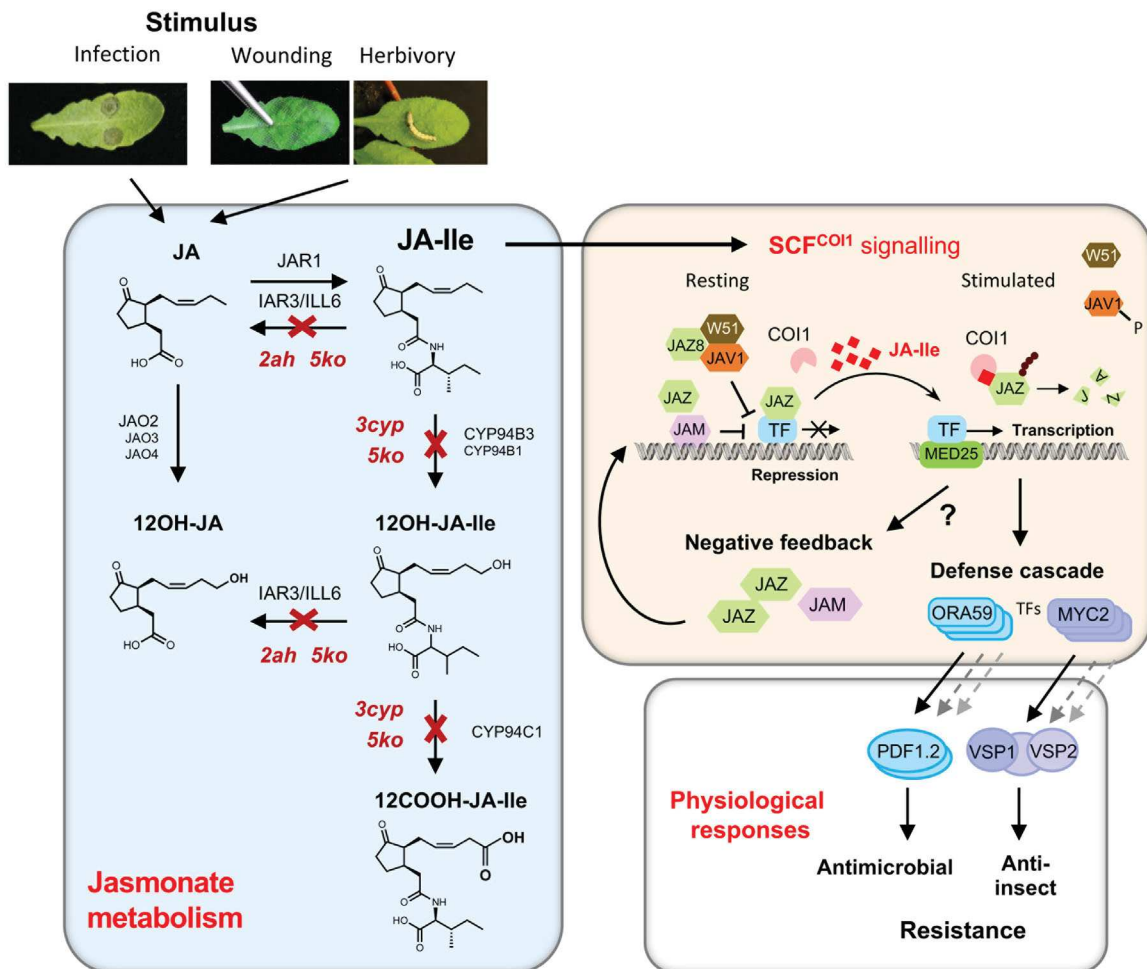


FIGURE 1 Positions of the impaired enzymatic steps in JA-Ile catabolic mutants and simplified view of analyzed signalling and defense responses. Left box: Necrotrophic fungus infection or mechanical wounding/insect attack trigger jasmonic acid (JA) biosynthesis. Some JAs are conjugated to isoleucine by JAR1 enzyme to form bioactive jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile). JA-Ile is turned over by a two-step oxidation to 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile by the cytochrome P450 enzymes CYP94B3/B1 and CYP94C1, or by conjugate cleavage mediated by the amidohydrolases (AH) IAR3 and ILL6. These AHs also cleave 12OH-JA-Ile to release 12OH-JA. Red crosses indicate impaired JA-Ile catabolic steps in higher order mutants utilized in this study: oxidation-deficient (triple *cyp94b1 b3 c1* mutant, *3cyp*), deconjugation-deficient (double *iar3 ill6*, *2ah*) or deficient for both pathways (quintuple mutant, *5ko*). Right box: in absence of JA-Ile, JAZ, JAM, and JAV1 repressors block transcription of target genes. W51: WRKY51. Upon biosynthesis, JA-Ile promotes the assembly of the COI1-JAZ co-receptor which is recruited into the SCF^{COI1} E3 ubiquitin ligase directing proteolytic degradation of JAZ repressors. Transcription factors (TFs) like MYC2 or ORA59 become activated in association with mediator 25 subunit (MED25) and allow the transcription of numerous stimulus-specific defense responses. The anti-insect branch was probed by the MYC2-VSP genes, and the antimicrobial branch by the ORA59 and PDF1.2 genes. Among JA-Ile, targets are also genes encoding JAZ repressors, JAM proteins that compete with MYC2 and ORA59, to attenuate signalling. In mutant plants impaired for JA-Ile catabolism, overinduction of this negative feedback loop may occur and prevent hyper-stimulation of JA-Ile-dependent defenses and associated enhanced resistance

To overcome gene redundancy and compensation mechanisms between pathways that occur frequently in JA metabolic mutants (Smirnova et al., 2017; Widemann et al., 2013), we introduced, in the present study, new plant lines with higher order mutations (Figure 1): a double *iar3 ill6* mutant (thereafter called *2ah*) impaired in the JA-Ile deconjugating pathway; and a quintuple *cyp94b1 cyp94b3 cyp94c1 iar3 ill6* (thereafter called *5ko*) deficient in all characterized enzymes turning over JA-Ile. We submitted these lines, along with the oxidation-deficient *cyp94b1b3c1* mutant (thereafter called *3cyp*), to parallel leaf stimulation by mechanical wounding or *Botrytis cinerea* infection, two environmental cues

triggering strong JA metabolism and signalling, but activating distinct transcriptional networks due to different cross-talks with other hormonal pathways (Pieterse et al., 2012). We determined the contribution of each catabolic pathway on JA-Ile turnover for each stress and investigated the impact of modified JA-Ile homeostasis on defense responses and tolerance to aggression by an herbivore insect or by fungal infection (Figure 1). The data highlight new stress-specific impacts of fully impairing either one or both JA-Ile catabolic pathways where defense and resistance phenotypes are more reflecting the transcriptional behaviour of negative feedback signalling effectors than actual JA-Ile levels.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Plant growth and treatments

Arabidopsis thaliana genotypes used were in the Col-0 ecotype and were grown under a 12 hr light/12 hr dark photoperiod in a growth chamber. The individual T-DNA insertion lines were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center. The *3cyp* line was obtained by crossing the alleles *cyp94b1-1* (SALK_129672), *cyp94b3-1* (CS302217) and *cyp94c1-1* (SALK_55455) (Aubert et al., 2015). The *2ah* line was obtained after crossing the lines *iar3-5* (SALK_069047) and *ill6-2* (SALK_024894C). The quintuple *5ko* line was obtained by crossing the *3cyp* line with a double *iar3-5 ill6-1* (GK412-E11).

B. cinerea inoculation and resistance scoring were as described in Aubert et al. (2015). For mechanical wounding experiments, five or six fully expanded leaves were wounded three times across mid-vein with a hemostat. At increasing time points following damage, leaf samples were quickly harvested and flash-frozen in liquid nitrogen before storing at -80°C until analysis.

Exogenous hormone feeding experiments were performed on seedlings as described in Smirnova et al. (2017). Briefly, surface-sterilized seeds were germinated in 24-well microtiter plates under a 16 hr light/8 hr dark photoperiod at 22°C in a controlled growth chamber in the following medium: 1 \times Murashige and Skoog liquid medium, supplemented with 0.5% sucrose and 0.05% MES buffer. Seedlings were grown for 7 days before gentle addition of hormones (ACC, Sigma-Aldrich A3903) or abscisic acid (ABA, Olchemim 0132721) from stock solutions to a final concentration of 15 μM . JA-Ile was chemically synthesized as described in Widemann et al. (2013). At increasing time points after treatment, seedlings were quickly harvested and flash-frozen in liquid nitrogen before storing at -80°C until RNA extraction.

2.2 | Insect performance assay

Four-week-old *Arabidopsis* plants were challenged with freshly hatched *Spodoptera littoralis* larvae (eggs obtained from Syngenta, Stein AG, Switzerland). Five larvae were placed on each of 11 pots, each containing two plants. Plants were placed in a transparent plastic box and kept in a growth chamber during the experiment (10 hr light/14 hr dark, $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ of light, $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$, and 65% relative humidity). After 8–9 days of feeding, larvae were weighed on a precision balance (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland). The experiment was performed successively three times (different sampling dates).

2.3 | RT-qPCR gene expression assays

Total RNA was extracted from plant leaves with TRI reagent (Molecular Research Center). One microgram of RNA was reverse

transcribed using the SuperScript IV reverse transcription system (Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR was performed on 10 ng of cDNA as described in Berr et al. (2010) using a LightCycler 480 II instrument (Roche Applied Science). The housekeeping genes EXP (At4g26410) and TIP41 (At4g34270) were used as internal references for qPCR on cDNA derived from infected/wounded or non-stimulated leaves. Measurement of fungal biomass was performed as described in Smirnova et al. (2017) except that ACT2 (At3g18780) and UBQ10 (At4g05320) were used as reference genes. Gene-specific primer sequences used for qPCR are listed in Table S1.

2.4 | Jasmonate and camalexin profiling

Jasmonates were identified and quantified by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS). About 50–100 mg frozen plant material was extracted with 10 volumes (10 μl per mg) of ice-cold extraction solution (MeOH:water:acetic acid 70:29:0.5, v:v:v) containing 9,10-dihydro-JA and 9,10-dihydro-JA-Ile as internal standards for workup recovery. Grinding was performed with a glass-bead Precellys tissue homogenizer (Bertin Instruments, France) in 2 ml screw-capped tubes. After 30 min incubation at 4°C on a rotating wheel, homogenates were cleared by centrifugation before concentration of supernatants under a stream of N_2 and overnight conservation at -20°C . After a second centrifugation step, extracts were submitted to quantitative LC–MS/MS analysis on an EvoQ Elite LC-TQ (Bruker) equipped with an electrospray ionisation source (ESI) and coupled to a Dionex UltiMate 3,000 UHPLC system (Thermo). Five microlitre plant extract was injected. Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC HSS T3 column (100 \times 2.1 mm, 1.8 μm ; Waters) and pre-column. The mobile phase consisted of (A) water and (B) methanol, both containing 0.1% formic acid. The run started by 2 min of 95% A, then a linear gradient was applied to reach 100% B at 10 min, followed by isocratic run using B during 3 min. Return to initial conditions was achieved in 1 min, with a total run time of 15 min. The column was operated at 35°C with a flow-rate of $0.30\ \text{ml min}^{-1}$. Nitrogen was used as the drying and nebulising gas. The nebulizer gas flow was set to $35\ \text{L h}^{-1}$, and the desolvation gas flow to $30\ \text{L h}^{-1}$. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 300°C . The capillary voltage was set to 3.5 kV and the ionisation was in positive or negative mode. Low mass and high mass resolutions were 2 for the first mass analyzer and 2 for the second. Data acquisition was performed with the MS Workstation 8 for the mass spectrometry and the liquid chromatography was piloted with Bruker Compass Hystar 4.1 SR1 software. The data analysis was performed with the MS Data Review software. Absolute quantifications were achieved by comparison of sample signal with dose-response curves established with pure compounds and recovery correction based on internal standard signal. The transitions were, in negative mode: JA 209.3 > 59.3; JA-Ile 322.3 > 130.2; 12OH-JA-Ile 338.3 > 130.2; 12COOH-JA-Ile 352.2 > 130.1; 12OH-JA 225.2 > 59.3; in positive mode: camalexin 201.0 > 59.3.

2.5 | Statistical analysis

All statistical analyses were performed using InfoStat 2015d (<http://www.infostat.com.ar>). Comparisons of sample means were performed by one-way analysis of variance ($p < .05$ or $p < .01$) and Tukey's post-hoc multiple comparisons tests ($p < .05$ or $p < .01$), and significant differences of means were determined.

3 | RESULTS

3.1 | Jasmonate profiling of higher order catabolic mutants reveals stimulus-specific impacts on hormone homeostasis

Effective inactivation of the respective genes was verified in each mutant line by RT-qPCR using RNA extracted from 1 hr-wounded leaves (Figure S1 and Aubert et al., 2015). The four plant genotypes in the Col-0 ecotype (wild-type WT, *2ah*, *3cyp*, *5ko*) were submitted separately to mechanical wounding or to *B. cinerea* inoculation, to activate JA metabolism and responses. Mechanical wounding constitutes a synchronous and severe stimulus and generates a massive jasmonate pulse where compound-specific dynamics can be followed (Chung et al., 2008; Glauser et al., 2008; Heitz et al., 2012). Therefore, a kinetic study was conducted with tissue collected at 1, 3, and 6 hr post-wounding (hpw). In contrast, necrotic lesions inflicted by *B. cinerea* infection develop radially with fungal hyphae continuously infecting new tissue (an asynchronous stimulus), and 3 days post-inoculation (dpi) constitutes an optimal time point for recording biochemical changes and for assessing antifungal resistance. We quantified levels of JA, 12OH-JA, JA-Ile, and its catabolites 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile in the two biological responses. JA was less accumulated in infected *3cyp* (Figure S2a,b). Its oxidation product, 12OH-JA, is known to be partially formed via conjugate intermediates (Figure 1) upon wounding (Widemann et al., 2013) and, accordingly, was less abundant in all mutants at 3 hpw, remaining low in *2ah* at 6 hpw (Figure S2). In contrast, 12OH-JA was less affected by the mutations upon infection and was even enhanced in *5ko*, in accordance with the predominant contribution of JA oxidase (JAO) enzymes directly oxidising JA in response to *Botrytis* (Figure 1) (Smirnova et al., 2017).

3.1.1 | Impacts on JA-Ile homeostasis upon wounding

We next examined the evolution of JA-Ile and its oxidized catabolites. JA-Ile profiles showed the typical pattern (Chung et al., 2008; Glauser et al., 2008; Heitz et al., 2012; Koo et al., 2011) in wounded WT leaves, peaking at 1 hpw and declining thereafter (Figure 2a). In *2ah* and *3cyp* lines, a significant overaccumulation of JA-Ile was recorded at 1 hpw and was prolonged in *3cyp*, extending data from lower order *cyp94* mutants described previously (Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013; Zhang et al., 2016). In the *5ko* line that has both pathways

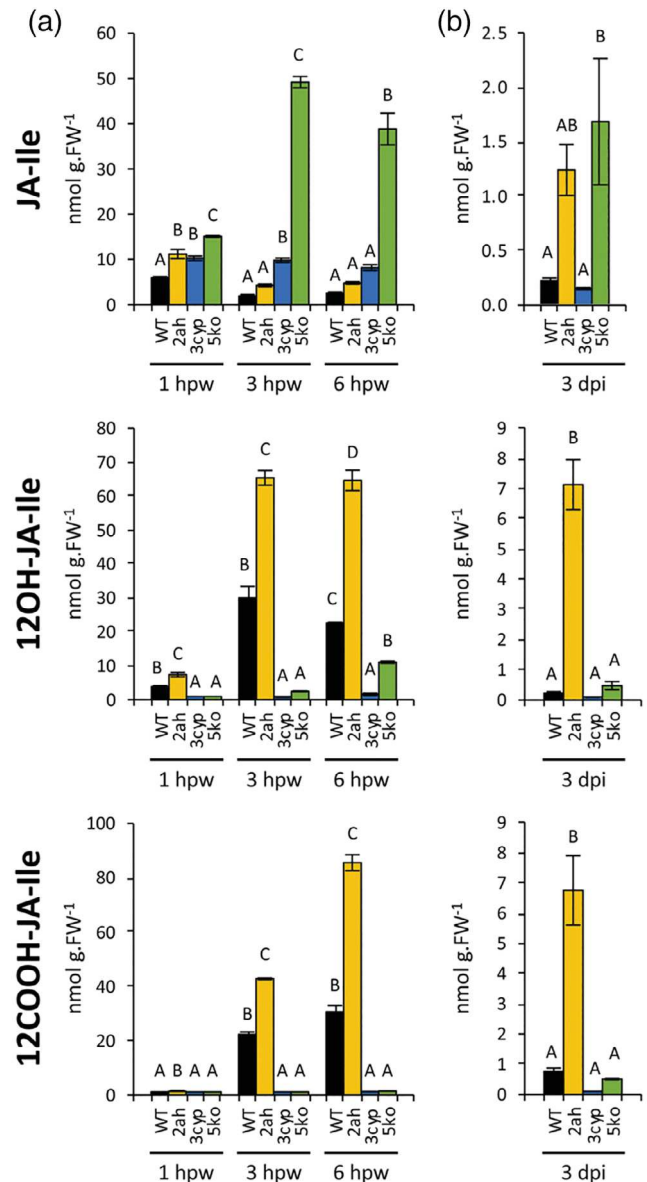


FIGURE 2 JA-Ile and oxidized catabolites accumulation in *2ah*, *3cyp*, and *5ko* mutants after mechanical wounding or *Botrytis cinerea* infection. Six-week-old plants were wounded three times across leaf mid-vein (a) or drop-inoculated on two sites per leaf with a suspension containing 2.5×10^6 fungal spores ml^{-1} (b). Treated leaves were harvested at 1, 3, and 6 hr post wounding (hpw) or 3 days post inoculation (dpi) on WT (black bars), *2ah* (yellow bars), *3cyp* (blue bars), and *5ko* (green bars) plants. Jasmonates were extracted and quantified by LC-MS/MS. JA-Ile, 12OH-JA-Ile, and 12COOH-JA-Ile levels were expressed in nmol g^{-1} fresh weight (FW). Histograms represent the mean \pm SEM of three (wounding) or four (*B. cinerea*) biological replicates. Columns labelled with different letters indicate a significant difference between genotypes at each time point as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $p < .05$ [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

impaired, a huge JA-Ile accumulation was recorded that culminated between 3 and 6 hpw close to $40\text{--}50 \text{ nmol g FW}^{-1}$. These data indicate that in WT wounded leaves, both AH and CYP94 pathways

contribute similarly to JA-Ile turnover and that their simultaneous inactivation synergistically boosts hormone hyperaccumulation at later time points. Profiles of CYP94-generated JA-Ile oxidation products were as expected: 12OH-JA-Ile levels were about double in *2ah* compared to WT, were suppressed in *3cyp* and of note, and were higher in *5ko* than in *3cyp* at 6 hpw (Figure 2a). 12COOH-JA-Ile was only detected from 3 hpw and evolved similarly to 12OH-JA-Ile in *2ah* and *3cyp*, but was barely detected in *5ko*.

3.1.2 | Impacts on JA-Ile homeostasis upon *Botrytis* infection

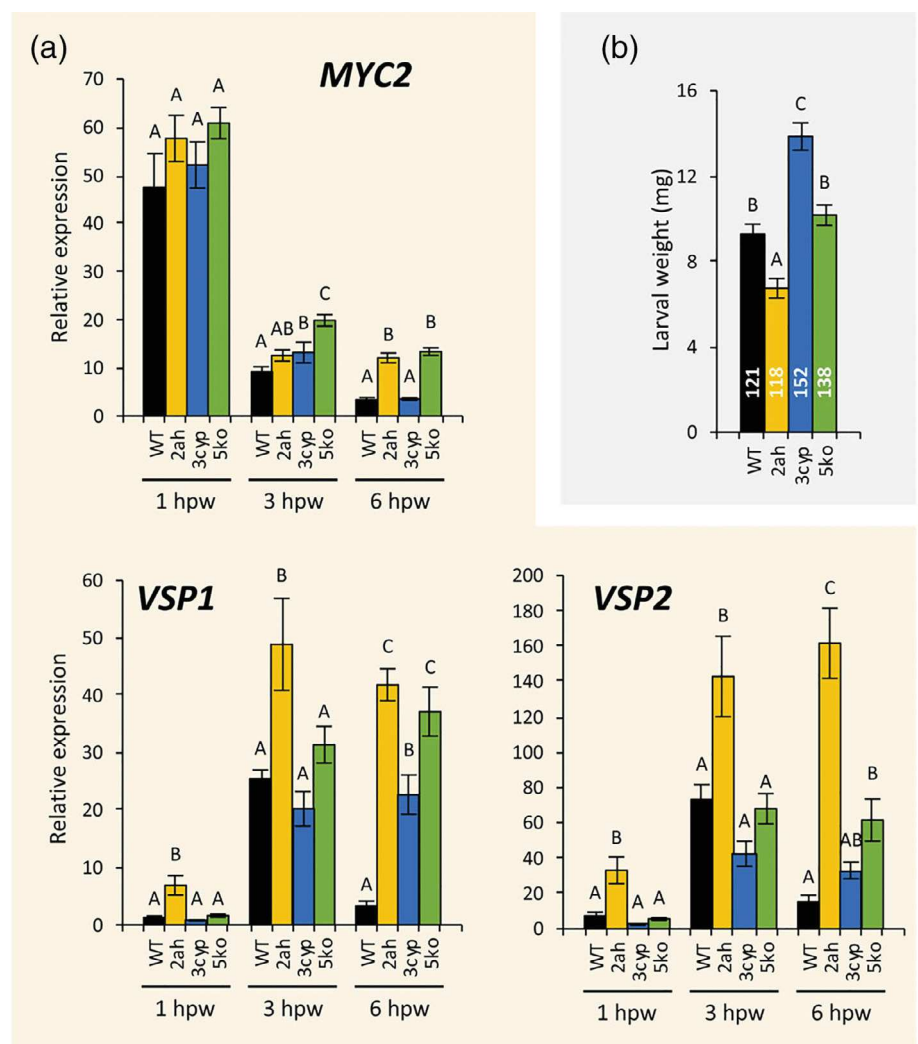
The metabolic impacts of mutations were different in response to *B. cinerea* inoculation. JA-Ile levels were similar to WT in *3cyp*, confirming our previous data (Aubert et al., 2015) (Figure 2b). In contrast, steady-state JA-Ile levels were strongly enhanced in *2ah* but no further increase was observed in *5ko*. This result indicates that the amidohydrolase pathway is essential for JA-Ile clearance upon fungal infection and that blocking simultaneously the oxidative pathway does only marginally impact JA-Ile accumulation. *2ah* also considerably

enhanced 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile levels, reinforcing initial trend obtained with *iar3* or *ill6* single mutants (Widemann et al., 2013). In *2ah*, excess uncleaved JA-Ile is likely oxidized to 12OH-JA-Ile that can no more be deconjugated by IAR3 and ILL6 and part of this enlarged pool is further oxidized to 12COOH-JA-Ile by CYP94C1. Together, these experiments demonstrate stimulus-specific contributions of AH and CYP94 catabolic pathways to JA-Ile turnover and accumulation of downstream derivatives.

3.2 | Impact of impaired catabolic pathways on defense and resistance responses is not reflecting JA-Ile accumulation in mutant plants

As the mutations altered the steady-state levels of bioactive JA-Ile, the lines were examined for induced expression of typical JA-regulated marker genes for each leaf stress model. In the case of wounding, transcripts of *MYC2*, an early-responsive TF gene controlling late targets, accumulated similarly at 1 hpw, but declined less than WT in *2ah* and *5ko* mutants as best visible at 6 hpw (Figure 3a). Two *VSP* genes were examined as late markers of the anti-insect branch of

FIGURE 3 Expression profiles of JA-Ile-dependent genes in response to mechanical wounding (a) and impact on insect feeding (b) in JA-Ile catabolic mutants. Expression profiles of jasmonate-dependent *MYC2*, *VSP1*, and *VSP2* marker genes were determined in response to wounding in WT (black bars), *2ah* (yellow bars), *3cyp* (blue bars), and *5ko* (green bars) mutants. Relative expression of each target gene at 1, 3 or 6 hr post wounding (hpw) is represented. Gene expression was determined by real-time PCR using gene-specific primers and normalized using *EXP* and *TIP41* reference genes. Transcript quantification was performed on three biological replicates analyzed in duplicate. Histograms represent mean expression \pm SEM. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes at each time point as determined by one-way ANOVA with Tukey posthoc test, $p < .05$. For insect feeding assay, *S. littoralis* larvae were placed on leaves of 4-week-old plants. After 8–9 days, larval weight was determined. Histograms represent mean \pm SEM from 3 independent trials (presented in Figure S3). The number of total larvae on each genotype is indicated within the bars. Different letters indicate significant differences at $p < .05$ (linear mixed model) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



the JA defense pathway (Pieterse et al., 2012; Wasternack & Hause, 2013). In WT, both *VSP1* and *VSP2* expression peaked at 3 hpw before declining to low levels at 6 hpw (Figure 3a). Expression was globally enhanced in mutant lines compared to WT, but with distinct patterns. *VSP1* was strongly enhanced in *2ah* at all time points, while in *3cyp* and *5ko*, persistence in transcript levels was only observed at 6 hpw when WT signal faded. For *VSP2*, only *2ah* displayed enhanced expression at all two time points. This indicates that impaired JA-Ile catabolism results in persistent defense marker expression, but this is not commensurate to JA-Ile accumulation (Figure 2a), because *5ko* displays lower defense than *2ah*. To determine the physiological impacts of such altered hormone and defense profiles, we used an insect feeding assay as a biological readout of signalling. When larvae of the generalist herbivore *S. littoralis* were placed on leaves of the four genotypes for 8–9 days, contrasted results were recorded: larvae fed on *2ah* plants were consistently lighter than those feeding on WT, indicating stronger anti-insect resistance (Figure 3b). This opposed to *3cyp*, that sustained higher insect development, confirming impaired resistance reported previously by Poudel et al. (2016). Surprisingly, *5ko* displayed WT level of resistance to herbivory. These conclusions were drawn from three successive trials (Figure S3) with large insect populations.

A similar defense-resistance analysis was conducted for the response to *B. cinerea* infection. The antimicrobial branch of JA-Ile-dependent defense signalling was probed by monitoring *ORA59* TF and *PDF1.2* defense marker expression. Unexpectedly, both genes exhibited reduced expression in *2ah* and *5ko* at 3 dpi, in contrast to *3cyp* that maintained WT transcript levels (Figure 4a). Anti-fungal

resistance assay indicated that only *3cyp* displayed smaller lesions, in agreement with our previous report (Aubert et al., 2015), while *3cyp* and to a lesser extent *2ah* supported reduced fungal biomass as estimated from *B. cinerea* cutinase signal (Figure 4b). Of note, *5ko* behaved essentially like WT in these infection assays. Contents in camalexin, a major antimicrobial phytoalexin in *Arabidopsis*, were determined but no significant differences were found between genotypes. Together, the data show that impairing either one or both JA-Ile catabolic pathways has distinct and stress-specific consequences on JA-mediated defense and resistance responses.

3.3 | Impaired JA-Ile catabolism results in gain in resistance only when negative feedback effectors are not overinduced

Upon parallel investigation of the two leaf defense models, increased JA-Ile accumulation due to impaired catabolism did not correlate systematically with stronger defense or resistance phenotypes. Conversely, enhanced antifungal resistance occurred in *3cyp* without elevated hormone levels (Figures 2 and 4). These observations suggest that additional players may be at work to limit or counteract over-induction of defense responses under deficient JA-Ile turnover. Obvious candidates for such negative regulation are genes encoding JAZ repressors (Browse, 2009) or JAM bHLH factors competing with MYC TFs (Sasaki-Sekimoto et al., 2013), or JAV1 repressor (Hu et al., 2013), all classes being JA-Ile- and stress-responsive. We selected JAZ genes that were previously described as highly induced and sensitive to

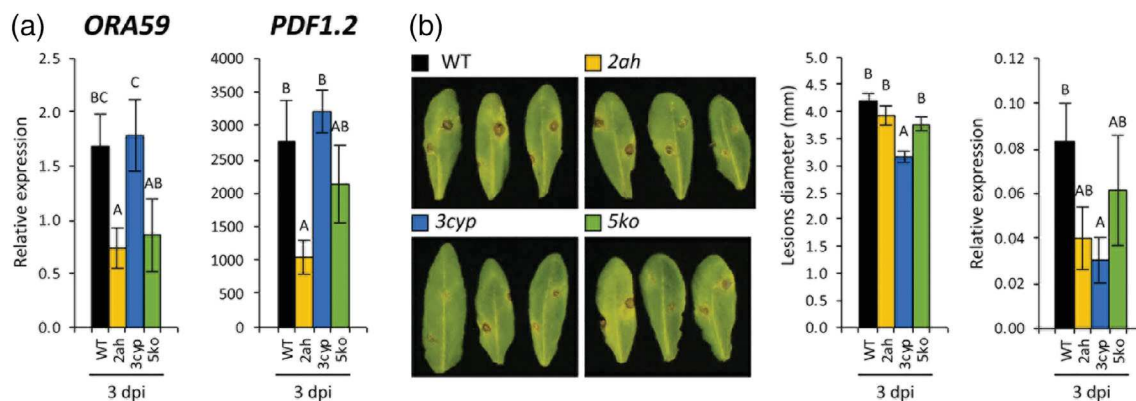


FIGURE 4 Expression profiles (a) of JA-Ile-dependent defense genes and (b) resistance levels in response to *Botrytis cinerea* infection in *2ah*, *3cyp*, and *5ko* mutants. (a) Expression profiles of jasmonate-regulated *ORA59* and *PDF1.2* genes in response to infection by *B. cinerea* in WT (black bars), *2ah* (yellow bars), *3cyp* (blue bars), and *5ko* (green bars) mutants. Relative expression of each target gene at 3 day post infection (dpi) is represented. Gene expression was determined by real-time PCR using gene-specific primers and normalized using *EXP* and *TIP41* reference genes. Transcript quantification was performed on three biological replicates analyzed in duplicate. Histograms represent mean expression \pm SEM. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes at each time point as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $p < .05$. (b) For disease resistance assessment, two sites per leaf were inoculated across the main vein with $5 \mu\text{l}$ of spore suspension containing 2.5×10^6 spores ml^{-1} . Representative leaves of each genotype were detached and photographed at 3 dpi (left panel). Histograms represent the mean lesion diameters \pm SEM of about 100 lesion sites from 10 to 15 plants for each genotype (middle panel). Fungal growth was evaluated by real-time qPCR with *B. cinerea* cutinase-specific primers on genomic DNA extracted from 3-day-infected leaves (right panel). Quantification was performed on three biological replicates analyzed in duplicate. Columns labeled with different letters indicate a significant difference as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test ($p < .01$) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

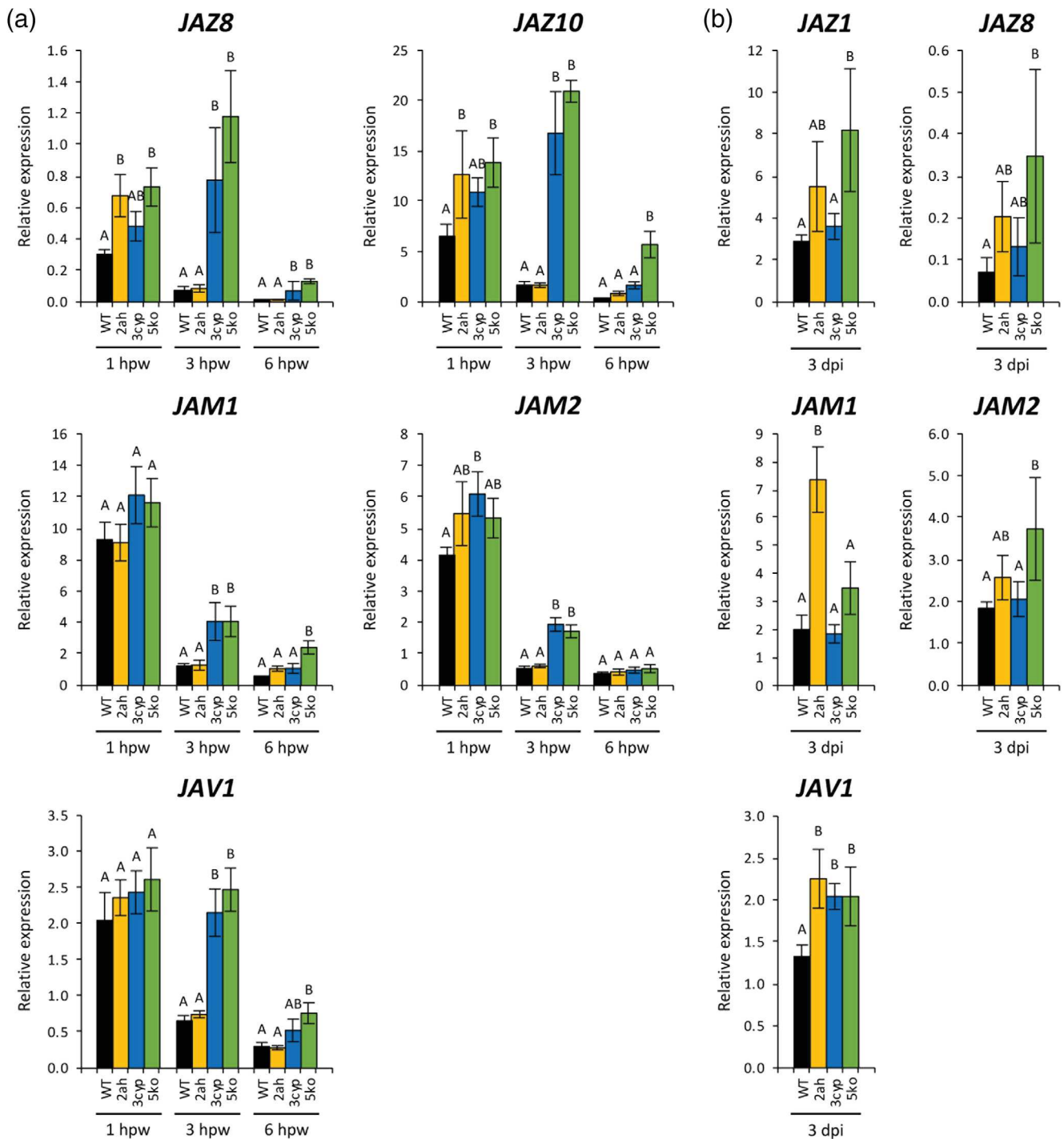


FIGURE 5 Expression profiles of JA-Ile dependent repressor genes in response to wounding and infection in *2ah*, *3cyp* and *5ko* mutants in response to wounding (a), or infection by *Botrytis cinerea* (b), in WT (black bars), *2ah* (yellow bars), *3cyp* (blue bars), and *5ko* (green bars) mutants. Relative expression of each target gene at 1, 3 or 6 hr*** post wounding (hpw) and 3 day post infection (dpi) is represented. Gene expression was determined by real-time PCR using gene-specific primers and normalized using *EXP* and *TIP41* reference genes. Transcript quantification was performed on three biological replicates analyzed in duplicate. Histograms represent mean expression \pm SEM. Columns labelled with different letters indicate a significant difference between genotypes at each time point as determined by one-way ANOVA with Tukey posthoc test, $p < .05$ [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

catabolic pathway deregulation (Aubert et al., 2015; Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013). As shown in Figure 5a, *JAZ8*, *JAZ10*, *JAM1*, *JAM2*, and *JAV1* expression was maximal in WT at 1 hpw with only slight enhancement in some mutants, but their transcripts were clearly

more persistent in *3cyp* and *5ko* lines at 3 hpw, particularly for *JAZ* and *JAV1*, compared with *2ah* that behaved like WT. This result establishes in wounded *3cyp* and *5ko* leaves a correlation between (a) hyperaccumulation of JA-Ile (Figure 2), (b) absence of enhanced

defense or insect resistance (Figure 3) and (c) persistence of *JAZ*, *JAM*, and *JAV1* transcripts (Figure 5). In contrast, despite enhanced JA-Ile levels upon wounding, *2ah* does not display persistent expression of these repressors (Figure 5, see 3 and 6 hpw), and this particular pattern correlates with more robust defense (Figure 3a) and reduced insect herbivory (Figure 3b).

In response to *B. cinerea* infection, *JAZ1*, *JAZ8*, and *JAM1* transcripts were overinduced in *2ah* and *5ko* (*JAM2* only in *5ko*) (Figure 5b), that overaccumulate JA-Ile, correlating with reduced defense (Figure 4a) and WT antifungal resistance (Figure 4b). On the contrary, these repressor genes were not overinduced in *3cyp*, the only genotype exhibiting significantly increased antifungal resistance (Figure 4b). *JAV1* transcripts overaccumulated in all infected mutants, but not differentially (Figure 5b). In summary, the comparative analysis across responses to two aggressors revealed that enhanced defense and resistance under deficient JA-Ile turnover is achieved only if negative effectors are themselves not overresponding to JA-Ile accumulation.

3.4 | Exogenous hormone treatments do not phenocopy genotype-specific responses of JA-Ile catabolic mutants

Jasmonate-dependent responses are known to be largely specified by crosstalk with other hormones. Particularly, JA and ABA signalling pathways interact cooperatively in the upregulation of transcriptional wound responses, whereas JA and ET act synergistically in the induction of antimicrobial defenses (Pieterse et al., 2012). We hypothesized that stress-specific responses in JA-Ile catabolic mutants could reflect different interactions of the manipulated JA pathway with ET and/or ABA pathways. To investigate this possibility, WT, *2ah*, and *3cyp* 7-days old seedlings were treated exogenously with either JA alone, or JA combined with the ET precursor ACC, or JA combined with ABA (all 15 μ M). Kinetic analysis of gene expression was conducted by RT-qPCR. All analyzed genes were found induced by JA to various extents (Figure S4), but were differentially impacted by hormone combinations. *VSP1* and *PDF1.2* were further stimulated by JA + ABA and JA + ACC treatments, respectively. As expected from known antagonism between anti-insect and antimicrobial branches of JA-defense (Pieterse et al., 2012), *PDF1.2* was repressed by JA + ABA treatment, and to a lower extent, *VSP1* was repressed by JA + ACC (Figure S4). Surprisingly, only very limited genotype-specific effects were recorded and here, response of defense genes was not mirrored by repressor behaviour. In particular, both defense markers exhibited a stronger response in the mutants, best visualized in their respective most potent treatments, with a hyperinduction of *VSP1* in *3cyp*. When the three repressor gene families were analyzed, the main feature that emerged was an unexpected excessive response of *3cyp* for *JAZ* and *JAM1* genes. Remarkably, repressor responses were essentially similar to WT in *2ah* for all treatments. Therefore, the hormone combinations applied produced a gene response pattern that is distinct from those arising in mutants submitted to wounding or infection stress.

3.5 | Impaired JA-Ile catabolism impacts basal JA homeostasis and differentially regulates resting levels of target transcripts

We finally examined if impaired JA-Ile catabolism also affected basal JA homeostasis and target transcript levels in absence of imposed stress, by surveying these parameters in untouched leaves of a separate set of adult plants. JA profiling revealed significantly elevated JA levels in resting *3cyp* and to a lesser extent in *5ko* (Figure S5a). In addition, JA-Ile was clearly overaccumulated in CYP94-deficient lines, along with reduced abundance of its oxidation products. Due to high biological fluctuation in unstimulated leaves, statistical significance was difficult to ascertain for these latter, but both 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile were undetected in *3cyp* as expected.

At the level of gene expression, *MYC2* and *ORA59* TFs transcripts were significantly upregulated in *3cyp* and *5ko* lines (Figure S5b), but levels of their respective targets *VSP* and *PDF1.2* were similar to or lower than WT in mutant lines. Consistently, genes encoding *JAZ*, *JAM*, and *JAV1* negative regulators had their transcripts accumulating to higher levels in *3cyp* and *5ko*, that is, the lines with elevated JA-Ile contents. We conclude that *3cyp* rather than *2ah* restrains basal JA-Ile turnover and that non-cleared JA-Ile primarily upregulates negative feedback mechanisms, which, in turn, lower JA-Ile-dependent basal defenses.

4 | DISCUSSION

Hormonal compounds must be timely and spatially controlled to ensure coordinated physiological responses. Catabolic pathways have been characterized for all major plant receptor-binding hormonal ligands and are integral components of hormone homeostasis and action. Since their recent discovery, JA-Ile catabolic pathways have been the focus of intense biochemical and physiological studies that disclosed their intricate relationships with JA signalling. As a common theme in plant hormone catabolism (Kawai, Ono, & Mizutani, 2014; Mizutani & Ohta, 2010), an oxidative inactivation pathway was characterized, with CYP94 enzymes defining a two-step JA-Ile metabolism process. In contrast to most hormones for which conjugation corresponds to inactivation or generation of storage forms (Piotrowska & Bajguz, 2011), JA requires conjugation to the amino acid isoleucine as the critical activation step. Consistently, deconjugation by the AH IAR3 and ILL6 was characterized in *Arabidopsis* as a second JA-Ile removal pathway, acting in a JAR1 reverse reaction.

Understanding the functions of JA-Ile catabolism potentially offers avenues to tailor increased or on-demand defense signalling in diverse situations and was addressed repetitively by loss-of-function studies in the two catabolic pathways (Aubert et al., 2015; Bruckhoff et al., 2016; Heitz et al., 2012; Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Koo et al., 2014; Luo et al., 2016; Poudel et al., 2016; Woldemariam et al., 2012; Zhang et al., 2016). However, due to the separate use of different biological systems and of partially impaired mutant lines, the

possible logic underlying seemingly contradictory results was out of reach. In the present work, we conducted a comprehensive analysis of selected genotypes that allowed evaluating the respective impact of each biochemical pathway on alterations in JA metabolism, defense regulation, and resistance to biotic stress. The data clarify some former discrepancies and fill significant knowledge gaps by establishing novel pathway- and stress-specific features.

Wounding/insect stress and infection by a necrotroph both induce strong JA metabolism and signalling (Campos et al., 2014), but because of different interactions with other hormonal networks (Pieterse et al., 2012), the subsequent transcriptomes and defensive outcomes display only partial overlap. Previous reports showed that single mutations in members of either the oxidative or cleavage pathway were sufficient to overaccumulate JA-Ile upon leaf wounding (Heitz et al., 2012; Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Koo et al., 2014; Widemann et al., 2013). This feature was extended in *3cyp* or *2ah* lines fully impaired in one or the other pathway, but here we demonstrate that their simultaneous deficiency raises JA-Ile to much higher levels, indicating that upon massive and rapid JA-Ile biosynthesis triggered by mechanical wounding, no additional enzymatic pathway can efficiently turnover and limit accumulation of JA-Ile. In response to *B. cinerea* infection, a comparable JA-Ile hyperaccumulation was recorded in *2ah* and *5ko* lines, but in marked contrast *3cyp* infected leaves accumulated WT levels of JA-Ile, suggesting that in this latter background, the activity of the AH pathway is sufficient to prevent abnormal hormone build-up. The CYP94 oxidation pathway is however active in infected WT plants because oxidized JA-Ile derivatives are readily detected, albeit less abundantly than upon wounding. The metabolic preponderance of

the AH pathway upon infection suggests that CYP94 cannot substitute for AH deficiency and that IAR3/ILL6 enzymes are essential for proper JA-Ile homeostasis upon necrotrophic attack. Together, these results demonstrate that the two JA-Ile catabolic pathways contribute differentially to JA-Ile removal upon two distinct leaf stresses.

We next investigated the signalling output of perturbed JA-Ile catabolism in the two leaf defense models and found that transcript levels of canonical regulatory and defense markers and resistance phenotypes were overall poorly correlated with perturbed JA-Ile levels in mutant lines. Upon wounding, *3cyp* was the closest to WT in terms of VSP induction, contrasting with the deficient insect defense performance of this genotype. Both AH-deficient lines gained a highly persistent VSP1/2 expression, particularly marked for VSP2 in *2ah*. This behaviour was accompanied by a lower weight gain by *S. littoralis* larvae in *2ah*, but not in *5ko*, despite of its massive JA-Ile content. The situation with antimicrobial resistance also revealed a strong distortion of the usually linear relationship between hormone, defense, and resistance levels, as the high JA-Ile-accumulating lines *2ah* and *5ko* exhibited reduced ORA59/PDF1.2 defense signalling and WT *B. cinerea* resistance. In contrast, *3cyp*, while maintaining JA-Ile levels similar to WT, was able to better defend against the fungus, as reported earlier (Aubert et al., 2015). In this line, the behaviour of the ORA59-PDF1.2 module or camalexin levels was normal and does not seem to account for the better tolerance. Nevertheless, this result shows that improved JA-dependent resistance can arise without an apparent over-accumulation of JA-Ile in a whole-leaf analysis.

The JA-Ile regulatory network is complex and sets in motion cascades of positive and negative transcriptional regulators (Hickman

Wound/Insect					
Mutant genotype	Impaired pathway	JA-Ile levels	Defense transcript induction	Repressor transcript induction	Resistance phenotype
<i>3cyp</i>	oxidation	+	0	++	--
<i>2ah</i>	deconjugation	+	++	0	+
<i>5ko</i>	both	+++	+	++	0

<i>B. cinerea</i> infection					
Mutant genotype	Impaired pathway	JA-Ile levels	Defense transcript induction	Repressor transcript induction	Resistance phenotype
<i>3cyp</i>	oxidation	0	0	0	+
<i>2ah</i>	deconjugation	++	-	+	0/+
<i>5ko</i>	both	++	-	+	0

FIGURE 6 Relationships between impaired JA-Ile catabolism, JA-Ile levels, defense/repressor gene induction, and resistance to attackers. The correlations show distinct circuitry for the two leaf responses analyzed. The signs -, 0, or + indicate lower, equal, or increased response, respectively, in stimulated mutant genotypes compared to WT. The two catabolic pathways have differential contributions to JA-Ile turnover in response to wounding or infection. JA-Ile accumulation is enhanced to different extents, except in infected *3cyp*, and this has variable consequences on defense amplitude and resistance to aggressors. The trend emerging is that impaired hormone catabolism does, with or without JA-Ile overaccumulation, result in better defense/resistance, only if negative effectors like JAZ or JAM are themselves not overinduced [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

et al., 2017). We hypothesized that known elements defining negative feedback loops may counteract effects of chronic JA-Ile over-accumulation to restrain defense induction. This notion was introduced earlier for some JAZ genes in single or double mutants of one pathway, but its relevance was difficult to assess in single biological situations investigated in a limited set of genetic backgrounds (Aubert et al., 2015; Heitz et al., 2012; Koo et al., 2011; Widemann et al., 2013). Here, we surveyed three gene families of characterized transcriptional repressors in the JA pathway in the different pathway/genotype/stress combinations: in addition to several JAZ, we also analyzed expression of JAM, a second type of negative regulator inhibiting transcription of JA-Ile- and MYC-regulated genes (Liu et al., 2019; Sasaki-Sekimoto et al., 2013), and JAV1, that directs a calcium-sensitive complex repressing JA responses (Yan et al., 2018). We found a robust negative correlation spanning both pathosystems between the behaviour of several JAZ, JAM, and JAV1 genes and the amplitude and timing of defense response under impaired JA-Ile turnover (summarized in Figure 6). We selected JAZ genes that were previously found to be sensitive to altered JA-Ile homeostasis (Aubert et al., 2015; Heitz et al., 2012). JAZ8, JAZ10, JAM1 and JAM2, and JAV1 expression persisted longer than in WT in *3cyp* and *5ko* after wounding, but strikingly behaved like WT in *2ah*, correlating in this latter line with more sustained VSP expression and poorer feeding by *S. littoralis* larvae. In the case of *B. cinerea* infection, a similar logic was respected, but in different genotypes. Both *2ah* and *5ko* displayed significantly higher than WT expression of either JAZ or JAM or both repressor genes, but remarkably, this was not observed in *3cyp*. This pattern correlated well with the former lines showing low defense and WT necrotic lesion sizes, and *3cyp* maintaining WT defense and being more resistant to infection. In *3cyp*, *ORA59-PDF1.2* as well as camalexin accumulation behaved like in WT, so other defense determinants must account for the better resistance. In summary, we established that impairing the JA-Ile catabolic pathways has contrasted signalling consequences in Arabidopsis: a gain in defensive/resistance capacity is recorded compared to WT only when JAZ/JAM type repressor genes are not themselves overinduced, and this does not necessarily require higher hormone accumulation. In most situations, impaired JA-Ile turnover triggers a syndrome of negative feedback that likely prevents excessive signalling and that can even result in lower-than-WT defense (Poudel et al., 2016).

The impacts of rewiring genetically JA-Ile catabolic capacity may vary between plant species and needs further investigations. For example, the oxidative or deconjugation pathway was silenced transiently (CYP94) or stably (JIH) in *N. attenuata*, and enhanced JA-Ile-dependent defenses and insect resistance were described in two studies (Luo et al., 2016; Woldemariam et al., 2012). We showed that it is possible to genetically extend the half-life and amplitude of JA-Ile pulses in Arabidopsis, but the precise mechanism underlying control of signalling when JA-Ile catabolism is impaired remains unknown. Emerging evidence indicates that distinct COI1-JAZ co-receptors have different JA-Ile detection thresholds (Chini et al., 2016; Takaoka et al., 2019) and modified JA-Ile homeostasis may selectively alter the output of some of these sensors. The mechanism directing conditional

feedback hyperinduction of JAZ/JAM genes is currently unknown. JA signalling is embedded in highly hierarchized hormonal networks, such as synergy with ET upon necrotroph attack, or with ABA upon wounding or herbivory, and these variable integration nodes may impact the outcome (Pieterse et al., 2012). We addressed the possible influence of these hormonal interactions by submitting young seedlings to JA treatment combined with either the ET precursor ACC or with ABA. Although a consistent but unexplained enhanced induction of both defense and repressor genes was observed in *3cyp*, this hormone feeding experiment could not reproduce the genotype-specific responses arising after wounding or infection stress. Therefore, these latter cannot be explained by a simple ET vs ABA dichotomy in the integration of JA responses.

It is remarkable that all studied mutant lines, including the newly generated *5ko* defective in all known JA-Ile-catabolising enzymes, were undistinguishable from WT in their vegetative growth under standard conditions (Figure S6). This raises the question of the homeostasis of JAs and the regulation of target genes in non-stimulated leaves in these genotypes. Metabolic and molecular analysis revealed that although untouched leaves harbor a much quieter JA metabolism/signalling, a similar negative feedback operates before stress. Basal levels of stress markers are prone to fluctuations among replicates due to unintended stress during plant cultivation, but increases in steady-state JA/JA-Ile levels could be measured, particularly in *3cyp* (and *5ko*), and those were correlated with higher MYC2 and ORA59 transcripts (Figure S5). Hence, the action of these TFs must be somehow blocked because their target transcripts were lower than in WT, while all repressor transcripts were upregulated in mutants. These observations indicate that JA-Ile catabolism is needed on trace hormone levels to ensure optimal regulation and responsiveness to further stress. This situation is in marked contrast with the metabolic sink defined upstream of JA-Ile formation by JAOs (Figure 1). The single mutation of JAO2 enhances basal JA-Ile-dependent defense and strongly increases pathogen resistance (Heitz, Smirnova, Marquis, & Poirier, 2019; Smirnova et al., 2017).

The fact that blocking either of two catabolic pathways acting on the same JA-Ile substrate has distinct signalling and physiological outcomes suggest that signalling is not mediated solely through the control of JA-Ile steady-state levels. Modified abundance of its catabolites may also contribute to alter the signalling process(s). Recent papers reported that in addition to JA-Ile, 12OH-JA-Ile was an active jasmonate signalling through COI1 and contributing to wound responses (Jimenez-Aleman et al., 2019; Poudel et al., 2019). Such an interpretation would be consistent with metabolic and defensive features of *2ah* in wound/insect responses, but not with *3cyp* in the *Botrytis* assay. In addition, one must keep in mind that IAR3 also accepts auxin conjugates as substrates, which may also be at the basis of hormonal cross-talk and alter signalling (Widemann et al., 2013; Zhang et al., 2016). Elucidating the factors determining when negative regulators take control will be of major importance to maximize the potential output of JA-regulated defenses. This provides the ground for future work at the protein, promoter, and chromatin levels to determine how inhibitory mechanisms could be at work.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J. Browse (WSU, Pullman, USA) for providing a segregating population of *iar3-5 ill6-2* line. CNRS, grants ANR-12-BSV8-005 from the Agence Nationale de la Recherche and IdEx-2014-208e Interdisciplinary grant from Université de Strasbourg and CNRS, Université de Strasbourg and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to T.H. Swiss National Science Foundation grant number 31003A_169278 to P.R.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Thierry Heitz  <https://orcid.org/0000-0001-6238-8264>

REFERENCES

- Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F., & Heitz, T. (2015). CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to *Botrytis cinerea* infection. *Journal of Experimental Botany*, *66*(13), 3879–3892. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv190>
- Berr, A., McCallum, E. J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T. & Shen, W. H. (2010) Arabidopsis histone methyltransferase SETDOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol*, *154*, 1403–1414.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, *60*, 183–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092007>
- Bruckhoff, V., Haroth, S., Feussner, K., König, S., Brodhun, F., & Feussner, I. (2016). Functional characterization of CYP94-genes and identification of a novel Jasmonate catabolite in flowers. *PLoS One*, *11* (7), e0159875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159875>
- Campos, M. L., Kang, J. H., & Howe, G. A. (2014). Jasmonate-triggered plant immunity. *Journal of Chemical Ecology*, *40*(7), 657–675. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0468-3>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., ... Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, *448*(7154), 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Chung, H. S., Koo, A. J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2008). Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, *146*(3), 952–964. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115691>
- Fernandez-Calvo, P., Chini, A., Fernandez-Barbero, G., Chico, J. M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., ... Solano, R. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell*, *23*(2), 701–715. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080788>
- Gidda, S. K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., & Varin, L. (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(20), 17895–17900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211943200>
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E. E., & Wolfender, J. L. (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in Arabidopsis in response to wounding. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(24), 16400–16407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801760200>
- Guo, Q., Major, I. T., & Howe, G. A. (2018). Resolution of growth-defense conflict: Mechanistic insights from jasmonate signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, *44*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.009>
- Havko, N. E., Major, I. T., Jewell, J. B., Attaran, E., Browse, J., & Howe, G. A. (2016). Control of carbon assimilation and partitioning by Jasmonate: An accounting of growth-Defense Tradeoffs. *Plants (Basel)*, *5*, pii: E7. <https://doi.org/10.3390/plants5010007>
- Heitz, T., Smirnova, E., Marquis, V., & Poirier, L. (2019). Metabolic control within the Jasmonate biochemical pathway. *Plant & Cell Physiology*, *60* (12), 2621–2628. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz172>
- Heitz, T., Smirnova, E., Widemann, E., Aubert, Y., Pinot, F., & Menard, R. (2016). The rise and fall of Jasmonate biological activities. *Sub-Cellular Biochemistry*, *86*, 405–426. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_16
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Desaubry, L., ... Pinot, F. (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone Jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(9), 6296–6306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316364>
- Hickman, R., Van Verk, M. C., Van Dijken, A. J. H., Mendes, M. P., Vroegop-Vos, I. A., Caarls, L., ... Van Wees, S. C. M. (2017). Architecture and dynamics of the jasmonic acid gene regulatory network. *Plant Cell*, *29*(9), 2086–2105. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00958>
- Hu, P., Zhou, W., Cheng, Z., Fan, M., Wang, L., & Xie, D. (2013). JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense. *Molecular Cell*, *50*(4), 504–515. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.027>
- Jimenez-Aleman, G. H., Almeida-Trapp, M., Fernandez-Barbero, G., Gimenez-Ibanez, S., Reichelt, M., Vadassery, J., ... Solano, R. (2019). Omega hydroxylated JA-Ile is an endogenous bioactive jasmonate that signals through the canonical jasmonate signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1864*(12), 158520. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158520>
- Kawai, Y., Ono, E., & Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, *78*(2), 328–343. <https://doi.org/10.1111/tpj.12479>
- Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., ... Matsuura, H. (2011). Arabidopsis CYP94B3 encodes jasmonoyl-L-isoleucine 12-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of jasmonate. *Plant & Cell Physiology*, *52*, 1757–1765. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr110>
- Koo, A. J., Cooke, T. F., & Howe, G. A. (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(22), 9298–9303. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103542108>
- Koo, A. J., & Howe, G. A. (2012). Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00019>
- Koo, A. J., Thireault, C., Zemelis, S., Poudel, A. N., Zhang, T., Kitaoka, N., ... Howe, G. A. (2014). Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(43), 29728–29738. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603084>
- Liu, Y., Du, M., Deng, L., Shen, J., Fang, M., Chen, Q., ... Zhai, Q. (2019). MYC2 regulates the termination of Jasmonate Signaling via an

- autoregulatory negative feedback loop. *Plant Cell*, 31(1), 106–127. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00405>
- Luo, J., Wei, K., Wang, S., Zhao, W., Ma, C., Hettenhausen, C., ... Wang, L. (2016). COI1-regulated hydroxylation of Jasmonoyl-L-isoleucine impairs *Nicotiana attenuata*'s resistance to the generalist herbivore *Spodoptera litura*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(14), 2822–2831. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b06056>
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., & Wasternack, C. (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *The New Phytologist*, 177(1), 114–127. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02252.x>
- Mizutani, M., & Ohta, D. (2010). Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112305>
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Piotrowska, A., & Bajguz, A. (2011). Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry*, 72(17), 2097–2112. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.012>
- Poudel, A. N., Holtsclaw, R. E., Kimberlin, A., Sen, S., Zeng, S., Joshi, T., ... Koo, A. J. (2019). 12-Hydroxy-jasmonoyl-L-isoleucine is an active jasmonate that signals through CORONATINE INSENSITIVE 1 and contributes to the wound response in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, 60, 2152–2166. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz109>
- Poudel, A. N., Zhang, T., Kwasniewski, M., Nakabayashi, R., Saito, K., & Koo, A. J. (2016). Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta*, 1861(9 Pt B), 1396–1408. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.03.006>
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., ... Shirasu, K. (2013). Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 163(1), 291–304. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220129>
- Schweizer, F., Fernandez-Calvo, P., Zander, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., ... Reymond, P. (2013). *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell*, 25(8), 3117–3132. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115139>
- Smirnova, E., Marquis, V., Poirier, L., Aubert, Y., Zumsteg, J., Menard, R., ... Heitz, T. (2017). Jasmonic acid oxidase 2 hydroxylates Jasmonic acid and represses basal Defense and resistance responses against *Botrytis cinerea* infection. *Molecular Plant*, 10(9), 1159–1173. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.010>
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16(8), 2117–2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>
- Takaoka, Y., Nagumo, K., Azizah, I. N., Oura, S., Iwahashi, M., Kato, N., & Ueda, M. (2019). A comprehensive in vitro fluorescence anisotropy assay system for screening ligands of the jasmonate COI1-JAZ co-receptor in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(13), 5074–5081. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006639>
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., ... Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661–665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in annals of botany. *Annals of Botany*, 111, 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wasternack, C., & Song, S. (2017). Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1303–1321. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
- Widemann, E., Miesch, L., Lukan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., ... Heitz, T. (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31701–31714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499228>
- Widemann, E., Smirnova, E., Aubert, Y., Miesch, L., & Heitz, T. (2016). Dynamics of Jasmonate metabolism upon flowering and across leaf stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants (Basel)*, 5, pii: E4. <https://doi.org/10.3390/plants5010004>
- Woldemariam, M. G., Onkokesung, N., Baldwin, I. T., & Galis, I. (2012). Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *The Plant Journal*, 72(5), 758–767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05117.x>
- Yan, C., Fan, M., Yang, M., Zhao, J., Zhang, W., Su, Y., ... Xie, D. (2018). Injury activates Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for Jasmonate biosynthesis. *Mol Cell*, 70(1), 136–149.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.013>
- Zhang, T., Poudel, A. N., Jewell, J. B., Kitaoka, N., Staswick, P., Matsuura, H., & Koo, A. J. (2016). Hormone crosstalk in wound stress response: Wound-inducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(7), 2107–2120. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv521>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Marquis V, Smirnova E, Poirier L, et al. Stress- and pathway-specific impacts of impaired jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) catabolism on defense signalling and biotic stress resistance. *Plant Cell Environ*. 2020;43:1558–1570. <https://doi.org/10.1111/pce.13753>

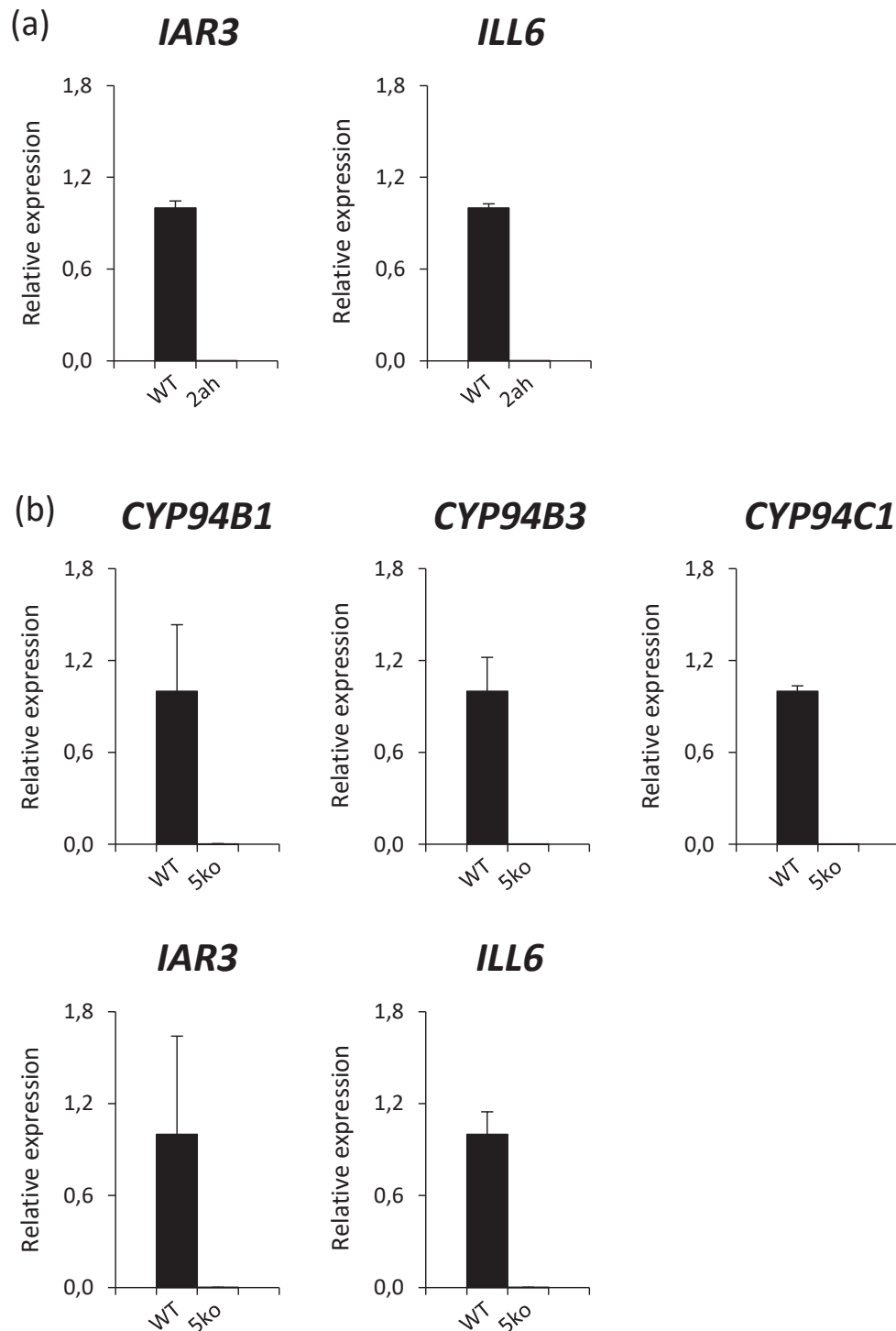


FIGURE S1. Characterization of 2ah and 5ko mutant lines used in this study. Expression of *CYP94B1*, *CYP94B3*, *CYP94C1*, *IAR3* and *ILL6*, in WT, 2ah (a) and 5ko (b) mutant lines. Plants genotyped as homozygous were wounded and leaves were sampled after 1 h. RNA was extracted, and expression was analyzed by RT-qPCR using gene-specific primers and normalized using *EXP* and *GAPDH* reference genes. Expression in mutants is relative to expression in WT that was set to 1. The gene expression levels in three biological replicates were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. Histograms represent mean expression of 3 biological replicates \pm SD.

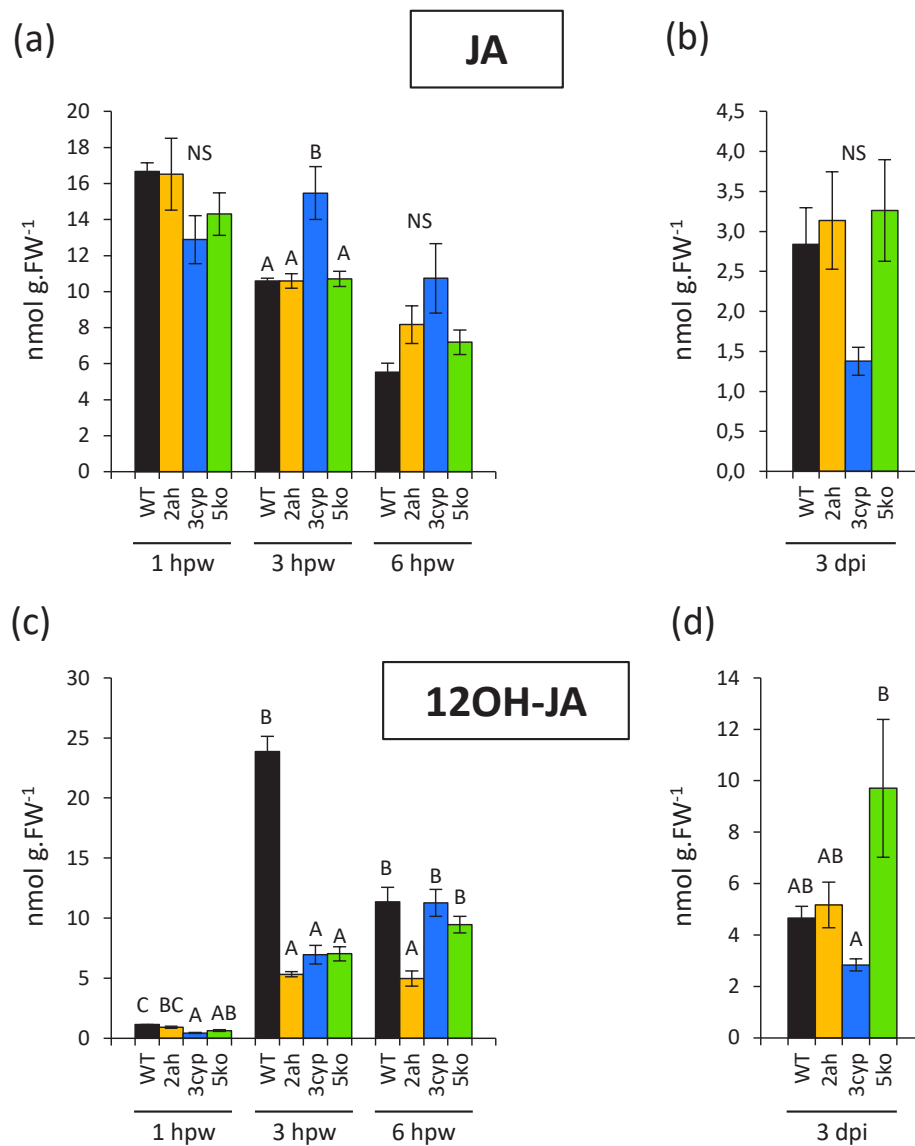


FIGURE S2. Jasmonate profiles in JA-Ile catabolic pathway mutants after wounding or *Botrytis cinerea* infection.

Six-week-old plants were either wounded (a,c) or drop-inoculated on two sites per leaf with a suspension containing 2.5×10^6 fungal spores mL^{-1} (b,d). Leaves were harvested at 1, 3 and 6 h post wounding (hpw) or 3 days post inoculation (dpi) in WT (black bars), *2ah* (yellow bars), *3cyp* (blue bars) and *5ko* (green bars) mutants and jasmonates were extracted and quantified by LC-MS/MS. JA and 12OH-JA levels were expressed in nmol g^{-1} fresh weight (FW). Histograms represent the mean \pm SEM of three (wounding) or four (*B. cinerea*) biological replicates. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes at each time point as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $P < 0.05$.

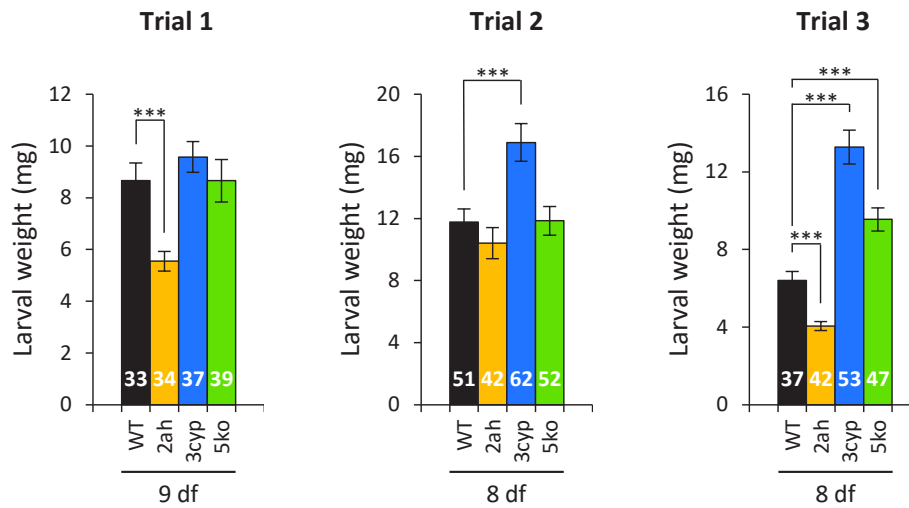


FIGURE S3. Susceptibility of WT, 2ah, 3cyp and 5ko mutant lines to *Spodoptera littoralis* feeding. Freshly hatched *Spodoptera littoralis* larvae were placed on each genotype and larval weight was measured after 8 or 9 days of feeding (df) as indicated. Shown are mean \pm SEM for 3 independent trials. The number of larvae measured for each population is indicated within the bars. Asterisks indicate a significant difference as determined by Student's *t* test (***) $P < 0.001$

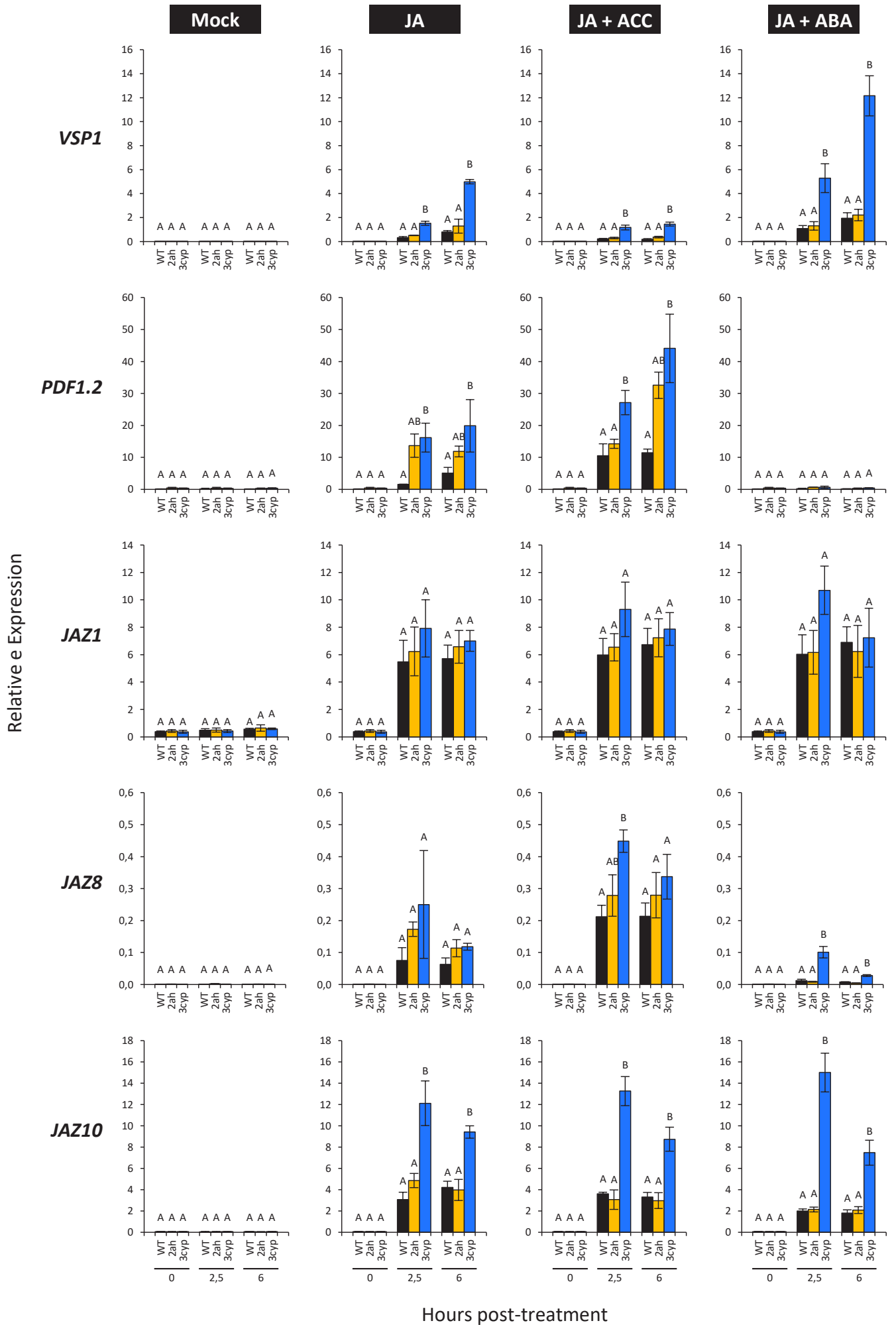


FIGURE S4. Legend: see following page

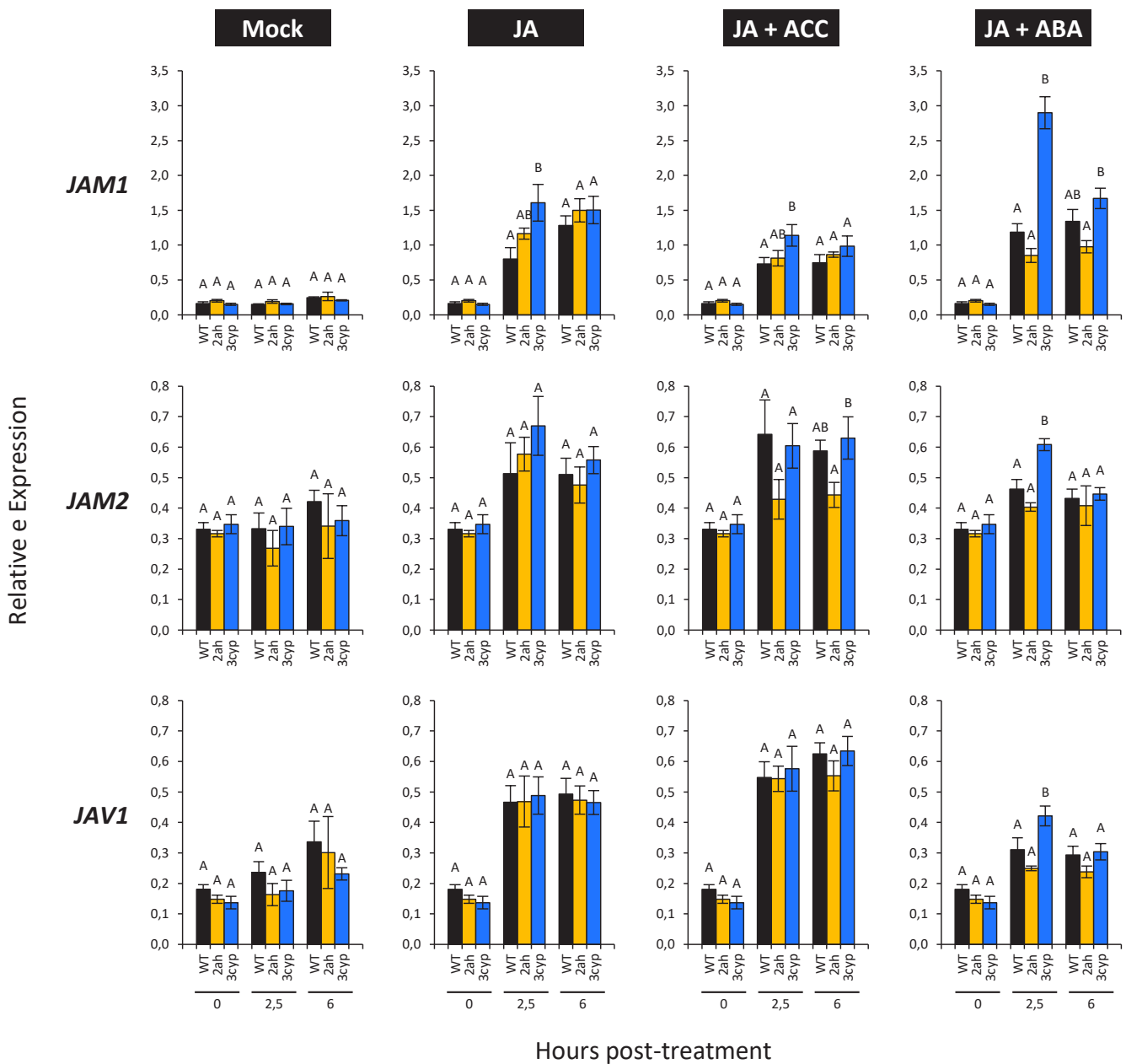


FIGURE S4. Gene expression in seedlings after hormone treatment. Seedlings were cultivated in liquid MS medium for 7 days. Seedlings were then treated with indicated hormones at 15 μ M each and harvested at the time indicated (hours) for RNA extraction. Relative gene expression was determined by real-time PCR using gene-specific primers and normalized using *EXP* and *TIP41* reference genes. Transcript quantification was performed on three biological replicates analyzed in duplicate. Histograms represent mean expression \pm SEM. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes at each time point as determined by one-way ANOVA with Tukey posthoc test, $P < 0.05$.

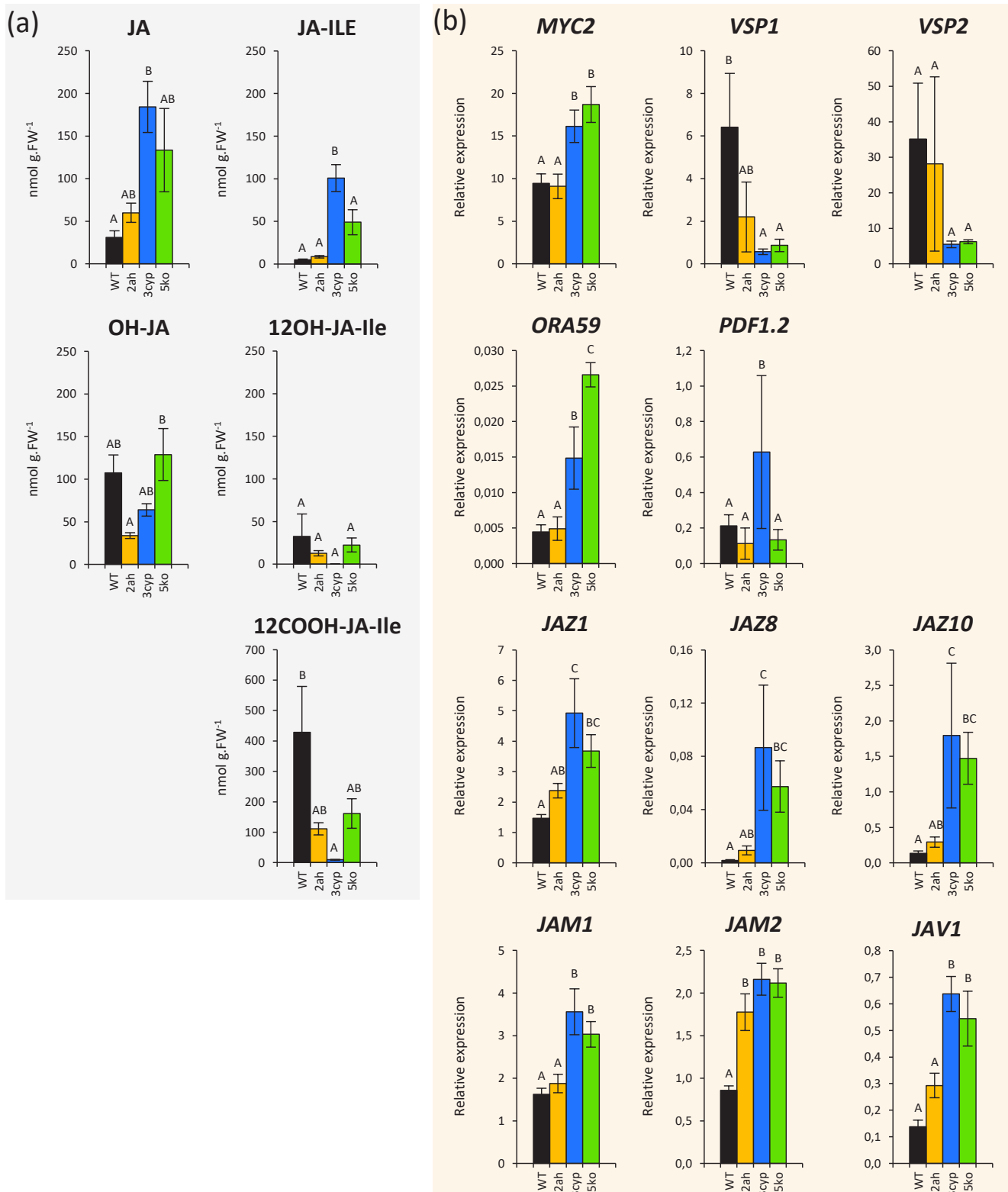


FIGURE S5. Basal jasmonate content (a) and expression profiles of jasmonate-regulated defense genes (b) in unstimulated leaves of WT (black bars), 2ah (yellow bars), 3cyp (blue bars) and 5ko (green bars) lines. Jasmonates were extracted and quantified by LC-MS/MS and accumulation levels were expressed in nmol g⁻¹ of fresh weight. Relative expression of each target gene determined by real-time qPCR using gene-specific primers and normalized using *EXP* and *TIP41* reference genes on three biological replicates analyzed in triplicate. Histograms represent mean expression \pm SEM of three biological replicates. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $P < 0.05$ (a) and $P < 0.01$ (b).

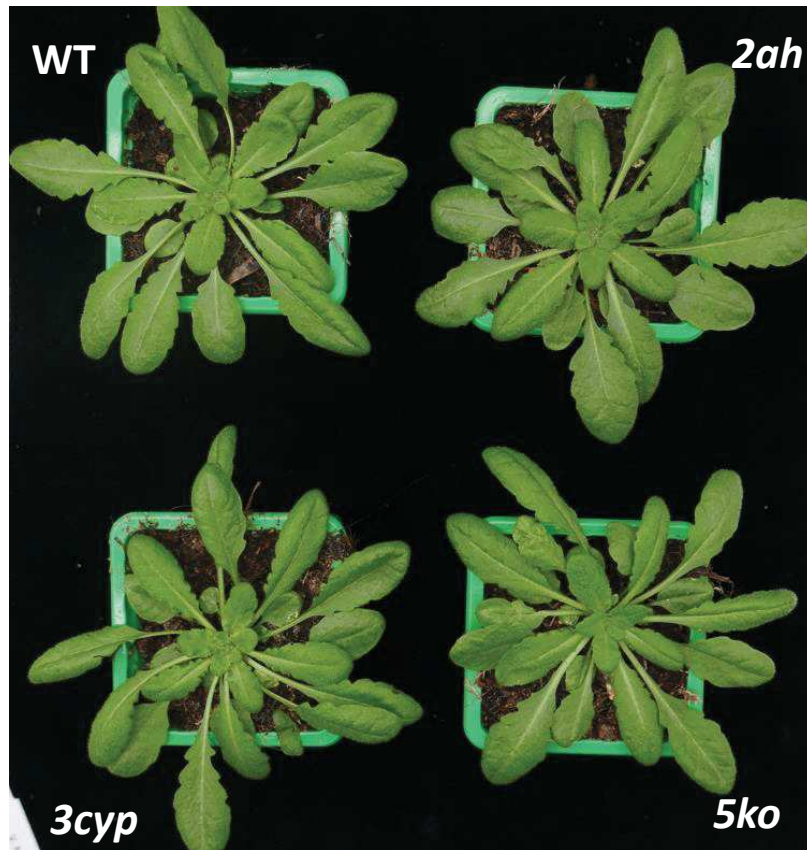


FIGURE S6. Aspect of 7-week old plants of the 4 genotypes used in the study.

Table S1. Primers used in the study

qPCR			
Gene/allele	Locus	Primer name	Sequence (5' -> 3')
<i>EXP</i>	At4g26410	At4g26410-qPCR_F	gagctgaagtggcttcaatgac
		At4g26410-qPCR_R	gggccgacatacccatgatcc
<i>TIP4.1</i>	At4g34270	TIP41_LP	gtgaaaactgttgagagaagcaa
		TIP41_RP	tcaactggatacccttctgca
<i>MYC2</i>	At1g32640	E49-MYC2-L	gccgaaggaatacacgcaat
		E50-MYC2-R	cgggttgtaacgggcta
<i>VSP1</i>	At5g24780	VSP1-F	ccgtcaatgtttggatctttg
		VSP1-R	gctgtgtctcggctccata
<i>VSP2</i>	At5g24770	VSP2_qPCR for	gggtcccgcaaattgcaaagacta
		VSP2_qPCR rev	ggttgatgctccggtccctaacca
<i>ORA59</i>	At1g06160	ORA59_qPCR for new	ttcgacgttgacatcttctcc
		ORA59_qPCR rev new	tcttgctcataacaacactctg
<i>PDF1.2</i>	At5g44420	E39-PDF1.2-L	cacccttatctcgtctctt
		E40-PDF1.2-R	tacacttggtgctgggaagac
<i>JAZ1</i>	At1g19180	JAZ1-F	ttctgagttcgtcggtagcc
		JAZ1-R	cacgtctgtgagaagctagcc
<i>JAZ8</i>	At1g30135	JAZ8-F	aatgtgttttctcagatgtacc
		JAZ8-R	ttctctgctgcatcgatatt
<i>JAZ10</i>	At5g13220	JAZ10-F	cgctcctaagcctaagttcca
		JAZ10-R	tttcgaaatcgaccttgaat
<i>JAM1</i>	At2g46510	JAM1_qPCR for	ggagctcacgcgtatcctaa
		JAM1_qPCR rev	ggattcgaagaagcagcaac
<i>JAM2</i>	At1g01260	JAM2_qPCR for	gaggccaatcaacgtgaagg
		JAM2_qPCR rev	tcccctcctcttccatc
<i>CYP94B1</i>	At5g63450	CYP94B1_qPCR F62	caatgaggcttaccaccag
		CYP94B1_qPCR R62	aaatgtcgtcgtttgctgcat
<i>CYP94B3</i>	At3g48520	CYP94B3_qPCR F62	tggcttacacgaaggctgtc
		CYP94B3_qPCR R62	agtcccacgaaactggaggat
<i>CYP94C1</i>	At2g27690	CYP94C1_qPCR F63	ggcccggattacgaagagttt
		CYP94C1_qPCR R63	ggccggaacttaccttctgtt
<i>IAR3</i>	At1g51760	IAR3-0,4F	gttgctttaaggctgatatgg
		IAR3-N69047-R	accgagaagcatcgtagtgtga
<i>ILL6</i>	At1g44350	ILL6-GK212E12-F	gtgtcccatatccatccaacgg
		ILL6-GK212E12-R	agactaatgaccggaagaag
<i>Actin2</i>	At3g18780	Act for	cttgaccaagcagcatgaa
		Act rev	ccgatccagacactgtacttctt
<i>UBQ10</i>	At4g05320	UBQ10 for	ggccttgataatccctgatgataag
		UBQ10 rev	aaagagataacaggaacggaaacatagt
<i>Cutinase</i>	B.c Z69264	CutA-L	gatgtgacggtcatctttgcc
		CutA-R	agatttgagagcggcgagg
T-DNA genotyping			
Gene/allele		Primer name	Sequence (5' -> 3')
		LBb1.3 (SALK)	atittgccgattcggaaac
		GABI8409LB	atattgaccatcactacttctg
<i>cyp94b1-1</i>		94B1-LP	tcgaaatcactgtctctctcc
		94B1-RP	gggaattcactttcgaatcc
<i>cyp94b3-1</i>		CYP94B3-0,72F	gaacgtgggaagcagaggaagc
		BO1BG68	tggtttggttctcactgttcc
<i>cyp94c1-1</i>		SALK_055455 LP	tgctttttggaaagtagcacc
		SALK_055455 RP	gattccacggcctaaagatc
<i>iar3-5 iar3-7</i>		Salk_069047-LP	gttctccacgtgcttatagc
		Salk_069047-RP	aaaaagccacactgttccatg
<i>ill6-1</i>		GK412E11-LP	gactatgcttctgtgctgtc
		GK412E11-RP	cgcacctcttgaatacgtttc
<i>ill6-2</i>		SALK_024894-LP	gactatgcttctgtgctgtc
		SALK_024894-RP	cgcacctcttgaatacgtttc

**CHAPITRE III.
RÉSULTATS PARTIE 2**

**CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE
ACTIVITÉ D'OXYDATION DE L'ACIDE
JASMONIQUE**

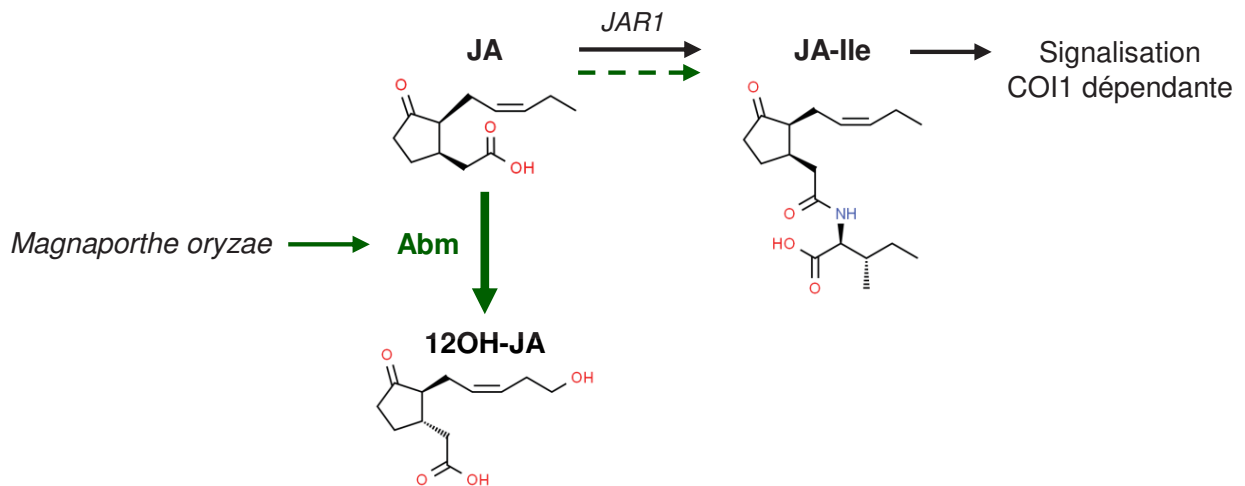


Figure 3.1. Le détournement métabolique de la défense par *Magnaporthe*.

En réponse à un nécrotrophe le JA est converti en JA-Ile par JAR1 pour induire la signalisation COI1 dépendante et les réponses de défenses associées. Le pathogène *Magnaporthe oryzae* produit l'oxygénase Abm qui permet d'oxyder le JA en hydroxy-JA ce qui apparaît comme bloquant l'induction de la signalisation JA-Ile (Patkar *et al.*, 2015). Il n'est pas encore démontré comment ce mécanisme moléculaire bloque la signalisation JAs, mais ça permet une meilleure prolifération pour le champignon (Patkar *et al.*, 2015).

12OH-JA = 12-hydroxy-jasmonate ; COI1 = *Coronatine-insensitive 1* ; JA-Ile = (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine ; JA = acide (-)-jasmonique ; JAR1 = *jasmonate resistant 1*.

Rang	Score	Nom
1	1	CYP94C1
2	0,66	JAZ10
3	0,65	JAZ5
4	0,60	JAZ7
5	0,60	2-ODD (At5g05600)
...
8	0,58	AOC3
...
11	0,57	2-ODD (At2g38240)
12	0,56	ILL6
...
14	0,55	LOX3
...
20	0,52	OPR3
...
65	0,44	CYP94B1
...
86	0,42	2-ODD (At3g55970)
...
98	0,41	CYP94B3

Figure 3.2. Liste de gènes coréglés avec CYP94C1.

La liste de co-régulation a été établie à partir des données de *microarray* disponible sur le logiciel Genevestigator (<https://genevestigator.com/>) en utilisant le gène CYP94C1 en tant qu'appât en réponse aux stress ou perturbations. Cet outil a révélé que l'expression de trois dioxygénases 2-ODDs est coréglée avec celle des gènes de la biosynthèse (AOC3, OPR3, et LOX3), du catabolisme (ILL6, CYP94B1, et CYP94B3) et de la signalisation (JAZ1, 5, 7, 8 et 10) des jasmonates.

2-ODD = 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases ; AOC = allène oxydes cyclase ; CYP94 = cytochrome P450 de la famille 94 ; ILL6 = *IAA-leucine resistant (ilr)-like gene 6* ; JAZ = *jasmonate-zim domain* ; LOX3 = lipoxygénase 3 ; OPR3 = 12-oxophytodiénoate réductase 3.

III. Résultats partie 2 : Caractérisation d'une nouvelle activité d'oxydation de l'acide jasmonique

1. Introduction

Le 12OH-JA est un dérivé du JA connu de longue date et commun à de nombreuses espèces végétales (Miersch et al., 2008). Sa biosynthèse dans les plante est restée longtemps mystérieuse avant qu'une première voie de formation ait été caractérisée au laboratoire, et procédant via les intermédiaires conjugués JA-Ile et 12OH-JA-Ile (Figure 1.8). Néanmoins l'abolition d'une ou plusieurs enzymes dans cette voie indirecte ne réduit que partiellement l'accumulation du 12OH-JA après blessure foliaire (Widemann et al., 2013; Aubert et al., 2015). Ces résultats renforcent une suspicion ancienne mais jamais démontrée de l'existence d'une voie de formation de ce composé par oxydation directe du JA (Figure 1.8). Par ailleurs, chez le riz, le champignon nécrotrophe *Magnaporthe oryzae* produit une mono-oxygénase appelée **Abm** qui oxyde le JA endogène en hydroxy-JA ou 12OH-JA (Figure 3.1) ce qui démontre la possibilité de l'oxydation directe de ce composé et son importance biologique potentielle (Patkar et al., 2015). Cette oxydation causée par le parasite est décrite comme atténuant la signalisation défensive végétale afin de favoriser l'infection, les auteurs ont posé l'hypothèse que le 12OH-JA pourrait avoir un effet répressur de la signalisation, mais sans l'expliquer (Patkar et al., 2015). Alors que nous travaillions déjà sur l'identification d'oxydases de JA, cette publication suggérait que l'oxydation de JA pouvait avoir un impact sur l'issue de l'interaction plante-pathogène.

La recherche de la voie de formation directe de 12OH-JA a été initiée par E. Smirnova, une post-doctorante du laboratoire. Au démarrage de ma thèse en septembre 2016, la caractérisation était déjà bien avancée mais nécessitait encore beaucoup de travail et il a donc été décidé que ma première année serait exclusivement consacrée à ce projet prioritaire, dans un effort conjoint avec E. Smirnova. La recherche de gènes candidats par l'expression de données de co-régulation n'a pas permis de révéler de cytochrome P450 candidat (Figure 3.2). L'utilisation des outils de corégulation est très utile pour identifier de nouveaux gènes dans les voies métaboliques, particulièrement pour les voies hormonales très dynamiques au niveau transcriptionnel, comme celle des JAs. Concernant le catabolisme des JAs, l'utilisation d'un gène bien caractérisé comme appât, tel *CYP94C1*, permet de révéler les gènes qui montrent un patron d'expression similaire (Figure 3.2), et de générer des hypothèses fonctionnelles pour des gènes encore non caractérisés. C'est par cette méthode qu'au laboratoire avaient été identifiés *IAR3* et *ILL6* comme gènes candidats pour le clivage du JA-Ile (Figure 1.30). L'outil de corégulation a donc été utilisé pour tenter d'identifier des gènes qui codent pour des

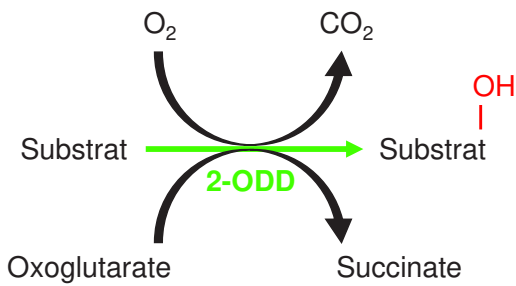


Figure 3.3. Hydroxylation catalysée par les 2-ODD.
L'hydroxylation est la réaction majeure réalisée par les 2-ODD parmi l'ensemble des réactions que peuvent médier ces enzymes. Les 2-ODD utilisent l'oxoglutarate comme cofacteur donneur d'électron qui permet d'activer l'oxygène moléculaire O_2 pour ajouter un groupement hydroxyle sur le substrat. Cette réaction s'accompagne d'un dégagement de CO_2 et de succinate (Farrow et Facchini, 2014; Martinez et Hausinger, 2015).

2-ODD = 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases.

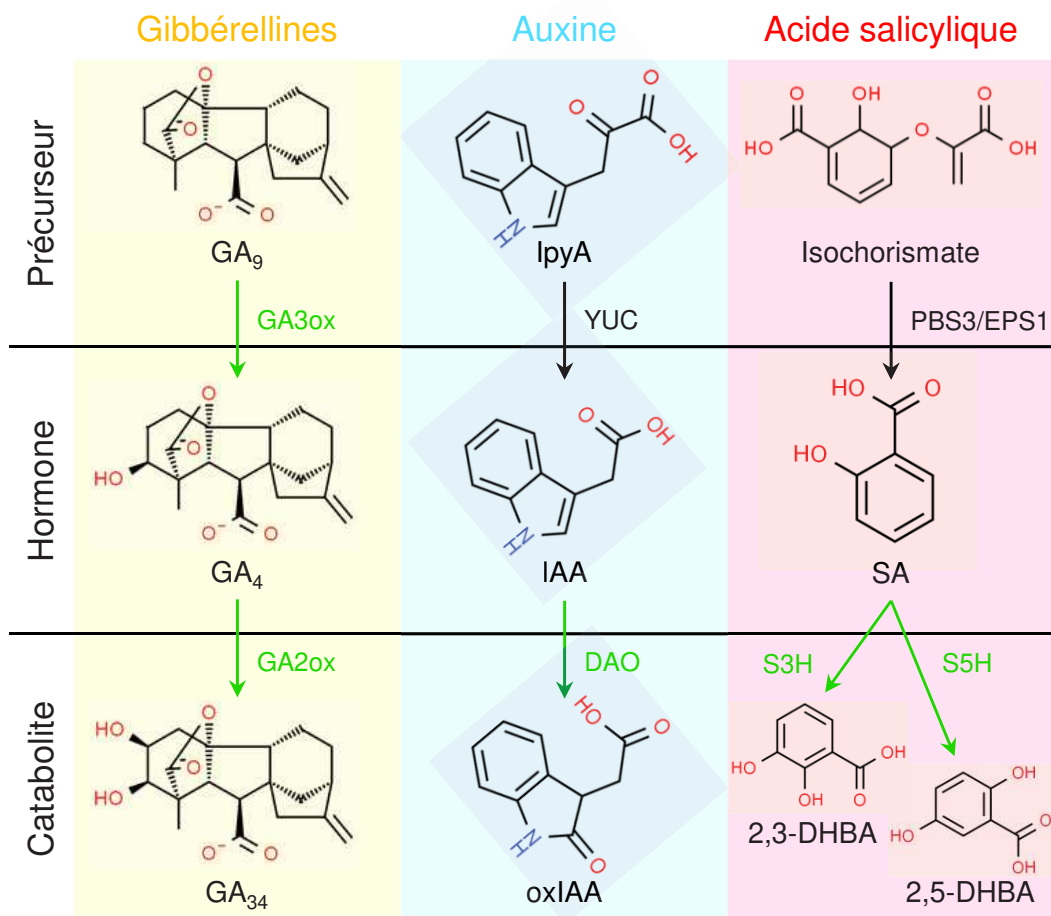


Figure 3.4. Exemples d'hydroxylation par les 2-ODD dans le métabolisme phytohormonale.

Les flèches vertes représentent des étapes enzymatiques catalysées par des 2-ODD.

Basé sur Rieu *et al.*, 2008 ; Hedden et Thomas, 2012 ; Zhang *et al.*, 2013a, 2017 ; Farrow et Facchini, 2014 ; Porco *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Zhang et Peer, 2017 ; Torrens-Spence *et al.*, 2019.

2,3-DHBA = acide 2,3-dihydroxybenzoïque ; 2,5-DHBA = acide 2,5-dihydroxybenzoïque ; 2-ODD = 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases ; DAO = DIOXYGENASE OF AUXIN OXIDATION ; EPS1 = ENHANCED PSEUDOMONAS SUSCEPTIBILITY 1 ; GA = gibbérelline ; GA2ox = GA2 oxydases ; GA3ox = GA3 oxydases ; IAA = acide indole-3-acétique ; IpyA = acide indole-3-pyruvique ; oxIAA = acide 2-oxindole-3-acétique ; PBS3 = *avrPphB susceptible* ; S3H = SA 3-hydroxylase ; S5H = SA 5-hydroxylase ; SA = acide salicylique ; YUC = YUCCA.

enzymes qui pourraient réaliser l'oxydation du JA. Dans les données de corégulation ainsi formées il a été identifié au laboratoire trois gènes codant pour des *2-oxoglutarate-dependent dioxygenases* (**2-ODD**) dont deux présentent une corégulation assez forte avec *CYP94C1* (Figure 3.2).

Les 2-ODD sont des oxydases solubles et représentent la deuxième plus large famille enzymatique des plantes après les CYP, elle compte environ 130 membres chez *Arabidopsis* par exemple (Farrow et Facchini, 2014; Hagel et Facchini, 2018). Ces enzymes utilisent le 2-oxoglutarate comme cosubstrat donneur d'électron ce qui leur a valu leur nom. Les 2-ODD peuvent réaliser une épimérisation, une désaturation ou encore une halogénéation mais leur fonction majeure est l'hydroxylation (Figure 3.3) (Farrow et Facchini, 2014; Martinez et Hausinger, 2015). Ces enzymes sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la réparation de l'ADN, mais elles sont aussi connues dans les voies métaboliques des PhyH (Farrow et Facchini, 2014; Hagel et Facchini, 2018). Par exemple pour les GAs, des 2-ODD sont impliquées autant dans l'anabolisme que dans le catabolisme. La dernière étape de la synthèse des formes bioactives des GAs est catalysée par un clade de plusieurs 2-ODD nommées GA3 oxydases (Figure 3.4) (Hedden et Thomas, 2012; Farrow et Facchini, 2014). La voie majeure de désactivation des GAs est une oxydation médiée par des 2-ODD qui représentent un clade de cinq gènes chez *Arabidopsis* nommés GA2 oxydases (**GA2ox**) (Figure 3.4) (Rieu et al., 2008; Hedden et Thomas, 2012). Les GA2ox présentent une redondance fonctionnelle ce qui démontre l'importance pour la plante de la dégradation des GAs par ces 2-ODD. En effet, seul le quintuple mutant *GA2ox* d'*Arabidopsis* présente entre autres une floraison et une germination précoce ainsi qu'un allongement du pistil sans fécondation (Rieu et al., 2008). Pour l'auxine, l'oxydation est, avec la conjugaison, également une voie majeure de désactivation de l'hormone et est réalisée chez *Arabidopsis* par deux 2-ODD appelées *DIOXYGENASE OF AUXIN OXIDATION 1* (**DAO1**) et DAO2 (Figure 3.4) (Zhang et Peer, 2017). Les DAO agissent de concert avec les enzymes responsables de la conjugaison de l'auxine afin de maintenir la concentration optimale en forme active de l'hormone (Porco et al., 2016). La mutation *dao1* ne cause pas de suraccumulation d'auxine libre, mais celle d'auxine conjuguée inactive (Porco et al., 2016). Néanmoins le mutant *dao1* présente plusieurs phénotypes physiologiques tel une plus grande densité de racines latérales ou encore une fertilité réduite (Porco et al., 2016; Zhang et al., 2016a), ce qui démontre l'importance des 2-ODD dans la dynamique métabolique de l'auxine et de la signalisation associée. Cela se retrouve également pour le SA, parmi les différentes voies de catabolisme connues c'est l'oxydation la voie majoritaire, causée par les SA 3-hydroxylase (**S3H**) et S5H qui sont deux 2-ODD (Figure 3.4) (Zhang et al., 2013, 2017). La mutation de ces gènes de catabolisme entraîne une suraccumulation de SA associée avec une meilleure résistance contre les

Rang	Score	Nom
1	1	ST2a
2	0,55	2-ODD (At3g55970)
3	0,54	2-ODD (At2g38240)
4	0,50	2-ODD (At5g05600)
5	0,49	ILR1
6	0,48	ALDH7B4
7	0,48	ACX1
8	0,46	CCX1
9	0,45	PNC2
10	0,45	PYD1
11	0,45	NAC019
...

Figure 3.5. Liste de gènes coréglés avec ST2a.

La liste de co-régulation a été établie à partir des données de *microarray* disponible sur le logiciel Genevestigator (<https://genevestigator.com/>) en utilisant le gène *ST2a* en tant qu'appât en réponse aux stress ou perturbations. Cet outil a révélé que les trois dioxygénases 2-ODDs présentent un pattern d'expression très proche de celui de *ST2a*, un gène qui code pour une enzyme métabolisant le 12OH-JA (Gidda *et al.*, 2003).

2-ODD = 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases ; AOC = allène oxydes cyclase ; CYP94 = cytochrome P450 de la famille 94 ; ILL6 = IAA-leucine resistant (*ilr*)-like gene 6 ; JAZ = jasmonate-zim domain ; LOX3 = lipoxygénase 3 ; OPR3 = 12-oxophytodiénoate réductase 3.

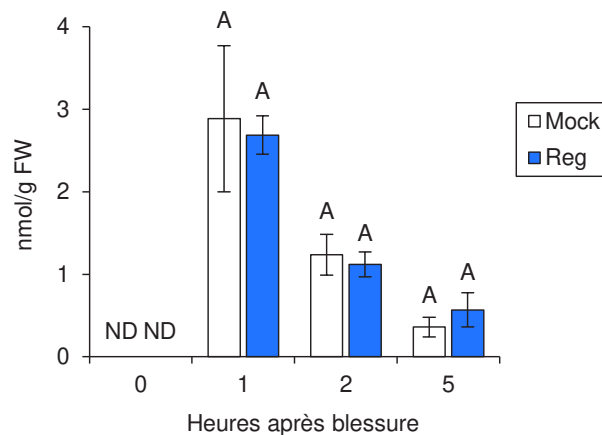


Figure 3.6. Profil d'accumulation de JA-Ile après blessure et traitement au prohexadione-calcium.

Les quantités de JA-Ile en nmol/g de poids frais (FW) à 0, 1, 2 et 5 heures après blessures (hab) dans des feuilles WT traitées avec du Regalis (Reg), contenant le prohexadione-calcium, ou sans (Mock).

L'histogramme représente la moyenne \pm l'écart type de trois réplicas biologiques. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative à un temps donné entre les plantes traitées et non traitées déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). ND = non détecté.

pathogènes biotrophes tel *Pseudomonas syringae*, mais aussi une croissance moindre (Zhang et al., 2017). La surexpression de *S3H* et *S5H* donne les phénotypes inverses, c'est-à-dire une déficience de l'accumulation de SA, une plus grande sensibilité aux biotrophes et une croissance plus importante (Zhang et al., 2017). En résumé la famille enzymatique des 2-ODD présente des membres impliqués dans les voies métaboliques, et principalement cataboliques, phytohormonales et influent fortement sur la signalisation.

Une analyse phylogénique réalisée par Thierry Heitz a démontré que les trois 2-ODD identifiées par l'outil de corégulation avec *CYP94C1* (Figure 3.2) sont phylogénétiquement proche. Il a été supposé que ces trois 2-ODD non caractérisées pourraient avoir un rôle dans le catabolisme des JAs mais une seconde possibilité est que ces trois enzymes sont régulées par la signalisation JAs et interviendraient dans une autre voie métabolique. Une première expérimentation en réponse à la blessure faite par Thierry Heitz a révélé que ces trois gènes sont induits de façon COI1 dépendante par le stimulus, tout comme les *CYP94* et les *AH* (Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013). Ensuite une deuxième recherche de corégulation qui a utilisé comme appât *ST2a* (Figure 3.5) codant la sulfotransférase qui utilise le 12OH-JA comme substrat (Figure 1.9) (Gidda et al., 2003), a démontré que les trois 2-ODD identifiées sur la liste de co-régulation avec *CYP94C1* (Figure 3.2) sont les trois gènes qui ont le patron d'expression le plus proche de *ST2a* (Figure 3.5). Ce résultat renforce l'hypothèse que ces 2-ODD pourraient être impliquées dans une étape de conversion des JAs et probablement que leur action métabolique est proche du 12OH-JA. De plus un traitement des plantes avec du prohexadione-calcium, un inhibiteur chimique générique des 2-ODD (Puhl et al., 2008), résulte en une diminution de l'accumulation de 12OH-JA après blessure (Figure 1C, article) mais pas du JA-Ile (Figure 3.6), ce qui supporte l'hypothèse que les trois 2-ODD identifiées pourraient être liées à l'oxydation directe du JA en 12OH-JA. Comme cette oxydation pourrait impacter la dynamique des JAs et potentiellement influencer les réponses JAs dépendante, ce résultat préliminaire avait initié notre projet de caractérisation de cette voie métabolique et de définir si les trois 2-ODD identifiées sont impliqués. Cette hypothèse a été vérifiée et, sous la pression d'un manuscrit concurrent posté sur BioRxiv (Caarls et al., 2017) nous avons publié nos résultats marquants dans l'article suivant dans lequel je suis co-premier auteur.

2. Publication : Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against *Botrytis cinerea* Infection

Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against *Botrytis cinerea* Infection

Ekaterina Smirnova^{1,3}, Valentin Marquis^{1,3}, Laure Poirier¹, Yann Aubert¹, Julie Zumsteg¹, Rozenn Ménard¹, Laurence Miesch² and Thierry Heitz^{1,*}

¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Laboratoire de Chimie Organique Synthétique, Institut de Chimie, Université de Strasbourg, CNRS, Strasbourg, France

³These authors contributed equally to this article.

*Correspondence: Thierry Heitz (thierry.heitz@ibmp-cnrs.unistra.fr)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.010>

ABSTRACT

Jasmonates (JAs) orchestrate immune responses upon wound/herbivore injury or infection by necrotrophic pathogens. Elucidation of catabolic routes has revealed new complexity in jasmonate metabolism. Two integrated pathways attenuate signaling by turning over the active hormone jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) through ω -oxidation or deconjugation, and define an indirect route forming the derivative 12OH-JA. Here, we provide evidence for a second 12OH-JA formation pathway by direct jasmonic acid (JA) oxidation. Three jasmonic acid oxidases (JAOs) of the 2-oxoglutarate dioxygenase family catalyze specific oxidation of JA to 12OH-JA, and their genes are induced by wounding or infection by the fungus *Botrytis cinerea*. *JAO2* exhibits the highest basal expression, and its deficiency in *jao2* mutants strongly enhanced antifungal resistance. The resistance phenotype resulted from constitutive expression of antimicrobial markers rather than from their higher induction in infected *jao2* plants and could be reversed by ectopic expression of any of the three JAOs in *jao2*. Elevated defense in *jao2* was dependent on the activity of JASMONATE RESPONSE 1 (JAR1) and CORONATINE-INSENSITIVE 1 (COI1) but was not correlated with enhanced JA-Ile accumulation. Instead, *jao2* mutant lines displayed altered accumulation of several JA species in healthy and challenged plants, suggesting elevated metabolic flux through JA-Ile. Collectively, these data identify the missing enzymes hydroxylating JA and uncover an important metabolic diversion mechanism for repressing basal JA defense responses.

Key words: 2-oxoglutarate oxygenase, jasmonic acid, defense regulation, hormone metabolism, Botrytis

Smirnova E., Marquis V., Poirier L., Aubert Y., Zumsteg J., Ménard R., Miesch L., and Heitz T. (2017).

Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against *Botrytis cinerea* Infection. *Mol. Plant.* **10**, 1159–1173.

INTRODUCTION

Jasmonate hormones (JAs) mediate plant developmental processes in reproduction or growth repression, and regulate induced defense responses to biotic or abiotic stress (Koo and Howe, 2009; Pieterse et al., 2012; Wasternack and Hause, 2013; Heitz et al., 2016). Synergistic or antagonistic interactions with other hormone pathways allow JAs to orchestrate adaptive chemical or morphological traits for optimal survival upon stress. Their core biosynthetic pathway is initiated in plastids where linolenic acid, a C18:3 fatty acid, is oxygenated to form an allene oxide intermediate, further cyclized to the first jasmonate compound, 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA). OPDA is then converted to jasmonic acid (JA) in peroxisomes

(Schaller and Stintzi, 2009; Wasternack and Hause, 2013) and released in the cytoplasm.

While initial studies focused on JA as the hormonally active entity (Creelman and Mullet, 1997; Miersch et al., 2008; Heitz et al., 2016), the last decade has provided detailed insights into the requirement of the conjugate jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) and possibly other minor conjugates (Katsir et al., 2008; Koo et al., 2009; Yan et al., 2016) for most JA responses (Browse, 2009; Fonseca et al., 2009). Under resting conditions typically

Published by the Molecular Plant Shanghai Editorial Office in association with Cell Press, an imprint of Elsevier Inc., on behalf of CSPB and IPPE, SIBS, CAS.

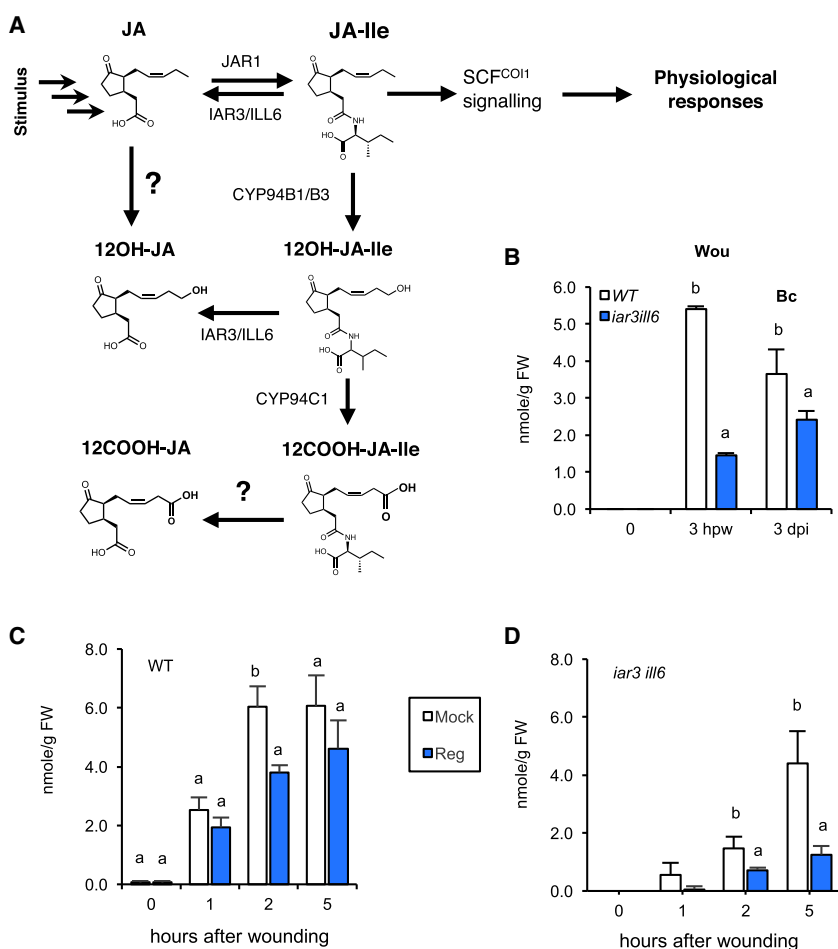


Figure 1. Evidence for Amidohydrolase-Independent, Regalis-Sensitive Formation of 12OH-JA.

(A) Main metabolic conversions in the jasmonate pathway after a stimulus. JA is conjugated to isoleucine (Ile) by JAR1 enzyme. The bioactive hormone JA-Ile is perceived by the SCF^{COI1} complex, leading to target gene derepression and physiological responses. The hormone JA-Ile is inactivated by a two-step oxidation to 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile by the cytochrome P450 enzymes CYP94B3 and CYP94C1, or by conjugate cleavage under the action of the amidohydrolases (AH) IAR3 and ILL6. In addition, these AH also cleave 12OH-JA-Ile to release 12OH-JA. Question marks indicate uncharacterized steps.

(B) 12-OH JA levels at 3 h post-wounding (hpw) or 3 days post-inoculation (dpi) by *B. cinerea* in WT or *iar3-5 ill6-2* double-mutant leaves. Histograms represent the mean \pm SD of three biological replicates. Different letters indicate a significant difference between the two genotypes ($P < 0.01$ for left panel and $P < 0.05$ for right panel).

(C and D) 12OH-JA levels at 1, 2, and 5 hpw in WT (C) or *iar3/ill6* (D) leaves treated with Regalis (Reg) or not (Mock). Histograms represent the mean \pm SD of three biological replicates. Different letters indicate a significant difference at a given time point between treated and not treated plants ($P < 0.05$, one-way ANOVA and Tukey post-hoc test).

JA/abscisic acid stimuli and defines a wound/insect-specific branch reflected by induction of markers such as vegetative storage protein; ERF1/ORAs9 TFs integrate concomitant JA/ethylene signals into a

associated with low JA-Ile levels, target genes are maintained silent by JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) transcriptional repressors and associated co-repressors (Pauwels and Goossens, 2011). JA biosynthesis is triggered within minutes after injury, along with an array of conjugated and/or oxidized derivatives (Glauser et al., 2008; Koo et al., 2009; Wasternack and Hause, 2013; Heitz et al., 2016). Among the many possible JA modifications, its conjugation to isoleucine by the JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1) enzyme constitutes the activation step (Staswick and Tiryaki, 2004) as JA-Ile promotes the assembly of a co-receptor complex whose core components are the F-box adapter CORONATINE-INSENSITIVE 1 (COI1) and JAZ proteins. This complex then engages into the SCF^{COI1} E3 ubiquitin ligase (Figure 1A), tagging JAZ for proteolytic degradation and relieving repression of JA responses (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007).

Specificity in JA signaling with a single bioactive hormone is believed to be achieved through pathway combinatorial modularity involving distinct protein-protein interactions, discrete spatio-temporal expression of specific components, or various hormone thresholds for the formation of diverse receptor complexes (Chini et al., 2016). For example, distinct JA-Ile-triggered networks control inducible defenses against different types of aggressors and are integrated by separate sets of transcription factors (TF). MYC2, a bHLH type TF, integrates simultaneous

microbe-specific branch probed by plant defensin *PDF1.2* or *PATHOGENESIS-RELATED 4 (PR4)* induction (Pieterse et al., 2012; Wasternack and Hause, 2013).

Fluctuations in JA-Ile levels usually direct signal output amplitude, therefore control of JA-Ile abundance and dynamics are critical for proper regulation of responses. For example, synchronous mechanical wounding rapidly generates a transient peak in JA-Ile accumulation that signals target gene induction (Glauser et al., 2008; Koo et al., 2009; Heitz et al., 2012, 2016), concomitant to rapidly induced turnover or removal mechanisms (Koo and Howe, 2012; Heitz et al., 2016). Two transcriptionally activated JA-Ile catabolic pathways were recently characterized biochemically and genetically and proceed respectively through ω -oxidation or cleavage of the hormone conjugate (Figure 1A). The first mechanism identified in *Arabidopsis* is mediated by the three endoplasmic reticulum (ER)-localized cytochrome P450 oxidases CYP94B1, CYP94B3, and CYP94C1 that generate the derivatives 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011, 2014; Heitz et al., 2012). Sequential oxidation gradually diminishes the ability of conjugates to promote COI1-JAZ co-receptor assembly and therefore to induce JA responses (Koo et al., 2014; Aubert et al., 2015). The second inactivation pathway relies on the amido-hydrolases (AH) IAR3 and ILL6 that cleave back JA-Ile to free JA (Woldemariam et al., 2012; Widemann et al., 2013), and

in addition act on 12OH-JA-Ile, defining an indirect biosynthetic route to 12OH-JA (Figure 1A) (Widemann et al., 2013; Zhang et al., 2016). Ectopic overexpression of these catabolic enzymes generally results in increased JA-Ile turnover and subsequent JA response deficiency, including susceptibility to insect larvae or to fungal attacks, or male sterility (Koo et al., 2011; Aubert et al., 2015; Zhang et al., 2016). The interplay of JA-Ile catabolic pathways provides the scaffold of an extended JA metabolic grid (Figure 1A) and accounts largely for the JA signatures in leaves undergoing biotic stress or in maturing flower tissues (Heitz et al., 2016; Widemann et al., 2016).

Despite these advances, our understanding of the metabolic regulation of JA signaling is still fragmentary. For example, genetically blocking the above-mentioned catabolic pathways boosts JA-Ile accumulation, but defense and resistance responses remain essentially unchanged (Aubert et al., 2015) or even impaired (Poudel et al., 2016). This suggests that under high JA-Ile levels, mechanisms exist that can powerfully repress signaling. These include overstimulation of JAZ expression (Heitz et al., 2012; Aubert et al., 2015; Poudel et al., 2016), stable JAZ isoforms (Shyu et al., 2012), and competition of bHLH TFs with MYC2 (Goossens et al., 2017).

More upstream in the pathway, initial reports of manipulations of biosynthetic genes have provided means to alter signaling output by redirecting metabolic fluxes. Overexpression of allene oxide synthase (Laudert et al., 2000) or allene oxide cyclase (Stenzel et al., 2003) had no effect on resting levels of JAs in leaves, but enhanced post-stimulus accumulation of JAs, suggesting that substrate availability is the initial factor limiting JA/JA-Ile biosynthesis. Downstream of JA, overexpression of JA-O-methyltransferase or silencing of methyl-JA esterase in *Nicotiana attenuata* created a metabolic sink diverting JA toward methyl jasmonate formation, at the expense of JA-Ile accumulation and associated defense responses (Stitz et al., 2011). Another potential diversion of JA flux may be its direct hydroxylation toward 12OH-JA. 12OH-JA and its sulfated or glycosylated derivatives have been described as common constituents in various organs of several plant species (Miersch et al., 2008), including stressed *Arabidopsis* leaves (Widemann et al., 2013; Aubert et al., 2015), and were initially suspected to correspond to a switch off in JA signaling (Miersch et al., 2008). Such metabolites may alternatively bear discrete biological activities, as 12OH-JA-glucoside was reported to act as a COI1-JAZ-independent leaf-closing factor in motor cells of the raintree *Samanea saman* (Nakamura et al., 2011), adding to the initial tuber-promoting activity of 12OH-JA discovered in potato (Koda et al., 1991). Recently, a monooxygenase from the rice pathogen *Magnaporthe grisea* was described that converts JA to 12OH-JA and attenuates host defense to facilitate its colonization (Patkar et al., 2015), highlighting potential regulatory properties of 12OH-JA. Therefore, there is a strong interest in elucidating a direct JA oxidation pathway in plants, how it may have an impact on JA metabolic dynamics, and whether it has an influence on plant-pathogen interactions.

Here, we followed a candidate gene approach based on the strong transcriptional coregulation of JA pathway elements to identify new oxidases of the 2-oxoglutarate dioxygenase family that behave as important actors in JA metabolism and signaling.

Biochemical and genetic studies established that three jasmonic acid oxidase (JAO) enzymes perform redundant oxidation of JA to 12OH-JA. Due to its high basal expression, JAO2 plays a major role in repressing JA-dependent defenses in non-stimulated leaves. We show by metabolic and epistasis analysis that the underlying mechanism relies on higher flux through JA-Ile signaling in *jao2*-deficient plants, leading to constitutively elevated antimicrobial defenses and high antifungal resistance. The data identify the elusive direct 12OH-JA formation mechanism and its function as a new node of metabolic control of JA-Ile signaling. We also provide original insights into the interplay of the two 12OH-JA formation routes upon mechanical wounding or fungal attack.

RESULTS

Distinct Origins for 12OH-JA Synthesis upon Wound and Pathogen Responses

We previously reported that a large proportion of 12OH-JA that accumulates in wounded *Arabidopsis* leaves is derived from cleavage of the JA-Ile catabolite 12OH-JA-Ile by the AHs IAR3 and ILL6 (Widemann et al., 2013). To investigate functional redundancy between the two hydrolases and determine the contribution of this biosynthetic route in two types of leaf stress responses, 12OH-JA levels were quantified in double *iar3ill6* mutants 3 h after leaf wounding or 3 days after *Botrytis cinerea* inoculation. 12OH-JA content reached high levels in wounded or *B. cinerea*-inoculated wild-type (WT) leaves at these time points, confirming earlier results (Widemann et al., 2013; Aubert et al., 2015). The *iar3ill6* line retained only about 25% WT levels after wounding but accumulated about 65% WT 12OH-JA levels upon fungal infection (Figure 1B). This result indicates that wound-accumulated 12OH-JA is preferentially released from 12OH-JA-amino acid conjugates by redundantly acting IAR3 and ILL6 AHs (Widemann et al., 2013; Zhang et al., 2016), and suggests that upon microbial challenge, another biosynthetic route must exist. We hypothesized that 2OGD-type dioxygenases, a class of enzymes acting in many plant hormone pathways (Kawai et al., 2014), may be involved in 12OH-JA formation. To this end, we treated WT plants and *ill6 iar3* mutants impaired in the indirect pathway before and immediately after wounding with prohexadione-calcium, also known as Regalis, a chemical inhibitor of 2OGDs (Vialart et al., 2012). 12OH-JA contents were measured in a time-course analysis at 1, 2 and 5 h post-wounding (hpw). Regalis treatment significantly reduced 12OH-JA levels in WT plants at 2 hpw (Figure 1C). Consistent with the above and previous results (Widemann et al., 2013), 12OH-JA levels were much lower in *iar3ill6* than in WT leaves, particularly at 1 and 2 hpw (Figure 1D). Strikingly, Regalis further reduced 12OH-JA accumulation at 2 hpw and particularly at 5 hpw. This result supports a possible involvement of 2OGDs in 12OH-JA formation after wounding and launched our genetic search for 2OGDs linked to the JA pathway.

Identification of JA-Coregulated 2-Oxoglutarate-Dependent Oxidases

Mining JA coregulated genes using *CYP94C1* involved in JA-Ile catabolism (Heitz et al., 2012) as a bait (Toufighi et al., 2005) revealed a group of three 2OGD genes that may be linked to the JA pathway. Phylogenetic analysis (Supplemental Figure 1) of

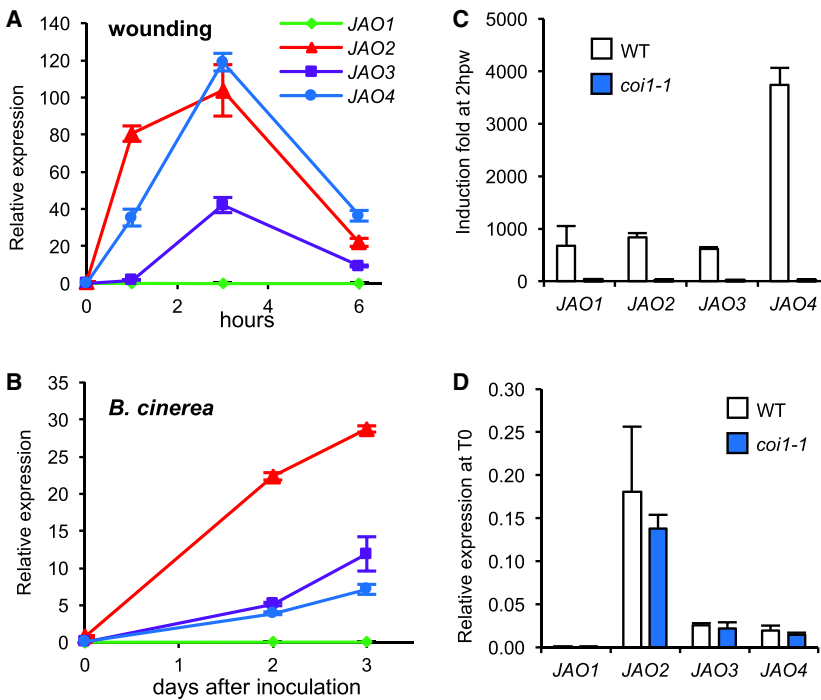


Figure 2. JAO Gene Expression upon Mechanical Wounding or Fungal Infection.

(A and B) Real-time RT-qPCR analysis of *JAO4*, *JAO2*, *JAO3*, and *JAO4* gene expression after mechanical wounding (A) or after *Botrytis* infection (B). Expression is represented as relative expression of each JAO gene normalized by expression of *EXP* and *TIP41* reference genes.

(C) Induction of JAO genes at 2 h post-wounding (hpw) in WT and *coi1* leaves. Expression is represented as induction fold relative to expression level at time 0, which was set to 1.

(D) Relative expression of JAO genes in non-stimulated WT and *coi1* leaves. Mean values \pm SD of a representative experiment are shown.

encoded protein sequences indicated that they grouped in a four-member subclade defined as DOX 46 by Kawai et al. (2014), clustering between AMINO-CYCLOPROPANE OXIDASE (ACCox) enzymes and SALICYLIC ACID HYDROXYLASE (S3H) (Zhang et al., 2013). The new proteins were named JAO and numbered according to their phylogenetic proximity: JAO1, At3g11180; JAO2, At5g05600; JAO3, At3g55970 (previously reported as *JASMONATE-REGULATED GENE 21*, *JRG21*; Nickstadt et al., 2004), and JAO4, At2g38240. Expression of the four JAO genes was examined by real-time qPCR and found to be wound- and *Botrytis*-responsive to variable extents. Expression of JAO2 and JAO4 was highest after wounding followed by JAO3 (Figure 2A), and after fungal infection, JAO2 was predominantly expressed (Figure 2B). For both stimuli, JAO4 expression remained very low. Induction of the four genes by wounding was abolished in the *coi1* mutant, which is impaired in jasmonate perception and responses (Figure 2C). Closer examination showed that expression of JAO2 in non-stimulated leaves was much higher than expression of the three other JAO genes (Figure 2D) and of note, this basal level was maintained in *coi1*. Based on these expression data, we conducted functional analysis of the three most expressed genes/proteins, JAO2, JAO3, and JAO4, and did not study JAO1 further because of its very low basal and induced expression in leaves.

JAOs Encode Novel Jasmonic Acid Oxidases

Similarly to cytochrome P450 enzymes, 2OGD enzymes typically perform hydroxylation reactions but use 2-oxoglutarate as their co-substrate (Kawai et al., 2014). The three predicted 2OGD protein-coding sequences were cloned in an expression vector and affinity purified from bacterial lysates as his-tagged enzymes. The enzymes were first incubated with either JA, indole-acetic acid (IAA) or salicylic acid (SA), as these latter hormone compounds were previously identified as 2OGD sub-

strates (Zhang et al., 2013, 2016). Enzymatic conversion was evaluated by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) through a specific search of known oxidation products, or decrease in substrate signal in the case of IAA. All three recombinant enzymes catalyzed the 2-oxoglutarate-dependent oxidation of JA into a compound with LC-MS/MS characteristics (retention time and fragmentation) matching those of authentic 12OH-JA standard (Figure 3). No activity was detected with IAA or SA. We next assayed OPDA and JA-Ile as potential substrates along with JA, and again, only free JA was hydroxylated. Velocities were estimated at 14 ± 1.8 , 48 ± 8 and 49 ± 5.1 nmol mg protein⁻¹ min⁻¹ for isoforms 2, 3, and 4, respectively. The analysis indicates that the newly characterized enzymes specifically hydroxylate JA and were therefore named JASMONIC ACID OXIDASES (JAO2, 3, and 4).

jao2 Knockout Lines Display Constitutive JA-Dependent Responses and Increased Antifungal Resistance

To explore the role of JAO genes in JA signaling, we analyzed single and double *jao* knockout mutants (Supplemental Figure 2A and 2B) with respect to *B. cinerea* resistance, which relies largely on JA-dependent defense responses. Col0 background mutant alleles of *jao3-1* and *jao4-1* exhibited WT levels of antifungal resistance (Figure 4A and 4B). Additional alleles in a WS background (*jao3-2* and *jao4-2*) were tested (Supplemental Figure 2C). In marked contrast, *jao2-1* and *jao2-2*, two allelic lines lacking JAO2, and a double *jao2-1 jao4-1* line displayed strongly attenuated disease symptoms (Figure 4A), scored as a significant reduction in lesion diameters and fungal biomass (Figure 4C) assessed as cutinase signal, compared with the WT line. No additive effect was recorded in the *jao2-1 jao4-1* double mutant. To examine the molecular basis of this phenotype, we monitored expression of transcripts of the antimicrobial branch of the JA pathway at 3 dpi relative to uninfected leaves for each genotype. Genes analyzed were the TF *ORA59* and its targets, the *PDF1.2* and *PR4* JA-regulated defense markers (Pre et al., 2008). Strong resistance phenotype in *jao2-1*, *jao2-2*, and *jao2-1 jao4-1* leaves correlated with high constitutive expression of defense genes prior to fungal

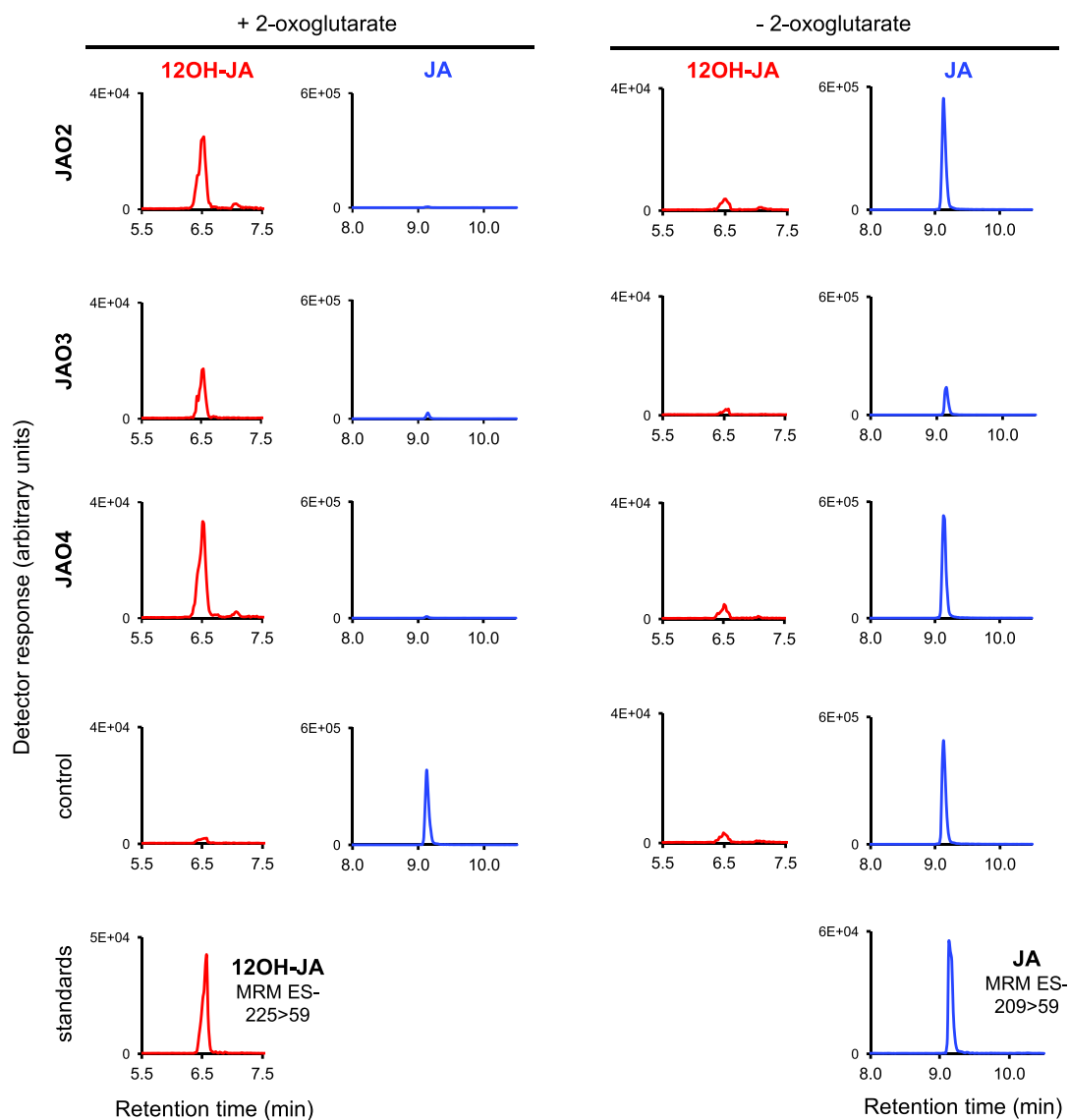


Figure 3. Catalytic Activities of Recombinant JAO4, JAO2, and JAO3 Proteins.

LC chromatograms of residual JA or 12OH-JA produced in incubation of JA with affinity-purified JAO4, JAO2, or JAO3 proteins. Incubations were performed in the absence (right panels) or presence (left panels) of the co-substrate 2-oxoglutarate. Control reactions were run by incubating JA substrate with BSA. Reaction mixtures were analyzed by LC-MS/MS. Oxidation product matched retention time and mass transition in multiple reaction monitoring mode in negative electrospray (MRM, m/z 225 > 59 for 12OH-JA and m/z 209 > 59 for JA) of authentic 12OH-JA standard.

inoculation, whereas expression of the three markers was similar to WT in *jao3-1* and *jao4-1* (Figure 4C). In contrast, expression in *jao2-1-*, *jao2-2-*, and *jao2-1 jao4-1*-infected leaves (3 dpi) was only moderately (*PDF1.2* and *ORA59*) or not (*PR4*) increased compared with WT (Figure 4C). We then investigated the developmental occurrence of the enhanced defense phenotype. Elevated expression of JA-regulated genes was detected in JAO2-deficient lines as early as 7 days of *in vitro* seedling growth (Supplemental Figure 3A). In soil-grown plants, *ORA59* showed a peak expression 2 weeks after repotting of seedlings in *jao2* lines, and its targets *PDF1.2* and *PR4* were consistently upregulated throughout the 4-week culture period in *jao2-1* and *jao2-2*, but not in *jao4-1* plants (Supplemental Figure 3B). These results

illustrate early and durable upregulation of antimicrobial defenses in *jao2* lines.

We next addressed JA-regulated developmental responses in *jao* mutants. Anthocyanin accumulation, a chemical adaptation that is under JA control (Qi et al., 2011), was examined in petioles of 6-week-old plants. All three JAO2-deficient lines were found to contain 4- to 6-fold increased anthocyanin levels (Supplemental Figure 4A) while *jao4-1* and *jao3-1* had unchanged anthocyanin content compared with the WT. Because JA stress signaling is generally associated with repression of vegetative growth (Wasternack and Hause, 2013; Huot et al., 2014), we assayed *jao* lines for a potential trade-off of defense over growth. Rosettes were excised and fresh weight was determined at

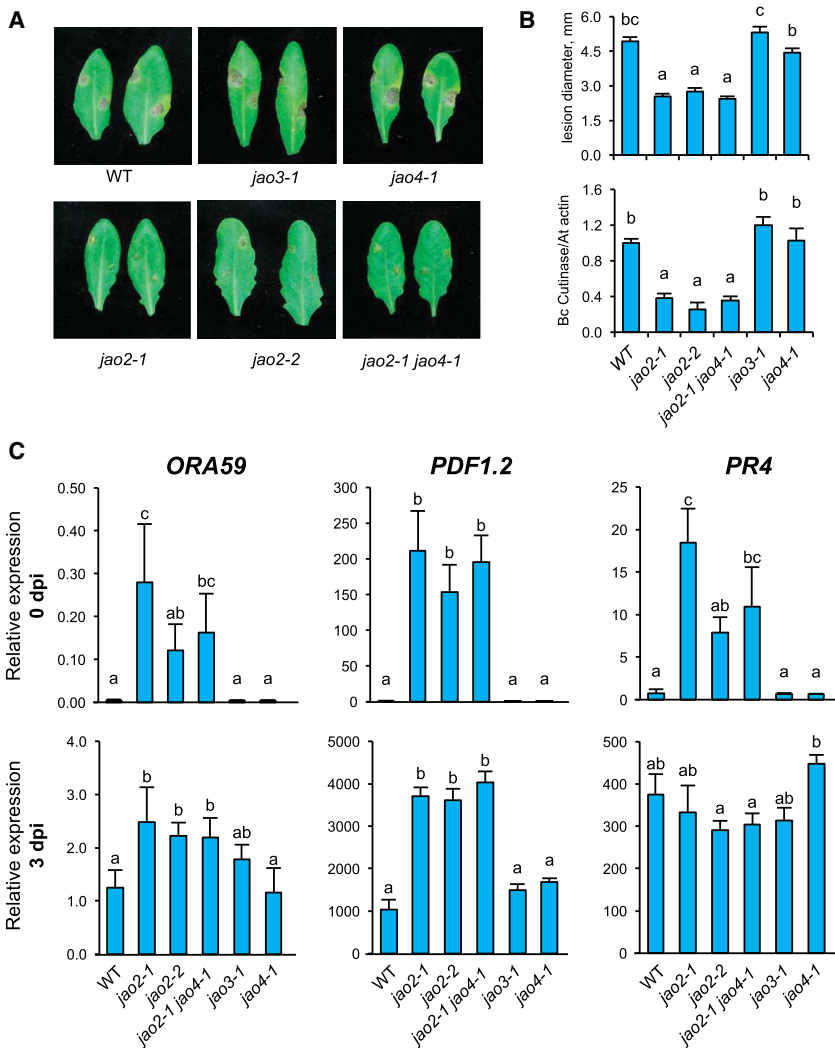


Figure 4. Resistance Levels and Expression Profiles of Jasmonate-Dependent Defense Genes in Response to *B. cinerea* in *jao* Loss-of-Function Mutants.

(A) Disease symptoms at 3 dpi. Two sites were inoculated across the main vein with 5 μ L of spore suspension containing 2.5×10^6 spores mL^{-1} .

(B) Disease-symptom scoring. Top panel, mean lesion diameter at 3 dpi. Histograms represent the mean lesion diameters \pm SEM of about 100 lesion sites from 10 to 15 plants for each genotype. Bottom panel, evaluation of fungal growth by real-time qPCR with *B. cinerea* cutinase-specific primers on genomic DNA extracted from 3-day-infected leaves. Quantification was performed on three biological replicates analyzed in duplicate. Columns labeled with different letters indicate a significant difference as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test ($P < 0.01$).

(C) Expression profiles of jasmonate-dependent defense genes in response to *B. cinerea* in *jao* loss-of-function mutants. Expression is represented as the relative expression of each target gene before (0 dpi, top panels) or at 3 dpi (bottom panels). For each experiment, expression of *ORA59*, *PDF1.2*, and *PR4* was determined by real-time PCR using gene-specific primers and normalized using *EXP* and *TIP41* reference genes. Transcript quantification was performed on three biological replicates analyzed in duplicate. Histograms represent mean expression \pm SEM. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $P < 0.05$.

4 weeks in the different genotypes. Only a marginal reduction of fresh weight was observed at this stage, mostly in *jao2-1jao4-1* (Supplemental Figure 4B), while *jao3-1* plants were slightly heavier. Collectively, these data indicate that the absence of JAO2 specifically results in the constitutive activation of an array of otherwise stress-induced JA-dependent responses.

Constitutive Defense in *jao2* Could Be Reversed by Ectopic Expression of JAO2, JAO3, or JAO4

To demonstrate a functional link between JAO expression and an elevated defense phenotype in *jao2* mutants, *jao2-2* was separately transformed with constructs harboring each of the three JAO cDNAs driven by the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter (p35S). Fifteen to 20 primary transformants were selected for each construct and assayed for gene expression. As shown in Supplemental Figure 5, a positive correlation was found between overexpression of any of the three JAO proteins and restoration of low *PDF1.2* transcripts in the *jao2-2* background, illustrating efficient complementation of the mutant defense phenotype. Two highly overexpressing lines that segregate a single integration of the construct were selected for each JAO construct. For JAO2, among the seven transformants

initially recovered, line 4 showed high overexpression while line 5 showed very low *PDF1.2* transcripts despite a lack of detectable transgene overexpression. T2 Basta-resistant progeny of these lines were grown and, as verified by qPCR analysis, all six chosen lines maintained low *PDF1.2* expression characteristics in unchallenged leaves, similar to their parents (Figure 5A). When submitted to *B. cinerea* infection, all lines except line 5 restored disease symptoms similar to or even stronger than the WT (Figure 5B). Line *jao2-2::p35S-JAO2#5* exhibited an intermediate resistance level between the WT and the *jao2-2* parent, suggesting dose-dependent complementation. These results indicate that p35S-driven overexpression of JAO3 or JAO4 can substitute for the absence of JAO2 to maintain low levels of basal defense. They also suggest that in WT plants, high constitutive expression of JAO2 (Figure 2C) probably explains its predominant function in attenuating basal defense, in contrast to JAO3 or JAO4, whose deficiency does not affect defense.

JAO2 Deficiency Upregulates Basal Defense through JAR1- and COI1-Dependent Signaling Rather than by 12OH-JA Inhibition

We then reasoned that change(s) in jasmonate homeostasis or signaling are likely responsible for defense deregulation in *jao2* plants. We explored two possible, non-exclusive mechanisms

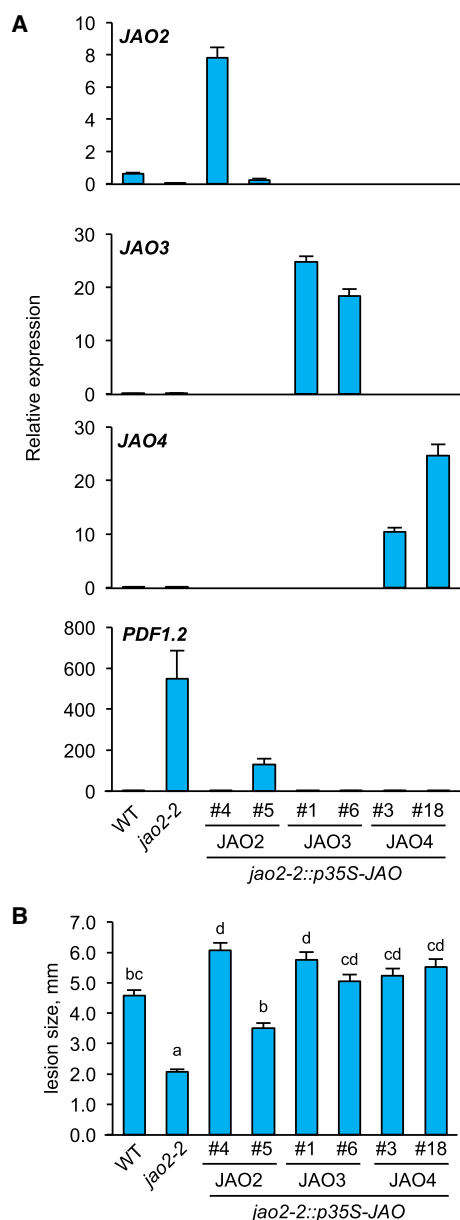


Figure 5. Complementation of *jao2-2* by Ectopic Expression of JAO4 or JAO2 or JAO3 Under p35S Promoter.

(A) T2 Basta-resistant *jao2-2* plants (selected from primary transformants displayed in Supplemental Figure 5) exhibiting single-locus transgene segregation were analyzed for impact of transgene expression on *PDF1.2* transcript levels. Histograms show mean expression \pm SEM of three independent plants for each genotype.

(B) Lines analyzed in (A) were inoculated with *Botrytis* and scored for antifungal resistance. Mean lesion diameter at 3 days post-inoculation is shown. Histograms represent mean lesion diameters \pm SEM of about 100 lesion sites from 10 to 15 plants for each genotype. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $P < 0.01$.

that may alter the defense output of the JA pathway. In a first hypothesis, 12OH-JA (the product of JAO2 activity) or its putative derivative(s) repress basal defense levels in WT leaves, and

disruption of JAO2 activity in *jao2* would relieve such an inhibition. Exogenously applied 12OH-JA was previously reported to positively or negatively alter gene expression in tomato leaves, but its impact on JA-Ile signaling was not explored (Miersch et al., 2008). Moreover, Patkar et al. (2015) recently described fungus-produced 12OH-JA as a potent inhibitor of JA-dependent immune responses in rice. To test the potential impact of 12OH-JA on JA-Ile-triggered defense signaling in *Arabidopsis*, we treated 7-day Murashige and Skoog (MS)-grown seedlings with JA-Ile, or 12OH-JA, or a combination of the two compounds and assayed the transcriptional response of JA-Ile-responsive genes. As shown in Figure 6A, JA-Ile triggered a sustained increase in transcript accumulation, peaking at 1 h for the early responsive genes *ORA59*, *JAZ5*, and *CYP94C1*, and at 6 h for the late response gene *PDF1.2*. In contrast, 12OH-JA application resulted in no (*PDF1.2*) or weak stimulation of the analyzed genes. When 12OH-JA was applied simultaneously with JA-Ile, maximal response was reached earlier (within 30 min), except for *PDF1.2* for which the peak was shifted to 24 h. These data indicate that exogenous 12OH-JA treatment potentiates rather than inhibits JA-Ile-triggered responses in *Arabidopsis* leaves.

In a second scenario, regardless of the amount of 12OH-JA formed, the absence of JAO2 would feed excessive, non-consumed JA substrate into JA-Ile synthesis, and higher signaling would in turn enhance basal defense levels. To determine if JA-Ile synthesis is required for the *jao2* phenotype, we generated the *jao2-2 jar1-1* double mutant. As shown in Figure 6B, in the absence of JAR1 activity, constitutive expression of the three marker genes was drastically reduced. *jao2-2* was also crossed with the perception mutant *coi1*, and analysis of double-mutant progeny showed that *coi1* suppressed *ORA59*, *PDF1.2*, and *PR4* overexpression in the *jao2-2* background (Figure 6C), suggesting that perception through the COI1-JAZ module is required for constitutive defense. Collectively, these results indicate that the molecular phenotype of *jao2-2* is strongly dependent on canonical JA-Ile synthesis and perception.

JAO2, JAO3, and JAO4 Contribute to 12OH-JA Formation In Planta

We showed previously that the indirect CYP94-AH formation pathway contributes most of the 12OH-JA that accumulates after mechanical wounding (Widemann et al., 2013), and that in contrast, a CYP94-independent pathway generates this compound upon infection by *B. cinerea* (Aubert et al., 2015).

In a comparative analysis of metabolic responses to distinct stimuli, we examined quantitative JA and 12OH-JA profiles in wounded or fungus-infected JAO-deficient plants. In a first experiment using mechanical wounding, JA levels were found to be significantly increased in *jao* mutant lines at 3 and 6 hpw, except *jao3-1*, consistent with reduced JA consumption (Supplemental Figure 6A). 12OH-JA levels were not diminished in *jao* lines as expected in wounded leaves at 3 hpw and were significantly increased at 6 hpw in JAO2-deficient plants (Supplemental Figure 6C). This result illustrates that individual JAO activity is dispensable in these genotypes for wound-induced 12OH-JA accumulation and may be explained by compensatory mechanisms between metabolic turnover

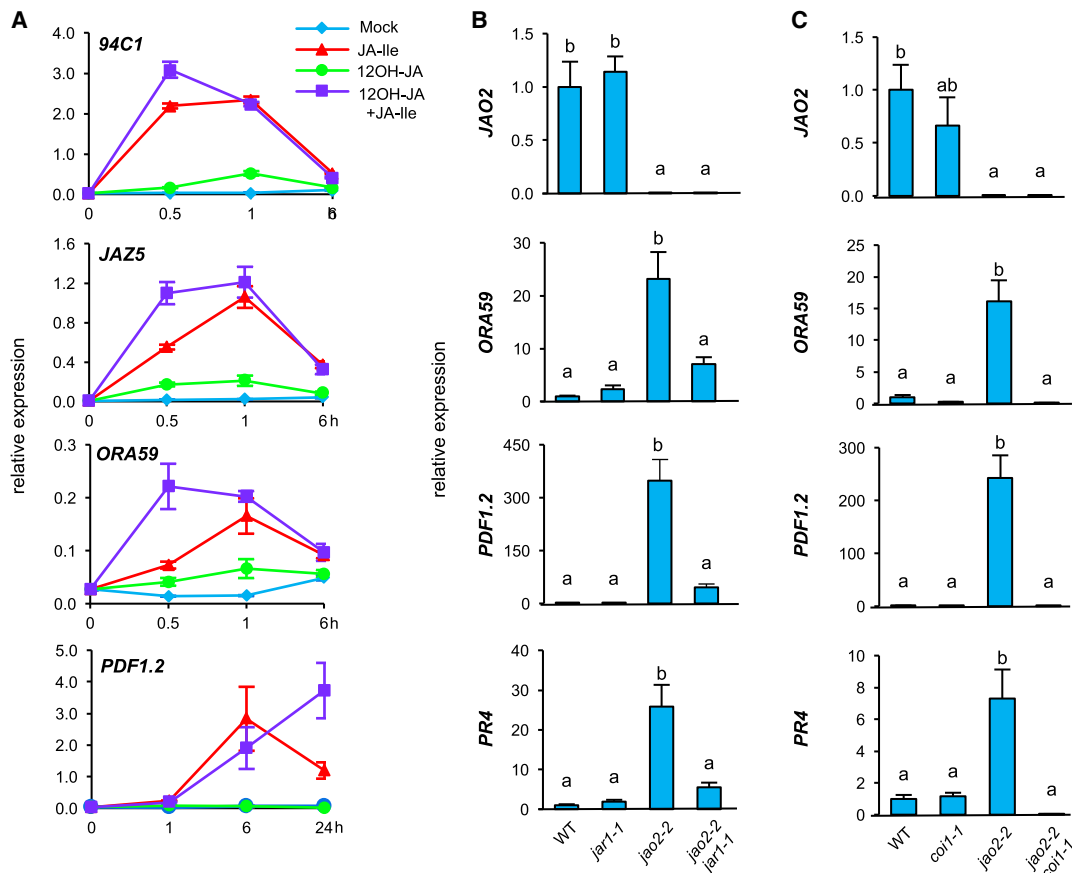


Figure 6. Impact of 12OH-JA on JA-Ile Signaling (A) and Genetic Interaction of *jao2-2* Mutation with *JAR1* (B) and *COI1* (C).

(A) Wild-type seedlings were grown for 7 days in liquid MS medium before adding 15 μ M JA-Ile, or 30 μ M 12OH-JA, or a combination of both compounds, or no compound (Mock). Seedlings were harvested at the indicated time points before gene expression analysis by real-time qPCR. Relative expression normalized by expression of *EXP* and *TIP41* reference genes is shown. Values are means \pm SEM of three biological replicates.

(B and C) Epistasis analysis of *jao2* mutations in a *coi1* or *jar1* background. Impact of *jar1* (B) or *coi1* (C) mutations on *jao2*-triggered expression of defense markers *ORA59*, *PDF1.2*, and *PR4*. Relative expression is shown in unstimulated leaves of WT or *jao2-2*, *jar1-1*, *coi1-1* mutant, or *jao2-2*jar1-1* or *jao2-2*coi1-1* double-mutant plants. Histograms represent means \pm SEM of five independent plants for each genotype for the *jao2-2*jar1-1* cross and three to five independent plants for the *jao2-2*coi1-1* cross. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $P < 0.01$.

pathways (Widemann et al., 2013). In support of this hypothesis, transcripts of *CYP94B3*, *IAR3*, and *ILL6*, all encoding enzymes involved in 12OH-JA formation via JA-aa intermediates, were hyperaccumulated in resting leaves of *jao* lines compared with WT leaves (Supplemental Figure 7). This was particularly the case in *jao2* alleles, and a synergistic effect was evident in the double *jao2-1 jao4-1* mutant. Of note, this overexpression was milder or imperceptible when comparing expression between genotypes after wounding or infection.

In a second experiment, we determined the impact of *jao* mutations on abundances of six JA compounds in *B. cinerea*-infected leaves. JA levels at 3 dpi were essentially similar in all genotypes (Figure 7A), in contrast to 12OH-JA levels, which were strongly reduced in *jao* single mutants (Figure 7C), particularly in *jao2-1 jao4-1*, which retained only about 15% of the WT levels. This result suggests that JAO2–JAO4 contribute to 12OH-JA accumulation upon *B. cinerea* infection. Unexpectedly, JA-Ile (Figure 7B) and its hydroxylated (Figure 7D) and carboxylated

(Figure 7F) catabolites were reduced by half in single *jao2* or double *jao2-1 jao4-1* lines, although these compounds were excluded as direct substrates or products of JAO enzymes in *in vitro* assays. A possible bias at the origin of this apparent decrease is that in highly resistant *jao2* leaves bearing very small lesions, less cells are stimulated for defense, and metabolite signals were diluted in the whole-leaf sample compared with leaves bearing WT-size lesions (Figure 4). As a consequence, none of the JA compound abundances analyzed in infected leaves correlate positively with higher resistance levels.

To circumvent this possible stimulation bias when comparing profiles of leaves with different lesion sizes, we examined *B. cinerea*-induced 12OH-JA levels in WT, single *jao4-1*, double *iar3-5 ill6-2*, and triple *jao4-1 iar3-5 ill6-2* mutant plants, all genotypes displaying WT-size necrotic lesions. 12OH-JA levels were reduced in *jao4-1* relative to WT (Figure 7C; Supplemental Figure 8B), similarly to *iar3-5 ill6-2*. In the triple mutant, a further decrease was detected, showing the contribution of JAO4

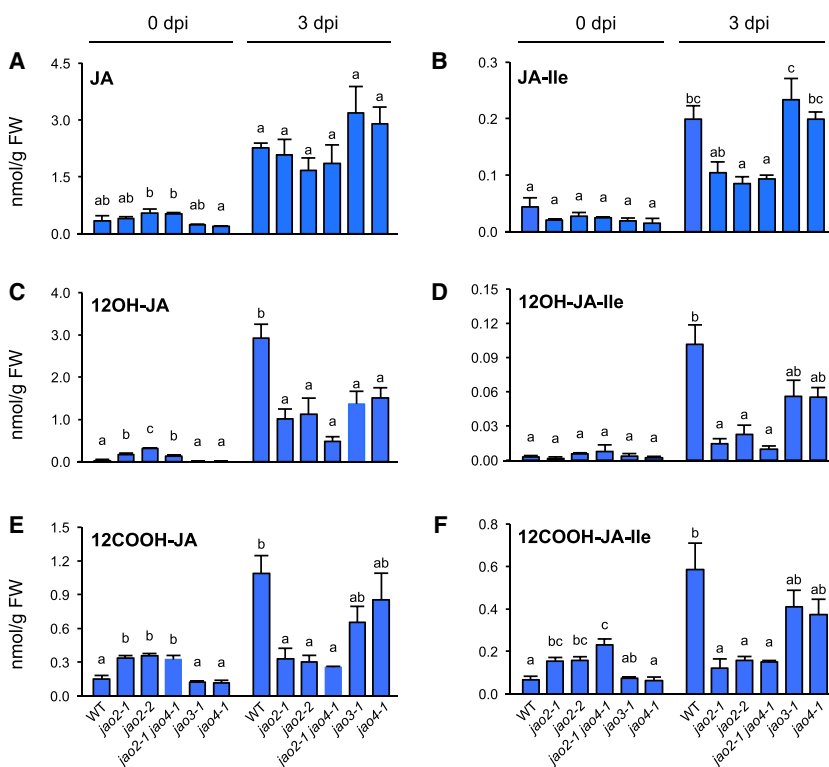


Figure 7. Jasmonate Profiles in *jao* Mutants before and after Response to *B. cinerea* Infection.

Six-week-old plants were drop inoculated on two sites per leaf with a suspension containing 2.5×10^6 fungal spores mL^{-1} . Leaves were harvested at 0 or 3 dpi, and jasmonates shown in Figure 1A were extracted and quantified by LC-MS. (A) JA, (B) JA-Ile, (C) 12OH-JA, (D) 12OH-JA-Ile, (E) 12COOH-JA, (F) 12COOH-JA-Ile levels were expressed in nmol/g fresh weight (FW). Histograms represent the mean \pm SEM of three biological replicates. Columns labeled with different letters indicate a significant difference between genotypes determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $P < 0.05$.

when the indirect 12OH-JA pathway is impaired (Supplemental Figure 8A).

Finally, to further address the metabolic impact of JAO2, we sprayed WT and *jao2-2* seedlings with JA and compared their capacity to generate 12OH-JA. 12OH-JA levels were significantly reduced in *jao2-2* extracts, concomitant with a detectable increase in JA-Ile (Supplemental Figure 8B). Accordingly, the JAO and AH substrates JA and JA-Ile, respectively, were increased in cognate mutants. Collectively, these data demonstrate that JAO2, JAO3, and JAO4 contribute to 12OH-JA formation *in vivo*.

JA Profiling in *jao2* Suggests Enhanced Flux through JA-Ile Metabolism in Unstimulated Plants

As defense is constitutively elevated in *jao2* lines prior to inoculation, we assumed that change(s) in JA homeostasis must occur to derepress defenses in unstimulated *jao2* leaves. In such leaves, JA, JA-Ile, and 12OH-JA-Ile were low and essentially similar to the WT (Figure 7A, 7B, and 7D). 12OH-JA levels were slightly increased in *jao2* lines relative to WT, likely through compensatory activation of the CYP94-AH pathway (see above and Supplemental Figure 7). Remarkably, levels of 12COOH-JA-Ile, the second JA-Ile oxidation catabolite, and those of 12COOH-JA, a new CYP94-generated catabolite (Bruckhoff et al., 2016; E. Smirnova and E. Widemann, unpublished results) are significantly overaccumulated in unstimulated leaves of lines lacking JAO2. Therefore, levels of the latter compounds correlate positively with elevated defense status in unstimulated leaves and provide a possible metabolic readout of perturbed basal JA homeostasis in *jao2* lines. This observation indicates that JAO2 deficiency results in enhanced flux through JA-Ile metabolism and catabolite accumulation.

DISCUSSION

JA Oxidation by JAO Enzymes Identifies a Missing Step in Jasmonate Metabolism

Metabolic conversions between jasmonate compounds contribute largely to the modulation of their hormonal properties (Wasternack and Hause, 2013; Heitz et al., 2016). Particularly, recent elucidation of catabolic routes of the master signal JA-Ile

has expanded the range of JA metabolites and revealed additional complexity in the JA metabolic grid.

12OH-JA is a well-known jasmonate, and its structural proximity to JA has led researchers to suspect the existence of a direct JA oxidation pathway, which has remained so far unresolved (Miersch et al., 2008). Within the CYP94 family, characterized enzymes function as JA-Ile oxidases (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012), but none of the six *Arabidopsis* members is active on free JA (Heitz et al., 2016). Besides membrane-bound cytochrome P450, 2OGD enzymes are an important class of soluble oxygenases performing oxidation reactions on hormone compounds. 2OGDs play critical roles in homeostasis and (in)activation of a growing number of plant hormones, including gibberellins, auxin, ethylene, SA, and strigolactones (Hedden and Thomas, 2012; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2013; Brewer et al., 2016). We first showed that wound-induced 12OH-JA formation could be reduced by Regalis, a chemical 2OGD inhibitor, particularly in the double *iar3 ill6* mutant impaired in the indirect 12OH-JA pathway. This observation prompted the characterization of new 2OGDs in JA oxidation. Coregulation analysis with confirmed JA pathway components identified three 2OGDs genes out of four in the DOXC46 subclade (Kawai et al., 2014) as prime candidates to perform such a reaction. In the course of this work, Caarls et al. (2017) reported the partial characterization of these enzymes, named JASMONATE-INDUCED OXYGENASES 1 to 4 (JOX). Here, we performed extensive functional analysis of the three most expressed genes, encoding JAO/JOX2, -3, and -4 enzymes, focusing on leaf wounding and necrotrophic fungal challenges, and two stimuli triggering strong JA metabolism and signaling. All three recombinant proteins readily oxidized JA to 12OH-JA, and their detailed

Molecular Plant

analysis could not distinguish differences in substrate preference, as all three enzymes specifically oxidized JA but not OPDA, JA-Ile, IAA, or SA. Our study thus extends the role of versatile 2OGD enzymes to JAs, another class of important plant hormones. Within JA metabolism, the data indicate a clear specialization of JAO action on free JA, whereas oxidative turnover of JA-Ile and other JA-amino acid conjugates is specifically achieved by CYP94 enzymes (Kitaoka et al., 2014; Widemann et al., 2015).

JAO2 Deficiency Activates Jasmonate Signaling in Unchallenged Plants

Recent reports have illustrated cases where JA-Ile levels do not correlate with the amplitude of responses and that additional layers of control must exist. Blocking oxidative JA-Ile catabolism in CYP94 multiple mutants strongly enhances JA-Ile accumulation and half-life but does not result in durably increased resistance to insect or fungus attacks (Heitz et al., 2012; Aubert et al., 2015; Poudel et al., 2016). In marked contrast, we demonstrate in this study that JA metabolism can be rewired to achieve constitutive defense and strongly enhanced antimicrobial resistance in the absence of obvious JA-Ile overaccumulation. When JAO2 is genetically ablated, JA-Ile signaling is turned on, as manifested by elevated defenses, strong resistance to a necrotrophic fungus, and higher anthocyanin accumulation. The growth of young rosettes of JAO2-deficient plants was mildly affected, indicating that JAO manipulation may offer an interesting possibility to engineer higher pathogen resistance, with acceptable impact on vegetative growth. Caarls et al. (2017) described significant growth inhibition in a quadruple *jao/jox* mutant, indicating that additive effects due to multiple JAO/JOX depletion or different cultivation conditions may severe the growth phenotype. Decoupling the growth-defense trade-off is an important issue in crop engineering, and both chemical and genetic approaches provide promising leads to this end (Campos et al., 2016; Jimenez-Aleman et al., 2017). Analysis of gene expression data in the JAO subclade has shown differential responsiveness of the four isoforms to wound and *Botrytis* stress. The efficient complementation of the *jao2-2* high-defense and resistance phenotype by ectopic expression of JAO2, JAO3, or JAO4 supports biochemical data that JAOs are catalytically redundant and that the *jao2*-specific phenotype cannot be compensated by the low native expression of other JAO isoforms. Importantly, we show that a sole JAO2 deficiency is sufficient to strongly enhance basal levels of JA-regulated defenses, in line with its much higher expression in WT leaves. Thus, the JAO2 promoter properties may explain why JAO2 is the main contributor of this new signal attenuation mechanism.

Constitutive JA Signaling in *jao2* Plants Depends on Higher Flux through the JAR1-COI1 Module

12OH-JA accumulation has been commonly observed in different organs and plant species (Miersch et al., 2008), and its importance is now being recognized for plant-microbe interactions. 12OH-JA and other JAs can be synthesized by some fungi (Eng et al., 2016), and a recent report suggested that fungus-produced 12OH-JA attenuates host immunity in rice (Patkar et al., 2015). We detected no 12OH-JA in the *B. cinerea*-infected *aos* mutant, which is devoid of any plant-derived JA (L. Poirier and T. Heitz, unpublished result), indicating

Jasmonic Acid Oxidase Attenuates Immune Responses

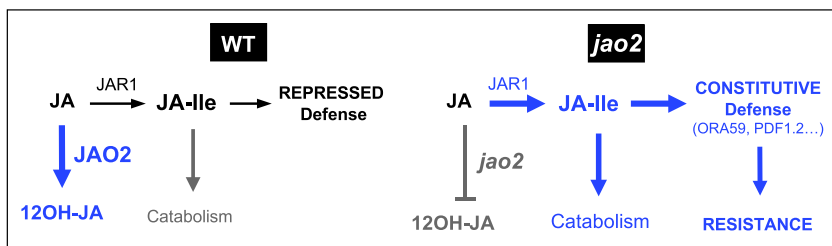
that this fungus does not produce 12OH-JA under our conditions. Residual 12OH-JA accumulating in *jao2 jao4* plants (Figure 7) may then be produced by JAO3 or uncharacterized JAO1, or through the indirect pathway by cleavage of 12OH-JA-Ile (Widemann et al., 2013).

What then is the molecular basis of the impact of JAO2 on JA/JA-Ile homeostasis and signaling? We tested the possibility that JAO-produced 12OH-JA could somehow repress defense signaling in resting WT seedlings, but this scenario was contradicted by the observation that the supply of 12OH-JA simultaneously with JA-Ile did not result in inhibition, but instead provoked a faster response of most genes analyzed (Figure 6A). This result argues against 12OH-JA being a negative regulator of JA-Ile defense signaling in *Arabidopsis* leaves. We then tested an alternative mechanism where JAO2 removal would leave more JA available for JA-Ile synthesis and subsequent signaling. This latter possibility was validated by three lines of evidence: (1) analysis of genetic interactions of JAO2 with JAR1 or COI1 showed that the *jao2-2* constitutive defense phenotype was strongly impaired or abolished by JAR1 and COI1 deficiency, respectively, suggesting that the constitutive response depends on the synthesis and perception of a JA-aa conjugate, most likely JA-Ile; (2) when feeding JA to *jao2* mutant, more JA-Ile was accumulated at the expense of 12OH-JA formation (Supplemental Figure 8B); (3) unstimulated leaves of all JAO2-deficient lines accumulated more 12COOH-JA-Ile and 12COOH-JA catabolites, reflecting enhanced flux through JA-Ile metabolism. These results support a model where 12OH-JA formation by JAO2 functions as a metabolic sink to divert JA from being activated to JA-Ile and prevent unwanted expression of JA-Ile-responsive genes (Figure 8A).

Global JA Profiling Provides New Insights into Regulation of the JA Metabolic Grid

It is generally thought that the whole JA metabolic pathway is only triggered in leaves upon stimulation when fatty acid precursor becomes available (Schaller and Stintzi, 2009; Kombrink, 2012; Wasternack and Hause, 2013). However, the genetic and metabolic data provided in this study suggest that even in absence of stress stimulation, JAO oxidation is continuously acting on trace levels of JA, the removal of which contributes to maintain defenses repressed in WT leaves. In *jao2* lines, more, or a specific sub-pool of JA is converted into JA-Ile, which is rapidly turned over while directing constitutive defense signaling (Figure 8A). Upon mechanical wounding, higher levels of JA accumulated in *jao2* or *jao4* lines, illustrating that JAO activity significantly contributes to the turnover of newly synthesized JA after this stimulus. More JA accumulation and subsequent channeling into additional JA-Ile synthesis was anticipated to explain the enhanced antifungal resistance phenotype recorded in *jao2*. However, in a whole-leaf analysis, no additional JA-Ile accumulation was observed compared with WT, although it cannot be excluded that, at a cellular level, more JA-Ile builds up in *jao2* lesions. Clearly, additional approaches are needed to understand the complex regulation of JA-Ile homeostasis. Importantly, the enhanced pathogen resistance features of *jao2* plants are determined prior to pathogen challenge. Our findings demonstrate that JAO2 defines an important metabolic switch that controls input into the JA-Ile signaling pathway. This new regulatory node does not operate by hormone inactivation as previously

A Unchallenged leaves



B 12OH-JA formation upon stress (WT)

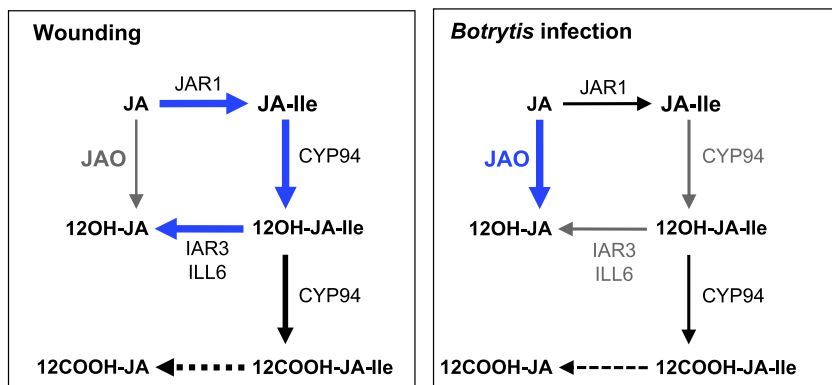


Figure 8. Working Model for Impact of JAO on JA Metabolism and Defense Signaling.

(A) A metabolic switch controlled by JAO2 activity defines flux and signaling through JA-Ile hormone in unchallenged leaves. In WT leaves, in the absence of a JA-triggering stimulus, JAO2 activity ensures a continuous turnover of basal JA by its oxidation to 12OH-JA and potential derivatives. This minimizes JA-Ile synthesis, signaling, and catabolism and maintains repression of JA-Ile responses. In *jao2* leaves, reduced JA consumption channels more JA toward JA-Ile synthesis, resulting in constitutive defense signaling and catabolism, and primes leaves for enhanced antimicrobial resistance. For compound structures, see Figure 1A.

(B) Differential contributions of distinct 12OH-JA formation pathways upon wounding and infection stress in *Arabidopsis* leaves. The thickness of the arrows reflects the importance of metabolic flux in the respective routes. Upon mechanical wounding (left panel), 12OH-JA is formed predominantly via a 12OH-JA-Ile conjugate intermediate generated by JA-Ile catabolism. Upon fungal infection (right panel), the bulk of 12OH-JA accumulated originates from JAO oxidizing activity on JA. For clarity, fluxes in stressed leaves are shown only for WT background, and potential 12OH-JA derivatives are not shown. Dotted arrows represent an uncharacterized pathway generating 12COOH-JA, a further downstream JA catabolite.

reported (Caarls et al., 2017), but rather diverts the inactive prohormone (JA) from being converted to the active hormone (JA-Ile). In addition to the powerful negative control of JA responses by JAZ repressors (Pauwels and Goossens, 2011), metabolic diversion upstream of JA-Ile is an efficient way to maintain repressed signaling. Future research will aim to define organs and physiological situations in which JAO activity may contribute to regulate specific JA responses. It will also be of interest to determine how such a regulation is functionally conserved in crop plant species.

Distinct Metabolic Routes Predominate for 12OH-JA Synthesis upon Leaf Wounding or Fungal Infection

The elucidation of a second 12OH-JA biosynthesis route provides an interesting case to study pathway interactions. Previous analyses of wounded *cyp94-* or *iar3/ill6*-deficient lines (Widemann et al., 2013; Zhang et al., 2016) revealed that 12OH-JA levels were strongly reduced in the early time points, indicating that during mechanical damage (and probably insect attack), the CYP94-AH pathway via conjugated intermediates is generating most 12OH-JA (Figure 8B left panel). At later time points (5 hpw and afterward), synthesis is shifted to a Regalis-sensitive pathway. We further show that 12OH-JA is only weakly affected in the *iar3 ill6* double mutant after fungal infection, confirming that the CYP94-AH pathway is dispensable for 12OH-JA accumulation upon microbial stress (Aubert et al., 2015). The genetic, biochemical, and physiological characterization of JAOs establishes a different path for 12OH-JA formation in infected leaves (Figure 8B, right panel), where most 12OH-JA originates from JAO activity. The picture emerging is that,

in the indirect pathway, 12OH-JA is a breakdown product downstream of the hormone JA-Ile while direct JA oxidation acts upstream of JA-Ile with a functional impact on signaling. Understanding of the exact cellular consequences of two 12OH-JA formation pathways will require new approaches to determine if more than one pool of 12OH-JA with different fates and functions may exist. Also, 11OH-JA derivative, another hydroxylated JA of unknown origin, which cannot be distinguished by standard LC-MS/MS methods from 12OH-JA, is present in lower abundance in various plant organs/species (Miersch et al., 2008), so that more refined structural studies are needed in the future.

In conclusion, the characterization of the new JAO-catalyzed JA oxidation pathway fills an important gap in our knowledge of JA metabolism, reveals new stress-specific dynamics in the JA conversion grid, and uncovers a metabolic diversion node with a major impact on pathway signaling output before plants experience stress.

METHODS

Phylogenetic Analysis

Arabidopsis 20GD protein sequences from the DOXC clade as defined by Kawai et al. (2014) were retrieved from the TAIR site (<http://www.arabidopsis.org>) and 36 sequences involved in hormone metabolism were extracted. Analysis was conducted using the Phylogeny suite (Dereeper et al., 2008). Multiple alignment was performed with the Muscle algorithm, and alignment was curated using G blocks prior to phylogeny analysis using the bootstrapping procedure with the PhyML software.

Molecular Plant

Plant Growth and Treatment

Arabidopsis thaliana genotypes used were either in the Col0 or in WS ecotype and were grown under a 12 h light/12 h dark photoperiod in a growth chamber. The following T-DNA insertion lines were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center: *jao2-1* (SALK_206337C, Col0), *jao2-2* (GK_870C04, Col0), *jao3-1* (SAIL_861E01, Col0); *jao3-2* (FLAG_304H06, WS), *jao4-1* (SAIL_268B05, Col0), *jao4-2* (FLAG_064H09, WS), *jar1-1*, and *coi1-1*. Double *jao2-1jao4-1*, *jao2-2jar1-1*, *jao2-2coi1-1* mutants were obtained by crossing and PCR genotyping of F2 progeny. Overexpressing lines were generated by recombining JAO open reading frames ending with a stop codon into the pB7RWG2 vector. Recombinant plasmids were mobilized in *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain before plant transformation by the floral dip method (Bent, 2006).

For wounding experiments, between four and six fully expanded leaves of 6- to 7-week-old plants were wounded three times across the midvein with a hemostat. At increasing time points following mechanical damage, leaf samples were quickly harvested and flash frozen in liquid nitrogen before storing at -80°C until analysis.

The prohexadione-calcium (Regalis) treatment was performed as follows: plants were pulverized either with water (for mock experiment) or with Regalis solution (0.5 mg/ml) 2 h prior and immediately after wounding. Regalis powder was kindly provided by Prof. A. Hehn (Université de Lorraine, France).

For seedling jasmonate treatment, surface-sterilized seeds were germinated in 24-well microtiter plates under a 16 h light/8 h dark photoperiod at 22°C in the following medium: 1 × MS liquid medium, supplemented with 0.5% sucrose and 0.05% MES buffer. Seedlings were grown for 7 days before gentle addition of either synthetic JA-Ile (15 μM), 12OH-JA (30 μM), or both compounds. At increasing time points after treatment, seedlings were quickly harvested and flash frozen in liquid nitrogen before storing at -80°C until RNA extraction. JA-Ile and 12OH-JA were chemically synthesized as described in Widemann et al. (2013). For plant mass determination, rosettes of 6-week-old plants were excised above ground and immediately weighed on a high-precision weighing scale.

Anthocyanin Content Determination

Anthocyanins were extracted from petioles of 6-week-old plants as described in Poudel et al. (2016). Relative abundance was calculated with the formula $A_{530} - (A_{657} \times 0.25)$ and was normalized by the tissue weight.

Botrytis cinerea Resistance Assays and Relative Quantification

Fungal infection experiments were conducted as described in Aubert et al. (2015). *Botrytis cinerea* growth in inoculated leaves was determined by quantification of fungal DNA relative to plant DNA at 3 dpi. For plant/fungal DNA extraction, 400 μL of buffer (0.2 M Tris-HCl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) were added to frozen leaf powder (50–70 mg fresh weight) from infected plants. The material was ground for 30 s with a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies,

Jasmonic Acid Oxidase Attenuates Immune Responses

Montigny-Le-Bretonneux, France). Homogenate was cleared by centrifugation, DNA in the supernatant was precipitated with isopropanol, and the DNA was finally resuspended in 10 mM Tris-HCl (pH 8). Measurement of fungal biomass was based on real-time PCR quantification of the fungal *CUTINASE* signal (Z69264) relative to *Arabidopsis ACTIN2* measured as described in Berr et al. (2010). Primer sequences are detailed in Supplemental Table 1.

RT-qPCR Gene Expression Assays

Total RNA was extracted from plant leaves with TRIzol reagent (Molecular Research Center). One microgram of RNA was reverse transcribed using the SuperScript IV reverse transcription system (Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR was performed on 10 ng of cDNA as described in Berr et al. (2010) using a LightCycler 480 II instrument (Roche Applied Science). The housekeeping genes *EXP* (At4g26410) and *TIP41* (At4g34270) were used as internal references for rosette-stage plants and *TIP41* and *EXP* or *GAPDH* (At1g13440) for experiments with seedlings. Gene-specific primer sequences used for qPCR are listed in Supplemental Table 1.

JAO Recombinant Protein Expression

For heterologous expression of JAO proteins, open reading frame sequences were amplified using Phusion *Taq* Polymerase (Thermo Fisher Scientific) prior to cloning in the pDONR-Zeo vector in the DH5 α *Escherichia coli* strain. Inserts with error-free sequences were recombined into the expression vector pHGWA. Plasmids were further transformed into *E. coli* Rosetta 2 (DE3) strain (Novagen). Ice-cold bacterial pellets from isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside-induced cultures were collected and resuspended in 15 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 3 mg/ml of lysozyme, 1 mM AEBSF) for 0.5 L of induced culture. Bacteria were lysed by thawing on ice for 30 min and then sonication on ice for 1 min. Clarified protein lysates were filtered and incubated with 100 μL of pre-equilibrated lysis buffer Ni-Sepharose 6 FastFlow (GE Healthcare). Binding was performed in a batch for 1.5 h in a cold room. The Ni-Sepharose beads with bound proteins were charged on a Poly-Prep chromatography column (Bio-Rad), washed five times with 1 ml of lysis buffer. Proteins were eluted three times with 0.5 ml of lysis buffer containing 100 mM imidazole, then twice with 0.5 ml of lysis buffer containing 250 mM imidazole. Protein purity was determined by SDS-PAGE, and concentration was estimated via quantification with Bradford reagent using a bovine serum albumin calibration series.

For determination of enzymatic activities, incubation conditions were based on those described for S3H and DAO enzymes (Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2013). Incubations were performed in 150 μL , containing 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM DTT, 13.3 mM 2-oxoglutarate, 13.3 mM ascorbate, 0.67 mM FeSO_4 , 50 μM substrate, 10 μg of enzyme complemented with BSA up to 20 μg protein/reaction. Reactions were incubated at 30°C for 1 h and stopped by addition of 1/5 vol of 1 M HCl before extraction with 180 μL of ethyl acetate. After vortexing for 1 min, the upper organic phase was dried under N_2 flow and reconstituted in 100 μL of MeOH before UPLC-MS/MS analysis as described below.

Jasmonate Profiling

Jasmonates were identified and quantified by UPLC–MS/MS. LC–MS analysis of enzymatic activity of recombinant JAO proteins and extraction of jasmonates from plant samples was performed as described in Widemann et al. (2013). Extraction solution containing internal standards 9,10-dh-JA and 9,10-dh-JA-Ile was used for non-Ile-conjugated and Ile-conjugated recovery calculations, respectively. The transitions for enzymatic reaction substrates were as follows: JA (209 > 59, –), JA-Ile (324 > 151, +), IAA (176 > 130, +), SA (137 > 93, –), OPDA (293.4 > 275.3, +) with + and – indicating analysis in positive or negative mode, respectively. Quantitative JA profiles of plant extracts were analyzed using an EVOQ Elite LC–TQ (Bruker) equipped with an electrospray ionization source and coupled to an HTC Pal-xt (Bruker) and an Advance UHPLC system (Bruker). Five microliters of plant extracts were injected. Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC HSS T3 column (100 × 2.1 mm, 1.8 μm; Waters) and pre-column. The mobile phase consisted of (A) water and (B) methanol, both containing 0.1% formic acid. The run started with 2 min of 95% A, then a linear gradient was applied to reach 99% B at 10 min, followed by an isocratic run using B during 1.5 min. Return to initial conditions was achieved in 1 min, with a total run time of 15 min. The column was operated at 35°C with a flow rate of 0.35 ml/min, injecting 3 μL samples. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. The nebulizer gas flow was set to 35 L/h, and the desolvation gas flow to 30 L/h. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 300°C. The capillary voltage was set to 3.5 kV; the ionization was in positive or negative mode. Low-mass and high-mass resolution was 2 for the first mass analyzer and 2 for the second. Data acquisition was performed with the MS Workstation 8 software and analysis with the MS Data Review software. Absolute quantifications were achieved by comparison of sample signals with dose–response curves established with pure compounds. The transitions were, in negative mode: JA-Ile 322.3 > 130.2; 12OH-JA-Ile 338.3 > 130.2; 12COOH-JA-Ile 352.2 > 130.1; 12OH-JA 225.2 > 59.3; 12COOH-JA 239.2 > 59.3; JA 209.3 > 59.3.

Statistical Analysis

All statistical analysis was performed using InfoStat 2015d (<http://www.infostat.com.ar>). Comparisons of sample means were performed by one-way analysis of variance ($P \leq 0.05$ or $P \leq 0.01$) and Tukey's post-hoc multiple comparisons tests ($P \leq 0.05$ or $P \leq 0.01$), and significant differences of means were determined.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information is available at *Molecular Plant Online*.

FUNDING

The work was supported by basic funding of CNRS and grant ANR-12-BSV8-005 (JASMONOX) from the Agence Nationale de la Recherche to E.S. and Y.A., and IdEx-2014-208e interdisciplinary grant to L.P. from Université de Strasbourg and CNRS. V.M. is recipient of a predoctoral fellowship from the Université de Strasbourg and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.H. conceived the research, T.H., E.S., and L.M. designed experiments. E.S., V.M., L.P., Y.A., and J.Z. performed experiments. T.H., E.S., V.M.,

and R.M. analyzed data. T.H. wrote the manuscript with input from all authors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Heintz for access to the IBMP Metabolomics platform, J. Delcolle and L. Schramm for assistance in LC–MS analysis, M. Lecorbeiller for help with plant growth experiments and statistical analyses, E. Grienberger for phylogenetic analysis, J. Browse (Pullman, USA) for providing a segregating *iar3-5 ill6-2* seed stock, and the IBMP gardener team for support in the production of the numerous plants used in the study. We are grateful to D. Werck-Reichhart and T. Blevins for critical reading of the manuscript. No conflict of interest declared.

Received: May 15, 2017

Revised: July 12, 2017

Accepted: July 19, 2017

Published: July 28, 2017

REFERENCES

- Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F., and Heitz, T. (2015). CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to *Botrytis cinerea* infection. *J. Exp. Bot.* **66**:3879–3892.
- Bent, A. (2006). *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods Mol. Biol.* **343**:87–103.
- Berr, A., McCallum, E.J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T., and Shen, W.H. (2010). *Arabidopsis* histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol.* **154**:1403–1414.
- Brewer, P.B., Yoneyama, K., Filardo, F., Meyers, E., Scaffidi, A., Frickey, T., Akiyama, K., Seto, Y., Dun, E.A., Cremer, J.E., et al. (2016). LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**:6301–6306.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**:183–205.
- Bruckhoff, V., Haroth, S., Feussner, K., König, S., Brodhun, F., and Feussner, I. (2016). Functional characterization of CYP94-genes and identification of a novel jasmonate catabolite in flowers. *PLoS One* **11**:e0159875.
- Caarls, L., Elberse, J., Awwanah, M., Ludwig, N.R., de Vries, M., Zeilmaker, T., Van Wees, S.C.M., Schuurink, R.C., and Van den Ackerveken, G. (2017). *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**:6388–6393.
- Campos, M.L., Yoshida, Y., Major, I.T., de Oliveira Ferreira, D., Weraduwage, S.M., Froehlich, J.E., Johnson, B.F., Kramer, D.M., Jander, G., Sharkey, T.D., et al. (2016). Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nat. Commun.* **7**:12570.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., et al. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**:666–671.
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., and Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **33**:147–156.
- Creelman, R.A., and Mullet, J.E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:355–381.

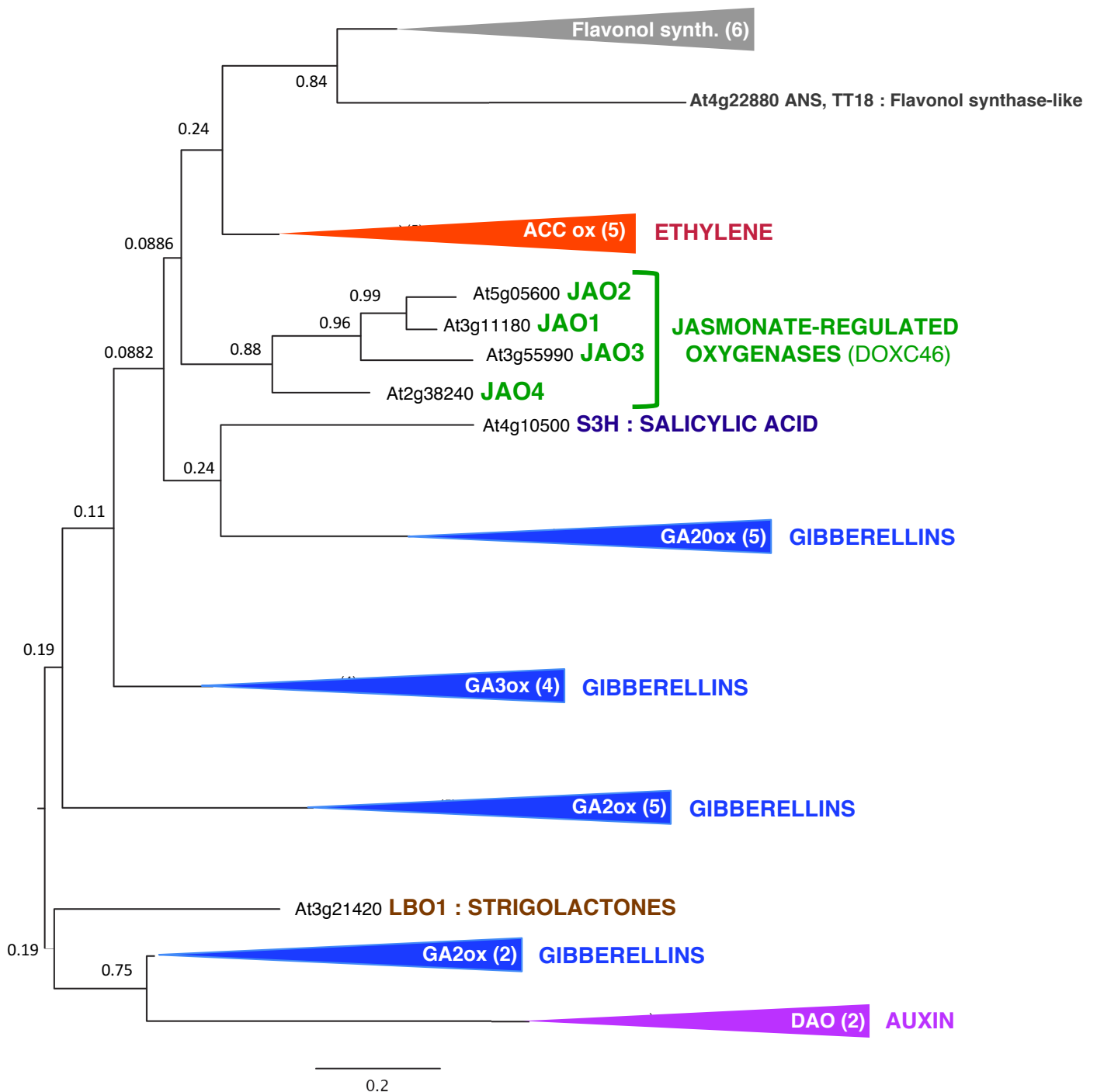
Molecular Plant

- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**:W465–W469.
- Eng, F., Haroth, S., Feussner, K., Meldau, D., Rekhter, D., Ischebeck, T., Brodhun, F., and Feussner, I. (2016). Optimized jasmonic acid production by *Lasiodiplodia theobromae* reveals formation of valuable plant secondary metabolites. *PLoS One* **11**:e0167627.
- Fonseca, S., Chico, J.M., and Solano, R. (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**:539–547.
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E.E., and Wolfender, J.L. (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J. Biol. Chem.* **283**:16400–16407.
- Goossens, J., Mertens, J., and Goossens, A. (2017). Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *J. Exp. Bot.* **68**:1333–1347.
- Hedden, P., and Thomas, S.G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* **444**:11–25.
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., et al. (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *J. Biol. Chem.* **287**:6296–6306.
- Heitz, T., Smirnova, E., Widemann, E., Aubert, Y., Pinot, F., and Menard, R. (2016). The rise and fall of jasmonate biological activities. *Subcell. Biochem.* **86**:405–426.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L., and He, S.Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Mol. Plant* **7**:1267–1287.
- Jimenez-Aleman, G.H., Machado, R.A.R., Baldwin, I.T., and Boland, W. (2017). JA-Ile-macrolactones uncouple growth and defense in wild tobacco. *Org. Biomol. Chem.* **15**:3391–3395.
- Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., and Howe, G.A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:7100–7105.
- Kawai, Y., Ono, E., and Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant J.* **78**:328–343.
- Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., Matsui, H., Nabeta, K., and Matsuura, H. (2011). *Arabidopsis* CYP94B3 encodes jasmonoyl-L-isoleucine 12-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of jasmonate. *Plant Cell Physiol.* **52**:1757–1765.
- Kitaoka, N., Kawaide, H., Amano, N., Matsubara, T., Nabeta, K., Takahashi, K., and Matsuura, H. (2014). CYP94B3 activity against jasmonic acid amino acid conjugates and the elucidation of 12-O-beta-glucopyranosyl-jasmonoyl-L-isoleucine as an additional metabolite. *Phytochemistry* **99**:6–13.
- Koda, Y., Kikuta, Y., Tazaki, H., Tsujino, Y., Sakamura, S., and Yoshihara, T. (1991). Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* **30**:1435–1438.
- Kombrink, E. (2012). Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* **236**:1351–1366.
- Koo, A.J., Gao, X., Jones, A.D., and Howe, G.A. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J.* **59**:974–986.

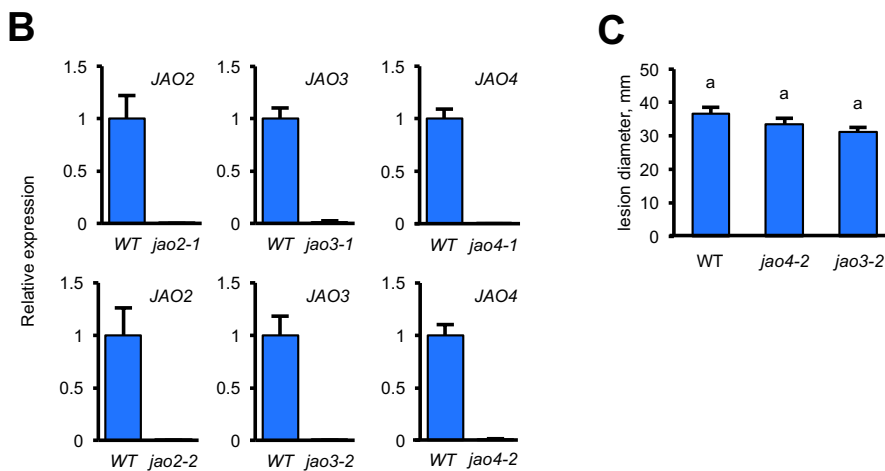
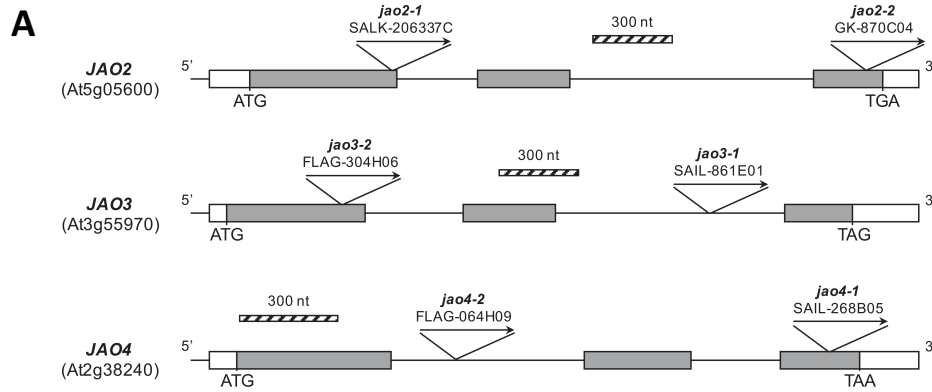
Jasmonic Acid Oxidase Attenuates Immune Responses

- Koo, A.J., Cooke, T.F., and Howe, G.A. (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**:9298–9303.
- Koo, A.J., Thireault, C., Zemelis, S., Poudel, A.N., Zhang, T., Kitaoka, N., Brandizzi, F., Matsuura, H., and Howe, G.A. (2014). Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **289**:29728–29738.
- Koo, A.J., and Howe, G.A. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**:1571–1580.
- Koo, A.J., and Howe, G.A. (2012). Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine. *Front. Plant Sci.* **3**:19.
- Laudert, D., Schaller, F., and Weiler, E.W. (2000). Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* **211**:163–165.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., and Wasternack, C. (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* **177**:114–127.
- Nakamura, Y., Mithofer, A., Kombrink, E., Boland, W., Hamamoto, S., Uozumi, N., Tohma, K., and Ueda, M. (2011). 12-Hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiol.* **155**:1226–1236.
- Nickstadt, A., Thomma, B.P., Feussner, I., Kangasjarvi, J., Zeier, J., Loeffler, C., Scheel, D., and Berger, S. (2004). The jasmonate-insensitive mutant jin1 shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **5**:425–434.
- Patkar, R.N., Benke, P.I., Qu, Z., Chen, Y.Y., Yang, F., Swarup, S., and Naqvi, N.I. (2015). A fungal monooxygenase-derived jasmonate attenuates host innate immunity. *Nat. Chem. Biol.* **11**:733–740.
- Pauwels, L., and Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**:3089–3100.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**:489–521.
- Poudel, A.N., Zhang, T., Kwasniewski, M., Nakabayashi, R., Saito, K., and Koo, A.J. (2016). Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**:1396–1408.
- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M., and Memelink, J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* **147**:1347–1357.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., and Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**:1795–1814.
- Schaller, A., and Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**:1532–1538.
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C.L., Cooke, T.F., Sheard, L.B., Moreno, J.E., Katsir, L., Zheng, N., Browse, J., and Howe, G.A. (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**:536–550.
- Staswick, P.E., and Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:2117–2127.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C.A., and Wasternack, C. (2003). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific

- generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *Plant J.* **33**:577–589.
- Stitz, M., Gase, K., Baldwin, I.T., and Gaquerel, E.** (2011). Ectopic expression of AtJMT in *Nicotiana attenuata*: creating a metabolic sink has tissue-specific consequences for the jasmonate metabolic network and silences downstream gene expression. *Plant Physiol.* **157**:341–354.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(CO1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**:661–665.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N.J.** (2005). The botany array resource: e-northern, expression angling, and promoter analyses. *Plant J.* **43**:153–163.
- Vialart, G., Hehn, A., Olry, A., Ito, K., Krieger, C., Larbat, R., Paris, C., Shimizu, B., Sugimoto, Y., Mizutani, M., et al.** (2012). A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *Plant J.* **70**:460–470.
- Wasternack, C., and Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* **111**:1021–1058.
- Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., Miesch, M., Pinot, F., and Heitz, T.** (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. *J. Biol. Chem.* **288**:31701–31714.
- Widemann, E., Grausem, B., Renault, H., Pineau, E., Heinrich, C., Lugan, R., Ullmann, P., Miesch, L., Aubert, Y., Miesch, M., et al.** (2015). Sequential oxidation of Jasmonoyl-Phenylalanine and Jasmonoyl-Isoleucine by multiple cytochrome P450 of the CYP94 family through newly identified aldehyde intermediates. *Phytochemistry* **117**:388–399.
- Widemann, E., Smirnova, E., Aubert, Y., Miesch, L., and Heitz, T.** (2016). Dynamics of jasmonate metabolism upon flowering and across leaf stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants (Basel)* **5**, 4.
- Woldemariam, M.G., Onkokesung, N., Baldwin, I.T., and Galis, I.** (2012). Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *Plant J.* **72**:758–767.
- Yan, J., Li, S., Gu, M., Yao, R., Li, Y., Chen, J., Yang, M., Tong, J., Xiao, L., Nan, F., et al.** (2016). Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7-iso-JA-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* **172**:2154–2164.
- Zhang, K., Halitschke, R., Yin, C., Liu, C.J., and Gan, S.S.** (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**:14807–14812.
- Zhang, T., Poudel, A.N., Jewell, J.B., Kitaoka, N., Staswick, P., Matsuura, H., and Koo, A.J.** (2016). Hormone crosstalk in wound stress response: wound-inducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **67**:2107–2120.
- Zhao, Z., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, X., Liu, S., Yu, X., Ren, Y., Zheng, X., Zhou, K., Jiang, L., et al.** (2013). A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev. Cell* **27**:113–122.



Supplemental Figure S1 : Phylogeny tree of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (2OGD) in Arabidopsis. Thirty six 2OGD sequences from Arabidopsis belonging to subclades functionally characterized in hormone or flavonoid metabolism were selected to build maximum likelihood tree. Functional classes are given in a colored triangle with number of isoforms indicated in subclade given in brackets. Bootstrap values (500 iterations) are indicated on branches. Flavonol synth : Flavonol synthase; ACC ox : amino-cyclopropane oxidase; JAO : Jasmonic Acid Oxidase; S3H : salicylate oxidase; GA3ox : Gibberellin 3-oxidase; GA2ox : gibberellin 2-oxidase; GA2ox : gibberellin 2-oxidase.

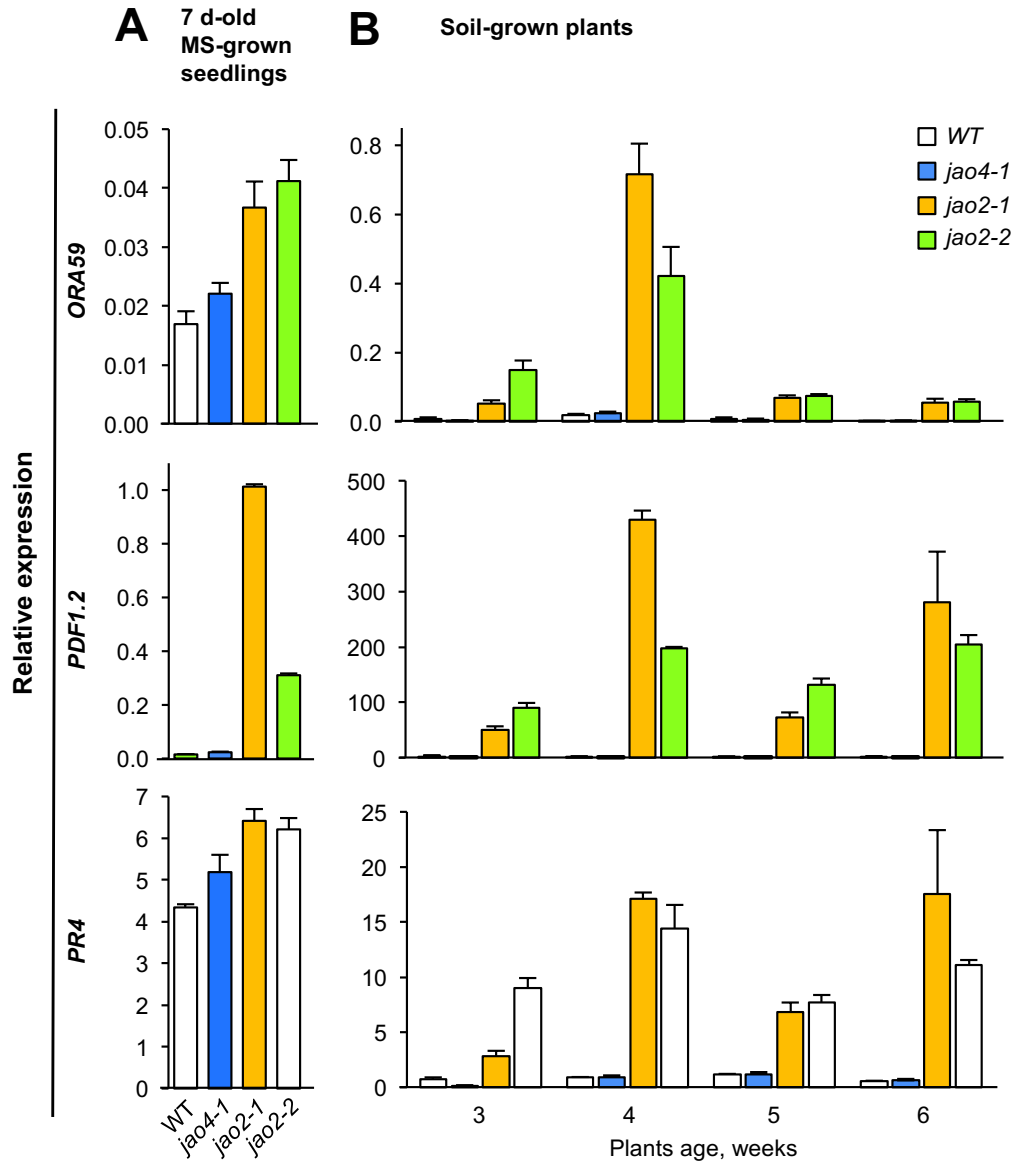


Supplemental Figure S2 : Characterization of *jao* mutant lines used in this study.

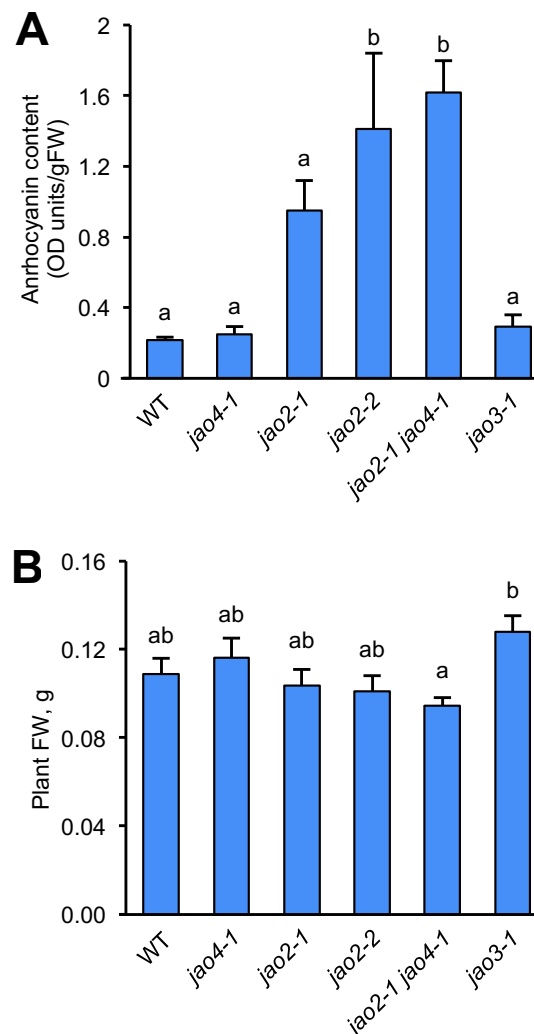
(A) Schematic representation of the two *jao* T-DNA insertion alleles used for each the 3 *JAO* genes. White boxes represent the exons with coding sequences in grey.

(B) Basal expression of *JAO2*, *JAO3* and *JAO4* in WT and respective *JAO*-deficient lines. Expression in *jao* mutants is relative to expression in WT that was set to 1.

(C) Resistance levels to *B. cinerea* of *jao4-2* and *jao3-2* alleles, both in WS background. Two sites across main vein were inoculated with 5 μ L spore suspension. Histograms represent the mean lesion diameters \pm SEM of about 100 lesion sites from 10 plants for each genotype. Columns labelled with different letters indicate a significant difference as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test ($P < 0.01$).



Supplemental Figure S3 : Onset of constitutive defense phenotype during development of *jao* mutant lines. Relative expression of JA-regulated defense markers *ORA59*, *PDF1.2* and *PR4* in **(A)** 7d-old MS-grown *jao* seedlings and in **(B)** soil-grown *jao* plants over a 6-week growth period. Shown are mean \pm SD with three determinations.

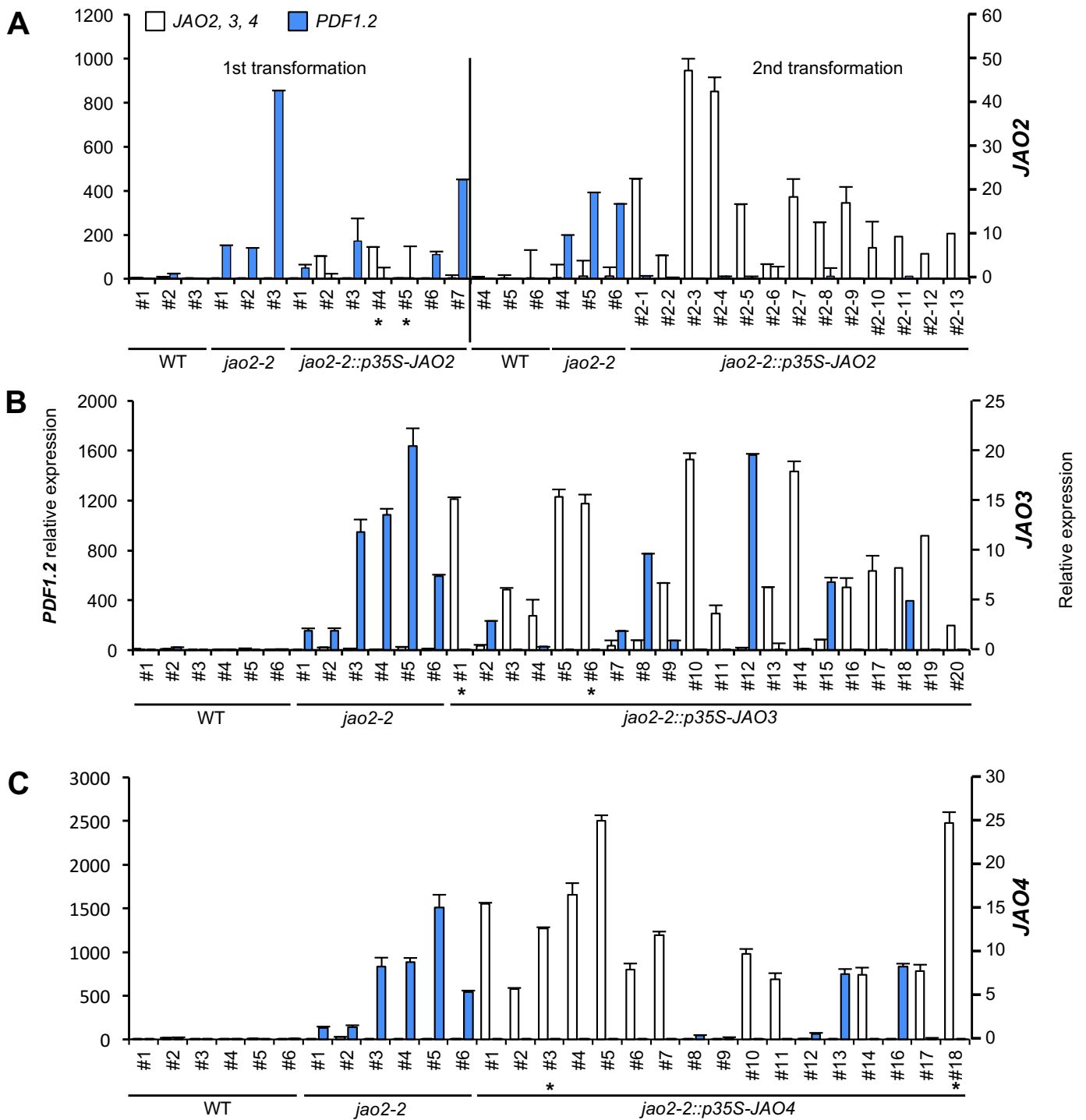


Supplemental Figure S4 : Impact of *jao2* mutation on anthocyanin content and rosette weight.

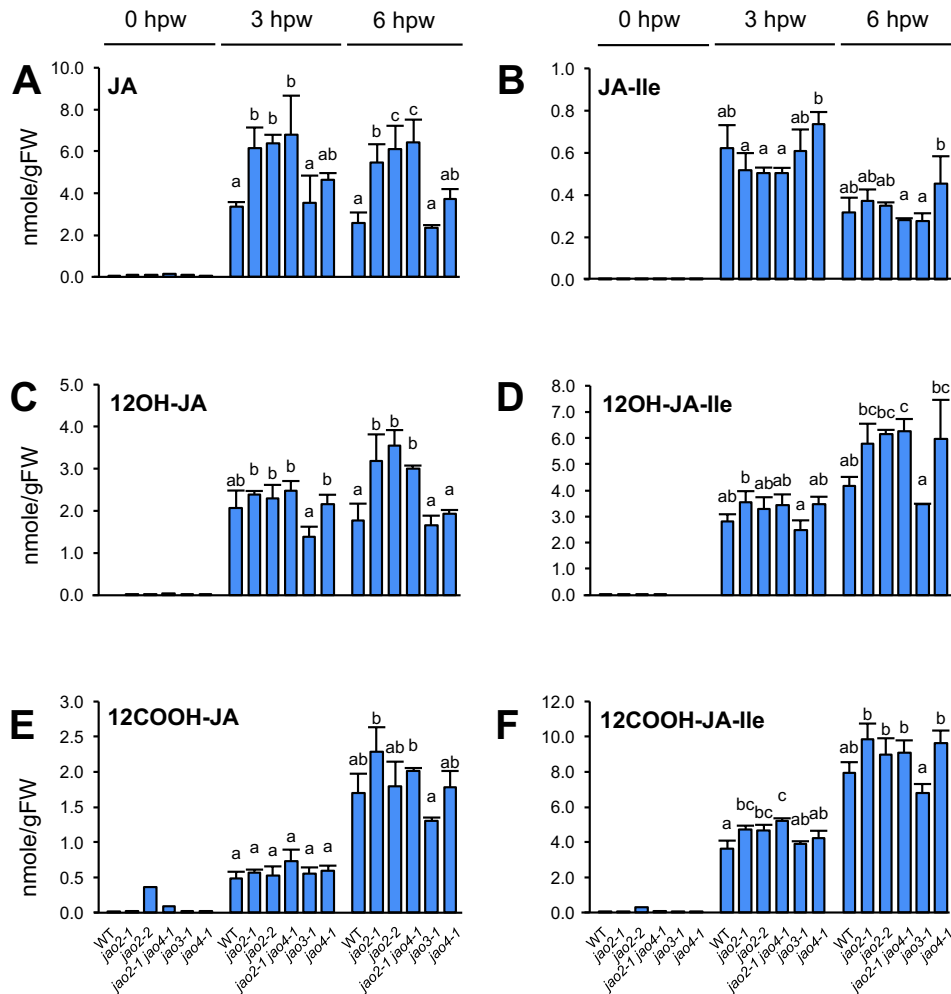
(A) Plants of the indicated genotypes were grown for 6 weeks under long-day conditions before petioles were excised and extracted for anthocyanin content determination. Values are mean \pm SEM of 5 biological replicates.

(B) Plants were grown for 4 weeks and rosettes were excised and weighed. Values are mean \pm SEM of 12 plants for each genotype.

Columns labelled with different letters indicate a significant difference as determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test **(A)** : $P < 0.01$; **(B)** : $P < 0.05$.



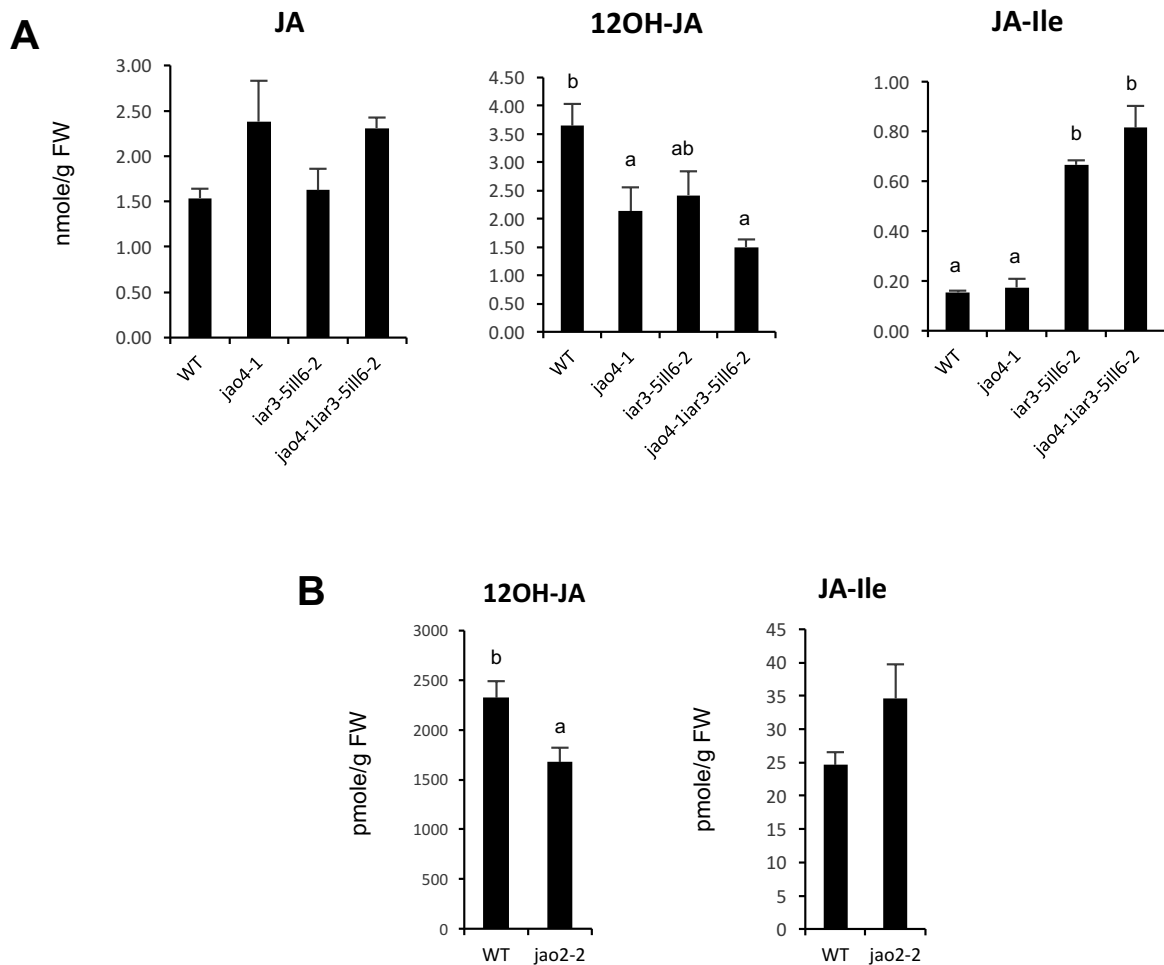
Supplemental Figure S5 : JAO2, JAO3 and JAO4 ectopic overexpression reverts constitutive defense to WT levels in *jao2-2* background. Relative expression (open bars, right scale on the graph) in unstimulated leaves of *JAO2* (A), *JAO3* (B) and *JAO4* (C) genes in twenty primary (T1) 4-week-old *jao2-2* transformants harboring *p35S-JAO2*, *p35S-JAO3* or *p35S-JAO4* constructs respectively. Functional complementation was assessed by evaluating impact of *JAO* transgene overexpression on basal expression of defense marker *PDF1.2* (black bars, left scale on the graphs) as determined by real-time PCR. Histograms represent mean \pm SD with three determinations. Asterisks indicate lines chosen for following experiments.



Supplemental Figure S6 : Jasmonate profiling of *jao* plants upon wounding. Leaves were harvested 0, 3 and 6 hpw, the jasmonates were extracted and the compounds indicated were quantified by LC-MS and expressed in nmole/g FW. Histograms represent the mean \pm SEM of three biological replicates except for 0 hpw which had one replicate. Columns labelled with different letters indicate a significant difference between genotypes determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test $P < 0.05$).

	T0	T 2hpw	T 6hpw	T 3dpi
CYP94B3				
Col0	1	1	1	1
<i>jao2-1</i>	2	0.9	1.4	2.1
<i>jao2-2</i>	22	1.3	1.3	2.5
<i>jao2-1 jao4-1</i>	65	0.9	1.5	3.5
<i>jao3-1</i>	10	0.9	0.7	1
<i>jao4-1</i>	4	0.9	1.2	2.5
CYP94C1				
Col0	1	1	1	1
<i>jao2-1</i>	2.94	1.32	1.39	0.69
<i>jao2-2</i>	3.05	1.31	1.18	0.54
<i>jao2-1 jao4-1</i>	4.89	1.19	1.88	0.91
<i>jao3-1</i>	1.12	1.57	0.96	0.6
<i>jao4-1</i>	1.25	1.73	1.31	1.65
IAR3				
Col0	1	1	1	1
<i>jao2-1</i>	2.57	1.21	1.41	1.15
<i>jao2-2</i>	2.97	1.37	1.72	1.04
<i>jao2-1 jao4-1</i>	2.74	1.14	1.63	1.46
<i>jao3-1</i>	1.41	1.1	0.84	1.08
<i>jao4-1</i>	1.5	1.13	1.05	1.29
ILL6				
Col0	1	1	1	1
<i>jao2-1</i>	6.33	1.52	2.15	1.15
<i>jao2-2</i>	6.51	1.73	2.26	0.95
<i>jao2-1 jao4-1</i>	10.67	1.54	2.53	1.39
<i>jao3-1</i>	1.5	1.03	0.9	0.76
<i>jao4-1</i>	1.85	1.23	1.37	1.88
JAO2				
Col0	1	1	1	1
<i>jao3-1</i>	1.9	1.3	0.9	1.1
<i>jao4-1</i>	2.7	1.3	1.3	2.1
JAO3				
Col0	1	1	1	1
<i>jao2-1</i>	32.1	1.2	1.9	1.3
<i>jao2-2</i>	65.3	1	1.2	0.9
<i>jao2-1 jao4-1</i>	251.6	0.9	1.7	2.2
<i>jao4-1</i>	6.4	1.1	1.2	2.8
JAO4				
Col0	1	1	1	1
<i>jao2-1</i>	2.66	0.91	1.2	0.8
<i>jao2-2</i>	60.2	0.95	0.83	0.5
<i>jao3-1</i>	2.34	1.16	0.8	1.67

Supplemental Figure S7 : Transcript levels of JA/JA-Ile catabolic genes in JAO-deficient lines in untouched leaves or upon wounding (2 and 6 hpw) or after infection by *B. cinerea* (3 dpi). Expression was determined by real-time qPCR and is represented as fold induction relative to WT (Col-0) expression level that was set to 1. Hpw : hours post-wounding; dpi : days post-inoculation. Data shown are mean of three determinations.



Supplemental Figure S8 : The *jao2* and *jao4* mutants are impaired in 12OH-JA formation.

(A) Six-week-old plants of the indicated genotypes were *Botrytis*-inoculated as indicated in Figure 7. JA, 12OH-JA and JA-Ile levels were determined at 3 dpi by LC-MS and expressed in nmol/g FW.

(B) Ten-days-old, MS-grown WT and *jao2-2* plants were sprayed with a 100 μ M JA solution and harvested after 4.5 h. JAs were extracted and 12OH-JA and JA-Ile were quantified by LC-MS and expressed in pmol/g FW.

Columns labelled with different letters indicate a significant difference between genotypes determined by one-way ANOVA with Tukey post-hoc test $P < 0.05$.

Table S1. Primers used in the study

Gene/allele (locus)	Primer name	Sequence (5' -> 3')
qPCR		
<i>EXP (At4g26410)</i>	At4g26410-qPCR-F	gagctgaagtggtccatgac
	At4g26410-qPCR-R	ggtccgacataccatgatcc
<i>GAPDH (At1g13440)</i>	GAPDH-qPCR-F	ttggtgacaacaggtaagca
	GAPDH-qPCR-R	aaactgtcgctcaatgaatc
<i>TIP4.1 (At4g34270)</i>	TIP41_LP	atgctgttgacgcactagc
	TIP41_RP	ctgcagcaggaactcaaca
<i>Actin (At3g18780)</i>	Act_for	cttgaccaagcagcatgaa
	Act_rev	ccgatccagacactgtacttctt
<i>Cutinase (B.c. Z69264)</i>	cut-A_for	gatgtgacggatcattgccc
	cut-A_rev	agatttgagagcggcgagg
<i>JAO1 (At3g11180)</i>	JAO1_qPCR_for	cgtaggacactgtcaatcct
	JAO1_qPCR_rev	cgatgtccacgctcttgta
<i>jao2-1 (At5g05600)</i>	jao2-1_qPCR_for	ggctatggaagtagactaggt
	jao2-1_qPCR_rev	gcttcaactagctcttcgc
<i>jao2-2 (At5g05600)</i>	jao2-2_qPCR_for	cctcctttataccctcccatgac
	jao2-2_qPCR_rev	ttgccttgtagccttgagttc
<i>jao3-1 (At3g55970)</i>	jao3-1_qPCR_for	agtcctcatgctttcatcgtt
	jao3-1_qPCR_rev	cgatcactgtgttctacgct
<i>jao3-2 (At3g55970)</i>	jao3-2_qPCR_for	gatatggaagccgactaggcgta
	jao3-2_qPCR_rev	aggaaggccacttggtgt
<i>jao4-1 (At2g38240)</i>	q_jao4-1F	ggaatttacaagcgtggaaca
	q_jao4-1R	cgggatatcacttctcgggt
<i>jao4-2 (At2g38240)</i>	q_jao4-2-F (FLAG_064H09)	cttcataagaaacccttcaa
	q_jao4-2-R (FLAG_064H09)	tccgtactttcgatcaattctc
<i>CYP94B3 (At3g48520)</i>	CYP94B3 qPCR F62	tggcttacacgaaggctgtc
	CYP94B3 qPCR R62	agtcccacgaaactggaggat
<i>CYP94C1 (At2g27690)</i>	CYP94C1 qPCR F63	ggcccggattacgaagagttt

	CYP94C1 qPCR R63	ggccggaacttacctcgtt
<i>IAR3 (At1g51760)</i>	iar3-63047-qR	tcggattaagcaagtgaagga
	iar3-63047-qF	ttgctctgtaccctgct
<i>ILL6 (At1g44350)</i>	ILL6-GK212E12-F	gtgtcccatatccatccaacgg
	ILL6-GK212E12-R	agactaatgaccgcggaagaag
<i>ORA59 (At1g06160)</i>	ORA59_qPCR_for	ttcgacgttgacatcttctcc
	ORA59_qPCR_rev	tcttgcgtcataacaacactctg
<i>PDF1.2 (At5g44420)</i>	E39-PDF1.2-L	cacccttatctcgctgctctt
	E40-PDF1.2-R	tacacttggtgctggaagac
<i>PR4 (At3g04720)</i>	E43-PR4-L	gccatctcattgtgactaccaatt
	E44-PR4-R	atcaatggccgaaacaagca
JAOs cloning in pDONR-Zeo		
JAO2	attB1_AT5G05600	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcatgaacaagaacaagattgatgtt
	attB2_AT5G05600	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtttaacgaggagaaatagagattc
JAO3	JAO3-pZeo-for	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcatgaatatctccaagactggcctg
	JAO3_Nf-pZeo-rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctatcgaggggatttaagttcgtca
JAO4	attB1_at2g38240	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcatggctacatgctggcctgagccg
	attB2_at2g38240	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtttatctagttaataacagtgagtc
T-DNA genotyping		
	LB3 (SAIL)	tagcatctgaattcataaccaatctcgatacac
	Lb1.3 (SALK)	atcttgccgatttcggaac
	GABI8409LB	atattgaccatcatactcattgc
	TAG5 (Versailles collection WS)	ctacaaattgccttttctatcgac
<i>jao2-1</i>	Jao2-1LP	cgttgtgtgcatctattgtgc
	Jao2-1RP	aatcagccttctcacattccc
<i>jao2-2</i>	jao2-2_LP	ctaccactgggtgcaaaaatg
	jao2-2_RP	ccacgttttcaaacatgacg
<i>jao3-1</i>	jao3-1_LP	gaaccagtcggcagctctcag
	jao3-1_RP	tcatttcagggttcacgatc
<i>jao3-2</i>	jao3-2_LP	ctgaagactggcgactgttc

	jao3-2_RP	ttcgtgtcaatccttatctg
<i>jao4-1</i>	jao4-1LP	gtgagaaaactgtgcaaagg
	jao4-1RP	tggccaaccataattcattg
<i>jao4-2</i>	jao4-2LP	gtgagaaaactgtgcaaagg
	jao4-2RP	atgcaagggaaaacgaaaatc

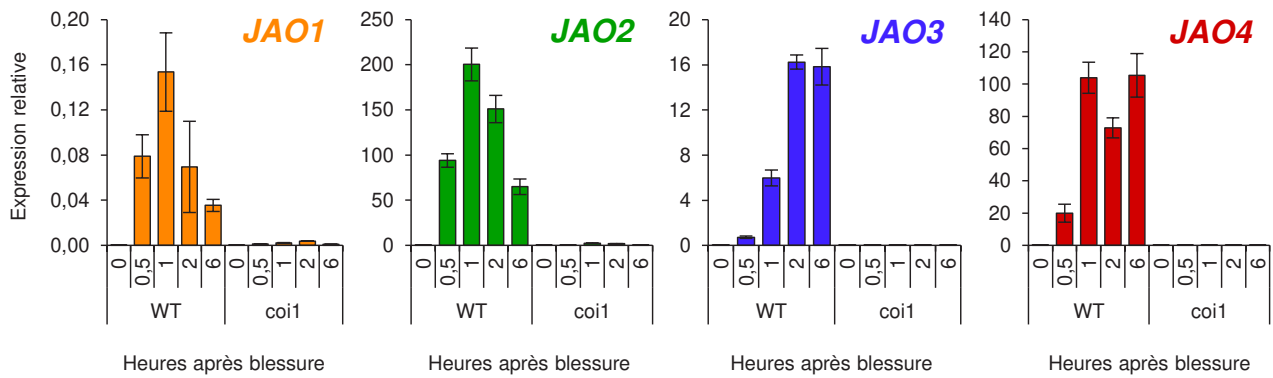


Figure 3.7. Expression des JAO lors d'une cinétique de blessure.

Expression relative de *JAO1* (en orange), de *JAO2* (en vert), de *JAO3* (en violet) et de *JAO4* (en rouge) lors d'une cinétique de blessure de 0, 0,5, 1, 2 et 6 heures après stimulus dans des feuilles WT et *coi1*. L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un réplica biologique analysé en triplicat technique. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative \pm l'écart type.

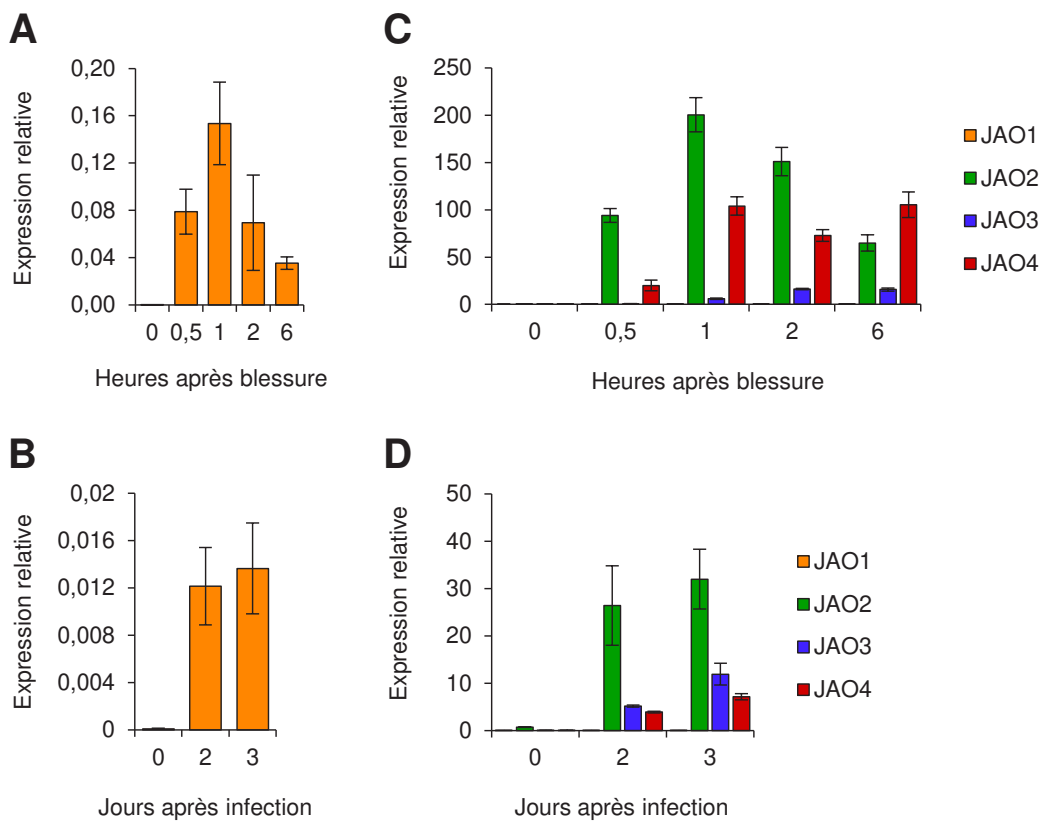


Figure 3.8. Profil d'expression de JAO1.

L'expression relative de *JAO1* (en orange) dans les feuilles en réponse à (A) une blessure et (B) une infection fongique par *Botrytis cinerea*. L'induction de l'expression de *JAO1* (en orange), de *JAO2* (en vert), de *JAO3* (en violet) et de *JAO4* (en rouge) dans les feuilles en réponse à (C) une blessure et (D) une infection fongique par *Botrytis cinerea*. L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un réplica biologique analysé en triplicat technique. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative \pm l'écart type.

Avec cet article nous avons mis en évidence le rôle des JAO, et particulièrement de JAO2, en définissant un mécanisme original d'atténuation des réponses par détournement métabolique. Certaines expérimentations ne figurent que partiellement dans la publication. Par ailleurs, certains axes mineurs du projet qui n'étaient pas cruciaux pour la compréhension et aux conclusions de l'article n'étaient pas complètement terminés au moment de la soumission. Ces différentes données complémentaires sont donc présentées ci-dessous.

3. Données complémentaires

3.1. L'expression des JAO après blessure dépend de COI1

Nous avons démontré que l'induction de l'expression des JAO est perdue dans les feuilles chez le mutant de perception *coi1* deux heures après blessure (Figure 2C, article). Ce résultat est tiré d'une cinétique complète de blessure. La Figure 3.7 montre que contrairement à l'expression basale (Figure 2D, article), l'induction de l'expression est perdue chez *coi1* à tous les temps après blessure pour les quatre gènes, ce qui montre une régulation commune et une activation dépendant de la perception de JA-Ile (Figure 3.7).

3.2. JAO1 et allèles secondaires

Les JAO représentent un clade de quatre gènes (Figure S1, article) et nous nous sommes intéressés à l'étude uniquement des JAO2, JAO3 et JAO4 en excluant JAO1 de nos travaux pour plusieurs raisons. Premièrement JAO1, qui est phylogénétiquement le plus proche de JAO2 qui porte le rôle majeur d'oxydation du JA avant stress, présente une expression basale très faible, voire indétectable, par rapport aux trois autres JAO (Figure 2D, article). Ensuite bien que JAO1 soit induit par la blessure (Figure 3.8A) et par l'infection fongique (Figure 3.8B), son expression reste très faible et est très minoritaire comparée à l'induction de l'expression des autres JAO en réponse à ces deux stimuli (Figure 3.8C et 3.8D). Cela présage que la fonction biologique foliaire de JAO1 est négligeable au regard de celle de JAO3, de JAO4 et surtout de JAO2 en réponse à la blessure et à l'infection par un nécrotrophe. Enfin les données d'expression publiques (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) sont en accord avec nos données et indiquent qu'en réponse à d'autres stress biotiques, JAO1 est plus de 1000 fois moins exprimé que les trois autres JAO. C'est l'ensemble de ces données qui nous a permis de choisir de focaliser nos efforts sur la caractérisation fonctionnelle et biologique de JAO2, de JAO3 et de JAO4. De plus l'expression de JAO1 n'est que faiblement induite chez les mutants simples et multiples des trois autres JAO (Figure 3.9), là où l'expression d'autres JAO est clairement induite, notamment JAO3 et JAO4 chez les mutants *jao2* en réponse à la signalisation constitutive (Figure S7, article). L'absence d'évidence d'un rôle foliaire de JAO1

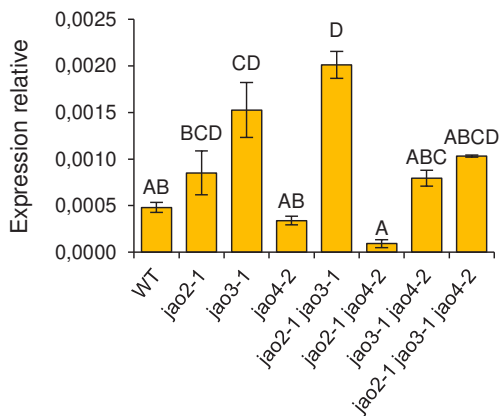


Figure 3.9. Expression foliaire de *JAO1* chez différents mutants *jao*.

L'expression de *JAO1* dans des feuilles de rosette adulte a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques du gènes et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un triplicat biologique analysé en triplicat technique. L'histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm l'écart-type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

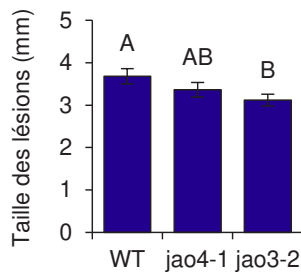


Figure 3.10. Résistance des allèles *jao* de l'écotype Wassilewskija en réponse à l'infection par *Botrytis cinerea*.

Évaluation des symptômes par le diamètre des lésions trois jours après l'infection. L'histogramme représente la moyenne du diamètre d'une centaines de lésions \pm SEM de 10 à 15 plantes différentes pour chaque génotype. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

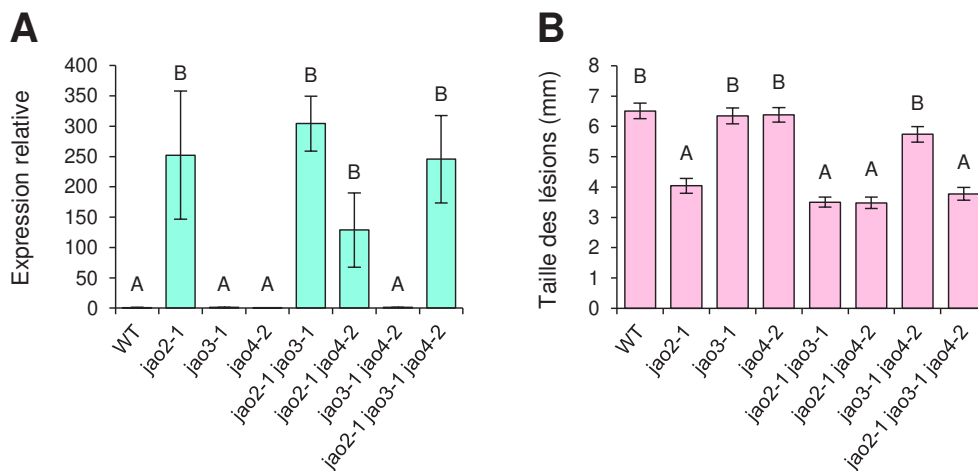


Figure 3.11. Réponses de défense et de résistance des mutants *jao*.

A, profil d'expression foliaire du gène marqueur de défense *PDF1.2* en absence d'infection. L'expression de *PDF1.2* a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques du gènes et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un triplicat biologique analysé en triplicat technique. L'histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm SEM

B, évaluation des symptômes de *Botrytis cinerea* par le diamètre des lésions trois jours après l'infection. L'histogramme représente la moyenne du diamètre d'une centaines de lésions \pm SEM de 10 à 15 plantes différentes pour chaque génotype.

Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

nous a également amené à ne pas réaliser le quadruple mutant *jao1 jao2 jao3 jao4*, permettant un gain de temps pour l'analyse génétique et fonctionnelle de JAO2. Cependant l'obtention et l'étude du quadruple mutant *jao* a été réalisée par une autre équipe (Caarls et al., 2017), qui a désigné ces enzymes **JOX** pour *jasmonate-induced oxygenases*. Cette étude a conduit à des résultats biologiques et conclusions similaires aux nôtres, à l'exception de quelques différences. D'une part, l'utilisation exclusive du quadruple mutant par Caarls *et al.*, (2017) n'a pas permis d'assigner la fonction régulatrice à JAO2/JOX2, dont le mécanisme moléculaire est peu décrit dans ce travail. D'autre part il est probable que le quadruple mutant présente des phénotypes, notamment la réduction de croissance, plus marqués que les allèles simples *jao2* (Caarls et al., 2017). Enfin le quadruple *jox* a également démontré une résistance accrue à des attaques de chenilles de *Mamestra brassicae* (Noctuelle du chou) ce qui démontre que l'oxydation médiée par les JAO réprime également la défense basale et la résistance aux herbivores (Caarls et al., 2017).

Nos analyses génétiques ont été réalisées avec deux allèles mutants de *JAO2* : *jao2-1* et *jao2-2* ce qui nous a permis de consolider les données phénotypiques. Concernant *JAO3* et *JAO4*, nous étions initialement limités aux allèles *jao3-1* et *jao4-2*, des mutants nuls dans l'écotype Columbia (**Col0**). Nous avons voulu tester deux autres allèles, les allèles secondaires *jao3-2* et *jao4-1*, pour déterminer si leur phénotype de résistance à *Botrytis* est similaire à ceux de *jao3-1* et *jao4-1*. Ces deux allèles, de l'écotype Wassilewskija (**WS**), et le test de résistance révèle que le mutant *jao3-2* a des lésions plus petites que le WT signifiant une meilleure résistance à *Botrytis*, et *jao4-1* montre quant à lui une résistance de type WT (Figure 3.10). Il est possible que dans l'écotype WS, *JAO3* ait une expression basale plus forte dans les feuilles que celle mesurée dans l'écotype Col0, et son absence pourrait affecter la signalisation JA-Ille. Il faudrait vérifier l'expression des JAO dans cet écotype ainsi que réitérer le test d'infection à *Botrytis* pour déterminer la robustesse du phénotype de résistance de *jao3-2*.

3.3. Recherche d'un effet additif des mutations *jao*

Nos données publiées démontrent qu'*in vitro* les trois enzymes JAO2, JAO3 et JAO4 oxydent efficacement le JA en 12OH-JA (Figure 3, article). Par ailleurs, l'introgression des trois JAO contrôlées par le promoteur fort et constitutif 35S démontre qu'*in vivo* les trois enzymes complémentent le mutant *jao2-2* pour la défense et la résistance antifongique, démontrant la redondance catalytique *in vivo* (Figure 5, article). Malgré cela seul les mutants *jao2* montrent un phénotype de défense et de résistance élevées contre *Botrytis* (Figure 4, article) ce qui est essentiellement expliqué par l'expression basale qui est la plus forte pour *JAO2* (Figure 2D, article). L'addition des mutations peut-elle alors renforcer le phénotype de résistance ? Nous avons comparé les trois mutants simples *jao*, les mutants doubles *jao2-1 jao3-1*, *jao2-1 jao4-*

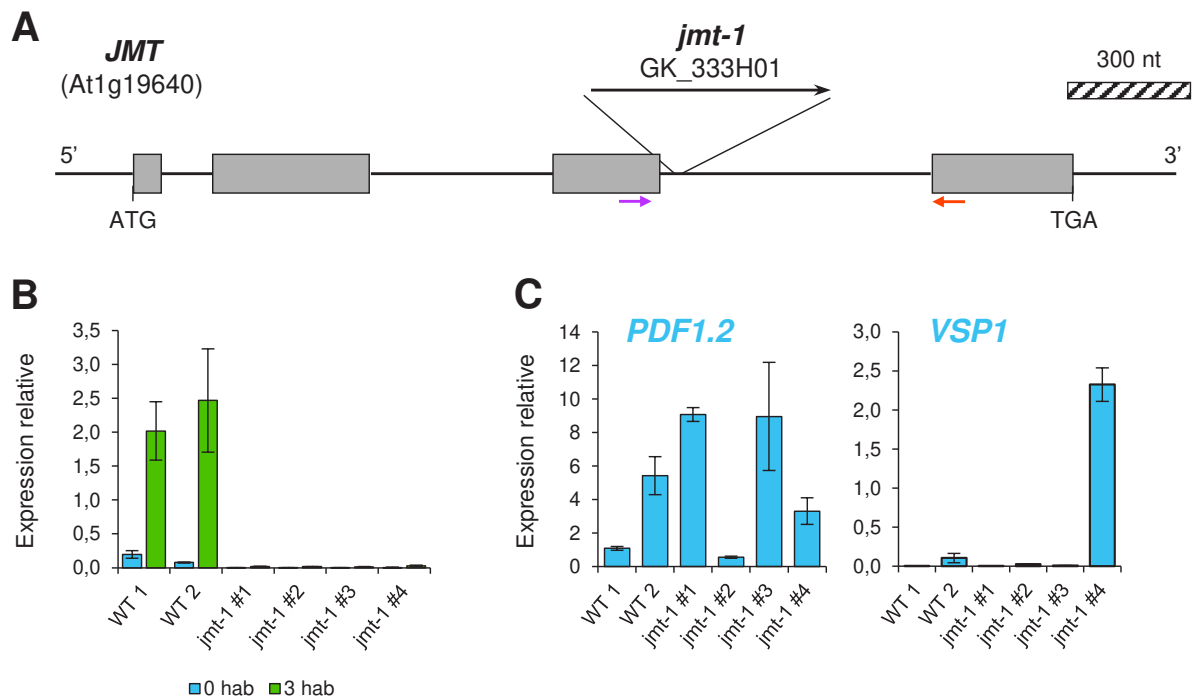


Figure 3.12. Caractérisation du mutant *jmt-1*.

A, représentation schématique de la position d'insertion du T-DNA dans la séquence du gène *JMT*, il se situe au début du troisième intron en position 1670. Les boîtes grises représentent les exons et les traits les introns. Amorces de génotypage WT : *left primer* gcagcatagtaaggagcgttg et *right primer* ttaaggtccatgtcgtgagg ; amorces de génotypages mutant : *right primer* et GABI8409LB atattgaccatcatactcattgc.

B, expression de *JMT* 0 et 3 heures après blessure (hab) chez deux WT et quatre plantes candidates génotypées *jmt-1*. Les amorces qPCR de mesure d'expression du *JMT* sont représentés par les flèches sur le schéma **A**. L'amorce *forward* par la flèche rose (aagagagtgtctatcaatggg) et l'amorce *reverse* par la flèche orange (cgatcttctctctcctcgatg). L'histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm l'écart type.

C, profil d'expression foliaire des gènes marqueurs de défense *PDF1.2* et *VSP1* sans stimulus. L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un répliqua biologique analysé en triplicat technique. L'histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm l'écart-type.

2 et *jao3-1 jao4-2* ainsi que le triple mutant *jao2-1 jao3-1 jao4-2* au niveau de l'expression foliaire du marqueur de défense *PDF1.2* (Figure 3.11A) et du phénotype de résistance à *Botrytis* (Figure 3.11B). Seuls les génotypes avec la mutation *jao2*, c'est-à-dire le mutant simple *jao2-1*, les mutants doubles *jao2-1 jao3-1* et *jao2-1 jao4-2* ainsi que le mutant triple *jao2-1 jao3-1 jao4-2*, présentent une surexpression de *PDF1.2* en absence de stimulus (Figure 3.11A) et des lésions nécrotiques plus petites que le sauvage traduisant une meilleure résistance au champignon (Figure 3.11B). Ces deux phénotypes n'étant pas exacerbés chez les mutants doubles *jao2* ni chez le triple mutant par rapport aux mutants simples, on peut conclure qu'il n'y a pas d'effet additif des mutations et donc pas de redondance des enzymes au niveau de la fonction biologique de défense foliaire. Ce résultat atteste une fois de plus que c'est l'enzyme JAO2 qui a le rôle majeur d'atténuation des défenses foliaires en absence de stimulus et que l'implication de JAO3 et de JAO4 est minime (Smirnova et al., 2017).

3.4. Existence d'autres puits métaboliques du JA ?

Le JA peut être considéré comme une molécule carrefour du fait qu'il peut être converti en un grand nombre de dérivés par diverses enzymes (Figure 1.9) (Wasternack et Strnad, 2016). JAO2 agissant comme un puit métabolique consommant le JA (Smirnova et al., 2017), nous nous sommes demandés si d'autres conversions enzymatiques de la pro-hormone peuvent également avoir un effet de détournement du JA au détriment de la formation de JA-Ile. Parmi les enzymes connues métabolisant le JA nous nous sommes intéressés à la JMT qui forme le MeJA (Figure 1.9) (Seo et al., 2001). Un mutant d'*Arabidopsis* surexprimeur de *JMT* a été caractérisé par une suraccumulation de MeJA sans altération de la quantité de JA et curieusement par une expression constitutive des défenses et une résistance accrue à *Botrytis* (Seo et al., 2001). Une étude récente de surexpression ectopique de la *JMT* chez *Oryza sativa* révèle en revanche que suite à l'agression biotique par la cicadelle *Nilaparvata lugens* les plantes sont plus sensibles dû à une accumulation moindre de JA et de JA-Ile (Qi et al., 2016). Un résultat similaire a été obtenu chez *Nicotiana attenuata* ayant une expression ectopique de la *JMT* d'*Arabidopsis*, la plante transformée présente une accumulation moindre de JA-Ile et une expression plus faible des marqueurs de défenses après application de sécrétions orales de *Manduca sexta* (Stitz et al., 2011). Il existe donc potentiellement un processus de détournement du JA par la *JMT* surexprimée à la suite d'un stimulus biotique chez le Riz ou chez *N. attenuata* (Stitz et al., 2011; Qi et al., 2016). C'est par ailleurs l'hypothèse qui est avancée par l'équipe de recherche sur *N. attenuata* car ils mesurent également chez le transformant une déficience en JA et une suraccumulation du MeJA après stimulus (Stitz et al., 2011). Nous avons décidé d'examiner le mutant déficient *jmt* d'*Arabidopsis*, qui a été peu étudié, pour déterminer si *JMT* peut avoir un rôle régulateur des défenses basales similaire à

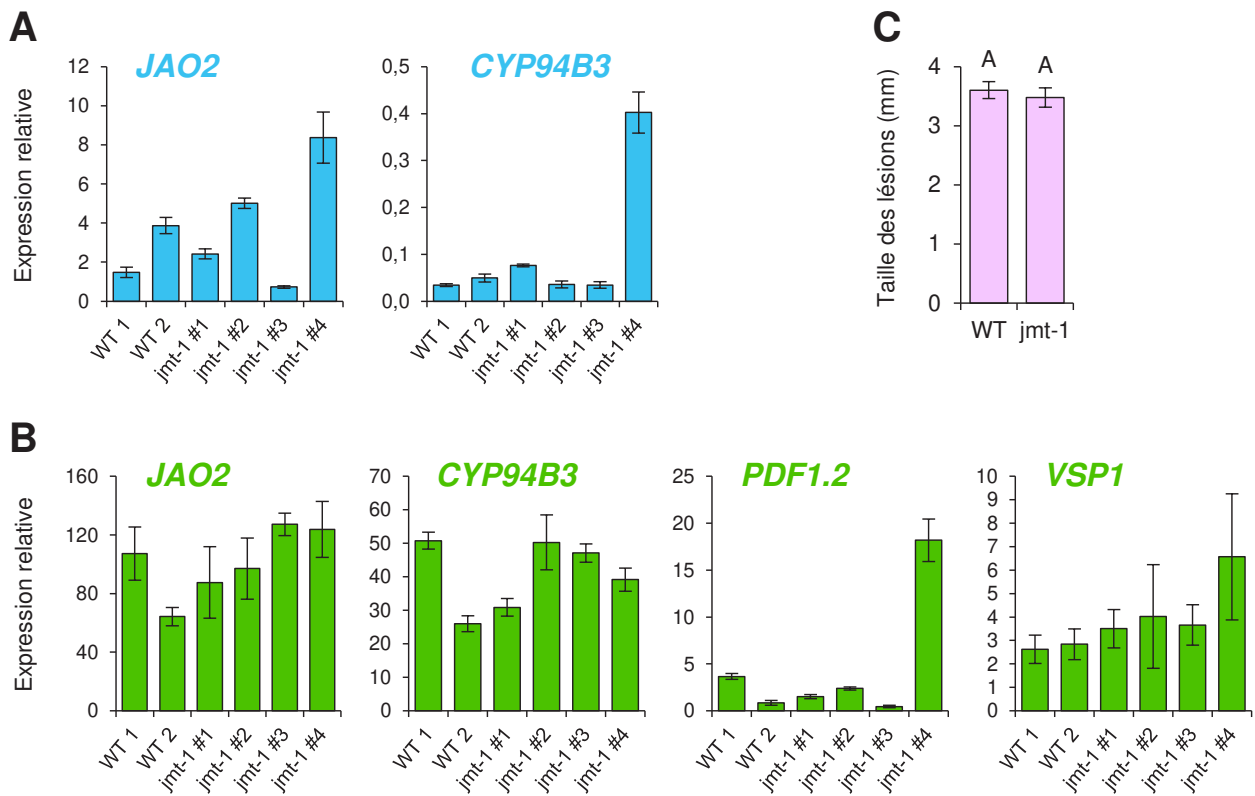


Figure 3.13. Expression de gènes de réponses et du métabolisme des jasmonates chez *jmt-1*.

A, profil d'expression foliaire des gènes du métabolisme des jasmonates *JAO2* et *CYP94B3* sans stimulus.

B, profil d'expression foliaire des gènes du métabolisme des jasmonates *JAO2* et *CYP94B3* et des gènes marqueurs de défenses *PDF1.2* et *VSP1* 3 heures après blessure.

L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un réplica biologique analysé en triplicat technique. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative \pm l'écart-type.

C, évaluation des symptômes par le diamètre des lésions trois jours après infection par *Botrytis cinerea*. L'histogramme représente la moyenne du diamètre d'une centaine de lésions \pm SEM de 10 à 15 plantes différentes pour chaque génotype. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

JAO2. A partir des quatre plantes génotypées homozygotes *jmt-1* de la lignée reçue du *Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)* nous avons déterminé par séquençage la position d'insertion du **T-DNA**. (Figure 3.12A). Les quatre plantes candidates *jmt-1* montrent bien une absence d'expression de *JMT* même après blessure, un stimulus qui induit l'expression du gène (Seo et al., 2001), confirmant le génotype *jmt-1* pour ces quatre plantes (Figure 3.12B). Il reste encore à vérifier l'absence d'accumulation de MeJA chez ces mutants. Nous avons testé l'expression des gènes marqueurs de défenses *PDF1.2* et *VSP1* en absence de stimulus : on observe une forte fluctuation de l'expression basale des deux gènes entre les quatre plantes *jmt-1* et il n'y a pas de différences systématiques entre les populations WT et *jmt1* (Figure 3.12C). Ce résultat d'expression indique que l'absence de *JMT* ne modifie pas la signalisation basale défensive, ce qui suggère que l'impact de *JMT* sur la consommation de JA serait différent de celui de JAO2. Nous avons aussi vérifié le profil d'expression de *CYP94B3* et de *JAO2* en absence de stimulus, l'expression de ces deux gènes n'est pas modifiée par la mutation *jmt-1* (Figure 3.13A) ce qui renforce la conclusion que *JMT* n'a pas le même impact sur la signalisation que JAO2 avec le détournement du JA basal et sur l'induction du catabolisme (Figure S7, article). De plus *PDF1.2*, *VSP1*, *CYP94B3* et *JAO2* sont induits par la signalisation JA-Ile et l'analyse de leur expression après blessure ne montre pas de différences entre les plantes WT et *jmt-1* (Figure 3.13B) ce qui signifie que la déficience de *JMT* n'impacte pas la signalisation JAs après stimulus. Enfin nous avons testé la résistance à *Botrytis* de *jmt-1*, le mutant a un diamètre de lésion similaire au WT (Figure 3.13C) signifiant que l'action de la *JMT* ne module pas la résistance aux nécrotrophes ce qui concorde avec le niveau d'expression de *PDF1.2* mesuré (Figure 3.13B). L'ensemble de ces données corrobore que, bien que *JMT* est un enzyme capable de consommer du JA et que son activité sans stimulus n'a pas encore été déterminée, l'inactivation du gène chez *jmt-1* ne phénotype pas *jao2*. JAO2 est donc le seul puits métabolique du JA connu à présenter une fonction régulatrice de la signalisation JA-Ile basale. Néanmoins cette conclusion pourra être réévaluée lorsque certaines des enzymes encore inconnues convertissant le JA seront finalement découvertes.

**CHAPITRE IV.
RÉSULTATS PARTIE 3**

**RÔLE DU MECANISME D'ATTÉNUATION
DES JAO CHEZ *ARABIDOPSIS***

IV. Résultats partie 3 : Rôle du mécanisme d'atténuation des JAO chez *Arabidopsis*

Les conclusions de l'article du chapitre précédent ont été élaborées dans le cadre de la défense antimicrobienne et sont établies sur la base de l'analyse de quelques marqueurs de réponses de défenses et de résistance, ce qui ne permet pas une caractérisation biologique exhaustive des JAO. Ces conclusions, basées sur un seul pathosystème, soulèvent de nouvelles questions, formulées ci-dessous, et qui ont servi de lignes directrices pour la poursuite de la caractérisation du mécanisme d'atténuation des JAO à l'échelle de la plante entière. Quel est le spectre de réponses transcriptionnelles et métaboliques réprimées par l'action de JAO2 ? Quelle est l'implication du mécanisme d'atténuation de JAO2 à l'échelle de l'organisme ? La fonction de JAO2 contrôle-t-elle la tolérance à d'autres types de stress, par exemple des stress abiotiques ? Les JAO3 et 4, qui catalysent *in vitro* la même réaction, peuvent-elles avoir un rôle d'atténuation des réponses JAs dépendantes dans d'autres organes ou dans d'autres situations physiologiques ? Quelle est la structure exacte du produit d'oxydation de JAO2 ? Le chapitre III sera consacré à aborder ces cinq grandes questions et à élaborer des éléments de réponses.

1. Quel est le spectre de réponses transcriptionnelles et métaboliques réprimées par l'action de JAO2 ?

L'hormone JA-Ile régulant une multitude de cibles, on peut présager que son activation permanente chez *jao2* affecte un large spectre de réponses, en plus des quelques marqueurs analysés dans l'article du chapitre II, spectre que j'ai cherché à préciser par des méthodes globales. Nous avons mené dans un premier temps une analyse du transcriptome par RNAseq, et dans un deuxième temps une analyse non ciblée (HR-LC-MS) du métabolome dans des extraits méthanoliques. Le but était d'utiliser des méthodes complémentaires afin de déterminer le plus largement possible quelles sont les réponses dérégulées chez le mutant *jao2*, autrement dit quelles sont les réponses affectées par le détournement métabolique opérées par JAO2.

1.1. Le transcriptome dérégulé par *jao2*

L'impact sur le transcriptome de la mutation *jao2* a été déterminé à partir des feuilles de la rosette dans deux comparaisons, réalisées sur des triplicats biologiques, entre les génotypes *jao2* et WT. La première comparaison est en absence de stimulus afin de déterminer quel est le set de gène dont l'expression est modifiée chez le mutant *jao2* par rapport aux plantes

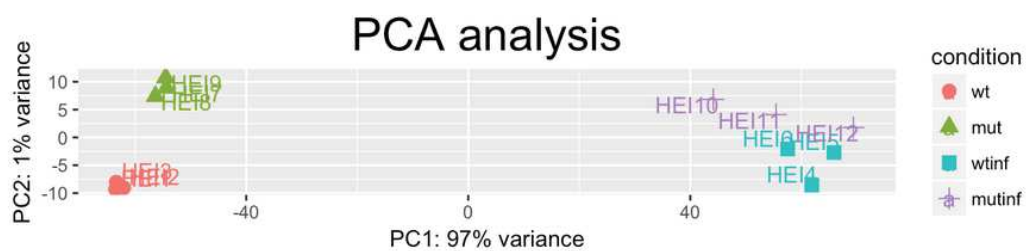


Figure 4.1. Analyse en composantes principales des banques d'expression générée par RNAseq.

Les banques d'expressions ont été générées à partir d'ARN extrait en triplicat biologique de feuilles de rosette d'*Arabidopsis* de plantes WT et *jao2* avant et après deux jours d'infection par le pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea*. L'analyse d'expression différentielle qui a permis de générer le graphique PCA est réalisé à l'aide de DESeq2. Les échantillons WT non infectés sont représentés en rouge, les échantillons *jao2* non infectés en vert, WT infecté en bleu et *jao2* infecté en violet. Le graphique PCA montre la distinction des banques d'expressions en fonction de deux composantes qui représentent 97 % et 1 % de la variance d'expression entre-elles en abscisse et en ordonnée respectivement.

PCA = *Principal component analysis*.

sauvages. La seconde comparaison est réalisée sur les mêmes génotypes, mais après l'infection par *Botrytis cinerea*. Dans l'article du chapitre II, on démontre qu'au niveau des défenses l'impact de *jao2* s'observe avant le stimulus, mais pas après (Smirnova et al., 2017) et *Botrytis* induit un grand nombre de réponses chez les plantes et toutes ne sont pas JAs dépendante (Windram et al., 2012). Est-ce que la mutation *jao2* a encore un impact transcriptionnel par rapports aux WT après infection ou est-ce que l'effet de la mutation est masqué par l'impact du stimulus ? C'est du fait que la majorité de nos résultats et conclusions sont basées sur des expériences menées avec *Botrytis* (Smirnova et al., 2017) que nous avons privilégié l'infection fongique comme stimulus pour réaliser l'analyse transcriptomique par RNAseq plutôt que la blessure. Nous avons également décidé de réaliser l'infection pendant 48 heures, au lieu des trois jours que nous réalisons classiquement, afin que la propagation du pathogène soit à un stade où la différence de taille des lésions entre le WT et le mutant *jao2*, soit minime pour de ne pas biaiser les résultats.

Pour s'assurer d'obtenir de l'ARN propre afin que l'expérimentation RNAseq soit techniquement robuste, j'ai utilisé un kit d'extraction (Macherey-Nagel) puis un kit de purification du même fournisseur. L'intégrité des ARN extraits a été vérifiée et confirmée au Bioanalyzer (Agilent) de la plateforme analyse de l'expression génique de l'IBMP par l'ingénieur d'étude Sandrine Koechler ([Annexe 1](#)). Un RIN situé autour de 6,5 a été obtenu, attestant de la qualité suffisante des échantillons. Les échantillons ont été envoyés au prestataire BGI (Hong Kong) qui a effectué la construction des banques et leur séquençage à partir de 30 millions de lectures par échantillons en *paired end* 2*100 paires de bases (**pb**). Les données issues de l'analyse ont été triées à la plateforme de bioinformatique de l'IBMP par les ingénieurs d'études Stéphanie Graindorge et Valérie Cognat, afin d'établir les listes de gènes différentiellement exprimés entre les deux génotypes, avec ou sans infection.

Tout d'abord, il a été réalisé par la plateforme bioinformatique l'analyse en composantes principales (**PCA**) des échantillons pour visualiser leur variabilité globale ([Figure 4.1](#)). Ce résultat révèle en premier lieu que les banques d'expression générées pour chacune des conditions biologiques par le RNAseq se regroupent entre-elles selon le génotype et la condition d'infection ([Figure 4.1](#)). Cela est particulièrement vrai en absence d'infection où chacun des réplicas WT et des réplicas *jao2* sont très rapprochés, les deux groupes sont nettement distincts. Les banques issus des échantillons infectés montrent une répartition plus diffuse sur le graphique PCA pour les triplicats, cependant une distinction entre les génotypes reste observable ([Figure 4.1](#)). Ce qui est intéressant avec ce graphique c'est qu'il révèle également que le facteur qui différencie le plus les banques d'expression, à raison de 97 % de la différence, est l'infection, les échantillons infectés sont à l'opposé des échantillons sains et de façon indépendante du génotype ([Figure 4.1](#)). Le deuxième niveau de distinction est causé

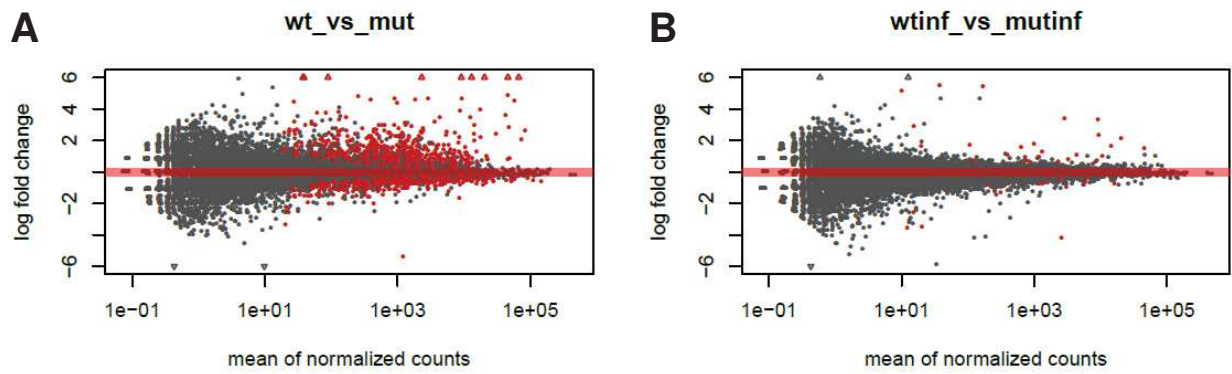


Figure 4.2. MA-plot avec et sans stimulus des banques d'expression générée par RNAseq.

A, comparaison des banques d'expressions entre les plantes WT et *jao2* (mut) en absence de stimulus.

B, comparaison des banques d'expressions entre les plantes WT (*wtinf*) et *jao2* (*mutinf*) après trois jours d'infection par le pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea*.

Les MA-plot sont générés à partir de la comparaison du niveau d'expression de l'ensemble des gènes du triplicat *jao2* par rapport au triplicat WT pour fournir un aperçu des gènes différentiellement exprimés. Les points rouges indiquent les gènes significativement sur- (log fold change positif) et sous-exprimés (log fold change négatif), avec une valeur *p* ajustée < 0,05, chez *jao2*.

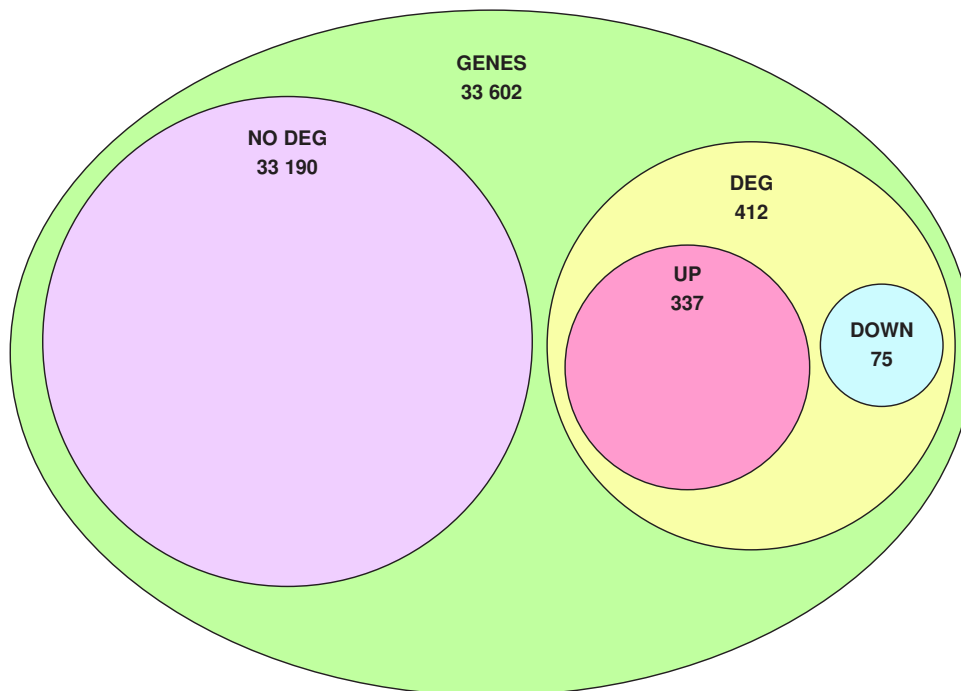


Figure 4.3. Diagramme de venn des DEG entre WT et *jao2*.

Parmi les 33 602 gènes d'*Arabidopsis*, d'après la dernière annotation du génome fournie par TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), 412 gènes sont statistiquement différentiellement exprimés chez *jao2* par rapport au WT, soit 1,23 % du génome. Parmi eux, 337 sont surexprimés et 75 sous-exprimés.

https://www.arabidopsis.org/portals/genAnnotation/gene_structural_annotation/annotation_data.jsp

DEG = *differentially expressed gene*.

par le génotype, mais ne représente que 1 % de la différence calculée entre les banques. Ensemble, ces données signifient que l'infection influence plus fortement le transcriptome foliaire d'*Arabidopsis* que la mutation *jao2*. Ce résultat est confirmé par les MA-plot qui donnent un aperçu visuel des gènes différentiellement exprimés dans les comparaisons effectuées (Figure 4.2). En ce qui concerne la comparaison entre WT et *jao2* après infection seuls quelques points apparaissent rouges sur le MA-plot (Figure 4.2B), représentant les quelques gènes qui sont sur- ou sous-exprimés chez *jao2* par rapport au WT. Ce résultat démontre que les transcriptomes WT et *jao2* sont quasi-identiques après infection. De plus, le fort impact de l'infection sur le transcriptome des plantes masque presque complètement l'impact que la mutation *jao2* peut avoir sur le transcriptome. On peut donc en conclure que l'impact de JAO2 sur la signalisation après stimulus est presque nul. A l'inverse, le MA-plot de la comparaison avant infection montre une multitude de points rouges (Figure 4.2A), signifiant que de nombreux gènes ont une expression dérégulée chez *jao2* par rapport au WT en absence de stimulus. Donc l'action de détournement métabolique par JAO2 pour atténuer la signalisation JA-Ile n'a d'impact qu'à l'état basal du transcriptome foliaire. Cette première conclusion étend à une échelle globale l'observation que nous avons publiées et qui concerne l'impact de la mutation *jao2* sur les défenses avant stimulus (Smirnova et al., 2017). Il se confirme que l'absence de JAO2 modifie l'expression de nombreux gènes foliaires en absence de stimulus, mais que cet impact devient indétectable après infection.

Pour chacune des deux comparaisons, nous avons sélectionné trois critères, détaillés en Annexe 2, pour identifier les gènes dérégulés ou **DEG**, *differentially expressed gene*, sur lesquels nous avons travaillé. Les listes ainsi obtenues nous renseignent sur les gènes qui sont minimum deux fois sur- ou sous-exprimés chez le mutant par rapport au WT. De la comparaison après infection ne ressortent que 21 DEG chez *jao2* par rapport au WT, dont 16 sur-exprimés et 5 sous-exprimés (Annexe 2A) ce qui affine le résultat pressenti avec le MA-plot (Figure 4.2B). On retrouve quelques gènes connus pour être régulés par les JAs comme la *Myrosinase-binding protein 1* (Capella et al., 2001) ou les facteurs MYB (Annexe 2A). Le fait que les transcriptomes des deux génotypes soient identiques, démontre que la plus forte résistance antifongique observée chez *jao2* est due aux gènes dérégulés avant l'infection et non pas à une plus forte induction après celle-ci. Nous nous sommes ensuite concentrés exclusivement sur l'analyse de la comparaison WT et *jao2* en absence de stimulus (Annexe 2B). Avant infection plusieurs centaines de gènes (412) (Figure 4.3) sont dérégulés chez *jao2*, la majorité présentant une expression plus forte chez le mutant : 337, représentant 80 % des gènes, pour seulement 75 sous-exprimés (Figure 4.3 et Annexe 2B), signifiant que JAO2 permet majoritairement d'atténuer la signalisation basale JA-Ile, mais qu'il a aussi un impact mineur sur l'accentuation de l'expression de quelques dizaines de gènes (Figure 4.3). A l'aide

A	GO description	P value
	response to jasmonic acid	< 0,0001
	response to wounding	< 0,0001
	ethylene-activated signaling pathway	< 0,0001
	response to chitin	< 0,0001
	response to salicylic acid	< 0,0001
	defense response to fungus	< 0,0001
	defense response	< 0,0001
	response to ethylene	0,0002
	vasculature development	0,0008
	negative regulation of nucleic acid-templated transcription	0,0009
	jasmonic acid mediated signaling pathway	0,0019
	response to salt stress	0,0023
	transcription, DNA-templated	0,0031
	positive regulation of transcription, DNA-templated	0,0037
	regulation of transcription, DNA-templated	0,0050
	regulation of jasmonic acid mediated signaling pathway	0,0056
	ethylene biosynthetic process	0,0072
	response to auxin	0,0093
	fruit ripening	0,0108
	response to brassinosteroid	0,0174

B	GO description	P value
	signal transduction	0,0008
	defense response	0,0344
	regulation of flower development	0,3355
	circadian rhythm	0,4014
	suberin biosynthetic process	0,4514
	red or far-red light signaling pathway	0,4591
	wax biosynthetic process	0,4706
	regulation of salicylic acid mediated signaling pathway	0,4850
	cellular response to salicylic acid stimulus	0,5286

Figure 4.4. GO analyse des DEG entre les génotypes WT et *jao2*.

A, termes GO issus des DEG foliaire sur-exprimés chez *jao2* par rapport au WT.

B, termes GO issus des DEG foliaire sous-exprimés chez *jao2* par rapport au WT.

DEG = *differentially expressed gene* ; GO = Gene Ontology.

du logiciel en ligne DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) nous avons effectué l'analyse de *gene ontology* (GO) sur la liste des DEG (Figure 4.4). Les termes GO issus de la liste des DEG sous-exprimés chez le mutant ont majoritairement une valeur $p > 0,05$ (Figure 4.4B), ce qui montre l'absence de robustesse de la classification de ces gènes. De plus, ces gènes sous-exprimés représentent une minorité des DEG de la comparaison des banques d'expressions WT avec *jao2* sans stimulus, nous avons donc décidé de nous focaliser sur les gènes sur-exprimés chez le mutant. L'analyse par GO montre sans surprise un enrichissement très marqué pour des gènes de réponse et de défense JAs-dépendants, particulièrement ceux impliqués dans la résistance aux pathogènes, mais aussi aux insectes (Figure 4.4A).

Nous avons cherché à caractériser plus en détail le profil transcriptionnel des gènes impliqués dans la biosynthèse, le catabolisme, la répression et la signalisation des JAs. Ces gènes caractérisés ont donc été extraits (Figure 4.5) à partir des DEG sur-exprimés (Annexe 2B). La mutation *jao2* a un impact léger sur l'expression des gènes de synthèse, de répression et de catabolisme. En effet seuls quelques-uns des gènes connus de chacune de ces trois catégories sont présents dans la liste de DEG et ils ne présentent pas une surexpression très forte par rapport au WT (Figure 4.5). Par exemple dans le cas de la répression cinq *JAZ* sur les treize sont listés comme DEG et aucun *JAM* ne l'est. Cela démontre que JAO2 n'a pas un rôle majeur dans l'atténuation de la signalisation basal des gènes impliqués dans les voies métaboliques des JAs et la répression de la signalisation. Au niveau des gènes de réponses, on observe un effet modéré sur l'expression de gènes impliqués dans la défense anti-herbivore et un impact fort sur ceux impliqués dans la défenses anti-nécrotrophes (Figure 4.5), ce qui corrèle avec le phénotype de forte résistance de *jao2* à *Botrytis* que nous avons publiés (Smirnova et al., 2017) et le phénotype de résistance du quadruple *jox/jao* aux larves de *Mamestra brassicae* (Caarls et al., 2017).

Pour avoir un aperçu de l'ensemble des éléments de contrôle qui sont la cible de JAO2, nous avons extraits des DEG (Annexe 2B) la liste des facteurs de transcription (FT) qui montrent une surexpression chez le mutant (Figure 4.6). Les 41 FT que nous avons extraits se regroupent en une dizaine de familles telles les bHLH, les NAC, les WRKY... Néanmoins les deux familles majoritaires sont celles des ERF et des MYB et représentent à elles-seules 50 % des FT sur-exprimés chez *jao2* (Figure 4.6). Le mutant *jao2* présente une signalisation JAs basale allumée et les ERF, qui sont induits par l'ET, le sont également par le JA-Ile (Lorenzo et al., 2004; Pré et al., 2008). De même, plusieurs facteurs MYB sont caractérisés pour être JAs inductibles et avoir un impact dans différents processus physiologiques tel que le développement floral (Pauwels et Goossens, 2011) ou la synthèse des anthocyanes (Shan et al., 2009) par exemple. De ce fait, il n'est pas surprenant de trouver que ces deux familles de FT sont celles qui sont le plus impactées par la mutation *jao2*. Lorsqu'on regarde en détail les réponses

Catégorie	Gene	log ₂ FoldChange	valeur p ajustée
Biosynthèse	LOX2	2,0504	3,82E-45
	AOS	1,0334	5,94E-09
	AOC1	2,5335	3,55E-24
	AOC2	2,1934	1,53E-38
Catabolisme	JAO3	1,6229	1,64E-03
	ILL6	2,0753	8,95E-13
Répression	JAZ1	1,0204	3,76E-04
	JAZ5	1,5251	6,03E-05
	JAZ6	1,8819	1,01E-19
	JAZ7	3,7981	1,40E-21
	JAZ9	1,6041	9,31E-23
Réponses anti-herbivores	VSP1	3,0098	9,07E-03
	CYP81F2	1,7287	1,03E-02
	IGMT1	2,9537	2,03E-05
Réponses anti-nécrotrophes	ORA59	7,5535	1,68E-07
	PDF1.2	6,7972	2,58E-101
	PDF1.3	6,7105	9,73E-68
	THI2.1	9,1781	3,73E-10
	ACT	2,189	1,54E-03
	PR3	1,141	7,84E-03
	PR4	4,5459	5,48E-89

Figure 4.5. Gènes de la biosynthèse, du catabolisme, de la répression et de la signalisation sur-exprimés chez *jao2*.

Plus le log₂ de fold change est élevé (en rouge) et plus le gène est sur-exprimé chez le mutant *jao2* par rapport au WT.

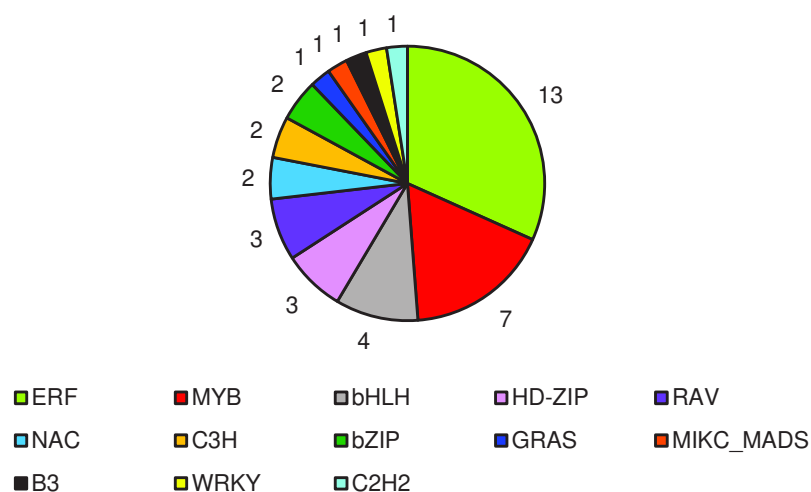


Figure 4.6. Répartition des facteurs de transcriptions extraits des DEG chez *jao2*.

DEG = *differentially expressed gene*.

physiologiques régulées par ces FT dérégulés chez le mutant ([Annexe 3](#)), comme on peut s'y attendre, une majorité d'entre eux concerne les réponses de défense et l'immunité de la plante contre les herbivores et majoritairement contre les pathogènes microbiens, principalement dans le cas des ERF. On découvre aussi que certains de ces FT dérégulés sont impliqués dans des voies de réponses aux stress abiotiques tel que le stress salin (avec MYB73), le stress thermique (dont RAV1) ou encore le stress lumineux via notamment la synthèse d'anthocyanes par le FT MYB75 aussi appelé *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1 (PAP1)* (Shan et al., 2009) ([Annexe 3](#)). Cependant parmi tous les FT en réponse à des stress abiotiques, la moitié d'entre eux est caractérisée pour être inductible et avoir un rôle dans la résistance au stress hydrique, par exemple les ERF DREB A2 et A5 ou encore le FT NAC RD26 ([Annexe 3](#)). Les rôles des JAs en réponse à ces différents stress abiotiques sont déjà bien documentés (Santino et al., 2013; Ruan et al., 2019). On peut supposer qu'à l'image de la résistance à *Botrytis*, *jao2* pourrait se révéler plus résistant à ces stress et particulièrement à la sécheresse du fait que certains des facteurs de réponse contrôlant la tolérance à la déshydratation sont surexprimés chez *jao2* ([Annexe 3](#)). Enfin, les derniers FT sont quant à eux impliqués dans des processus développementaux, par exemple certains ont un impact dans le développement de l'organe reproducteur (tels AGL9 et bZIP61), d'autres dans les réponses à la lumière (comme HFR1) ou encore le développement racinaire (MYB77 par exemple) ([Annexe 3](#)). Divers processus où là encore le rôle des JAs est bien documenté (Wasternack et Hause, 2013). Certains des FT peuvent être considérés comme des carrefours pour les interactions hormonales car ils sont aussi régulés par d'autres PhyH ou impliqués dans leur voie métabolique. On remarque des interactions notamment avec l'auxine (MYB73), les BR (HBI1), les GAs (RGL3) et l'ABA (DREB) ([Annexe 3](#)). En conclusion, au vu de l'ensemble des réponses transcriptionnelles induites par la mutation *jao2*, l'atténuation de la signalisation basale du JA-Ile par le détournement métabolique médié par JAO2 a pour rôle de réprimer, en plus des réponses défensives (Smirnova et al., 2017), les réponses d'adaptation à divers stress abiotiques et des processus développementaux JA-dépendants.

1.2. Le métabolome d'extrait méthanolique dérégulé par *jao2*

L'intérêt de l'analyse du métabolome dérégulé par la mutation *jao2* est d'avoir un aperçu des composés qui sont différentiellement accumulés chez le mutant par rapport au sauvage (WT). Pour déterminer l'accumulation des métabolites dans ces deux génotypes nous avons analysé des rosette entières (regroupement de cinq rosettes par génotype) pour lesquelles aucun stimulus n'a été appliqué. La mutation *jao2* montre un impact transcriptionnel au niveau basal qui est masqué par le stimulus infection (Smirnova et al., 2017). Il est probable que l'impact sur le métabolome soit également visible uniquement au niveau basal, surtout qu'un stimulus,

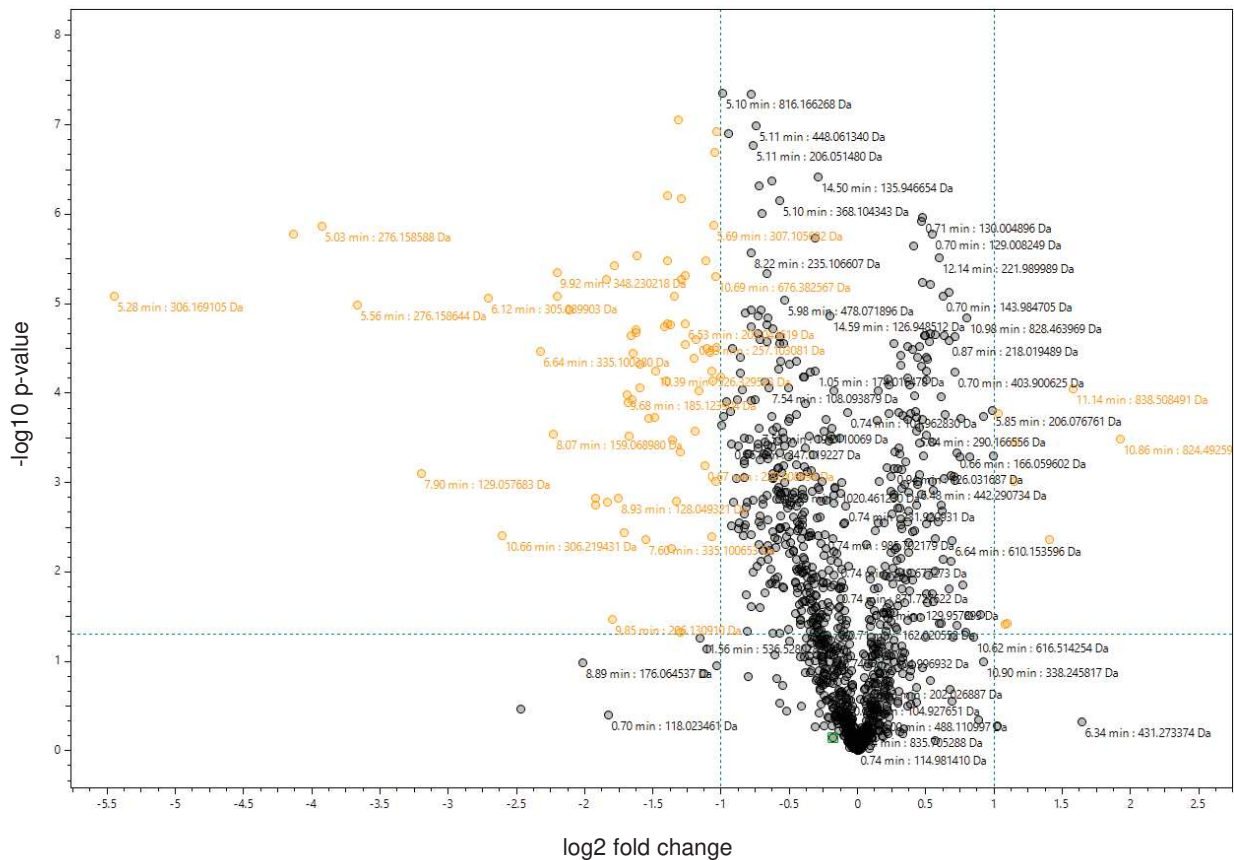


Figure 4.7. Volcano plot des métabolites putativement identifié chez WT et *jao2*.

Le *volcano plot* est issu de l'interrogation de la banque de donnée FOOD DB lors de la comparaison de l'accumulation des métabolites entre WT et *jao2* issus d'extraits méthanoliques. Le \log_2 de *fold change* en axe des abscisses représente l'accumulation des composés chez WT par rapport à *jao2*. Les métabolites avec un \log_2 de *fold change* > 1 sont deux fois plus abondants, ou plus, chez WT et donc sont deux fois moins abondants chez *jao2*. Les métabolites avec un \log_2 de *fold change* < -1 sont minimum deux fois moins abondants chez WT et donc sont minimum deux fois plus abondants chez *jao2*. Le $-\log_{10}$ de *p-value* en axe des ordonnées représente les molécules significativement différemment accumulées chez WT par rapport à *jao2*, soit tous les composés au dessus de la ligne pointillée horizontale. L'ensemble des métabolites qui sont significativement au moins deux fois plus ou moins abondants chez WT par rapport à *jao2* sont pointés en orange.

blesse ou infection, induit puissamment de multiples voies métaboliques qui peuvent masquer des accumulations différentielles plus faibles causées par *jao2*. L'analyse non-ciblée du métabolome a été réalisée à la plateforme *Plant Imaging Mass Spectrometry* de l'IBMP par les ingénieurs de recherche Dimitri Heintz et Claire Villette sur une UHP-LC couplée à un spectromètre de masse QTOF à haute résolution. Pour la robustesse de l'analyse les deux génotypes *jao2-1* et WT ont été extraits en octoplicat afin de définir le plus assurément possible si de faibles différences d'accumulations sont statistiquement significatives. Contrairement à l'analyse transcriptomique, nous ne pouvons pas déterminer l'ensemble du métabolome dérégulé par la mutation dû au protocole d'extraction utilisé. En effet, le spectre de composés extraits dépend fortement de leurs propriétés physico-chimiques, et de la nature et polarité du solvant utilisé (Verpoorte et al., 2008; Kim et Verpoorte, 2010). Nous avons choisi d'extraire le matériel avec le protocole des JAs de routine (Smirnova et al., 2017) et qui utilise le solvant méthanol, un solvant de polarité moyenne, compatible avec l'analyse de nombreux composés. De ce fait seul les métabolites très apolaires (lipides) ne seront pas accessibles par ce procédé et nécessiteraient une autre méthodologie, plus adaptée.

L'UHP-LC couplée au QTOF détecte les composés des extraits méthanoliques WT et *jao2*, détermine pour chacun son temps de rétention, sa masse et sa charge et produit un chromatogramme qui montre l'intensité de chaque molécule. L'intensité représente la quantité du composé, plus le pic est important sur le chromatogramme et plus la molécule est abondante dans l'extrait. Les pics d'intensités permettent de comparer l'accumulation de chaque molécule entre les deux génotypes pour définir celles qui ont une abondance différentielle chez le mutant. La masse et la charge mesurés permettent de formuler une formule brute théorique pour chaque molécule détectée ce qui sert à interroger différentes banques de données de métabolomiques, qui contiennent des données sur des composés spécifiques des végétaux tel que FOOD DB (<https://foodb.ca/>) et KNAPSACK (http://www.knapsackfamily.com/KNAPSAck_Family/). Ces banques permettent de fournir une identification putative des molécules détectées. Si plusieurs molécules des banques peuvent correspondre à la formule brute générée par L'UHP-LC couplée au QTOF, le temps de rétention ajoute un critère qui permet d'obtenir l'identification putative la plus probable. Cependant les banques de données LC-MS sont pauvres, en comparaison de la richesse du métabolome végétal, de ce fait nombres de molécules détectées par l'appareil n'ont pas pu se voir attribuer une identification putative. Ce paramètre réduit encore la part du métabolome dérégulé par *jao2*, en plus de la limitation liée au solvant d'extraction choisi, qui nous est accessible, cependant 528 molécules ont pu être identifiées putativement parmi toutes celles détectées (Figure 4.7). De ces 528 molécules, 279 sont significativement différentiellement accumulées chez *jao2* par rapport au WT, selon trois critères détaillés en Annexe 4. Nous

obtenons une liste de 60 métabolites sous-accumulés chez *jao2* par rapport à WT et 219 de suraccumulés (Annexe 4). On observe que 80% des métabolites putativement identifiés sont suraccumulés chez le mutant *jao2* (Annexe 4). Ce qui est intéressant c'est que les données de transcriptomique révélait que sur l'ensemble des DEG, environ 80 % était surexprimé chez *jao2* (Annexe 2B). Le transcriptome et le métabolome obtenus montrent une tendance similaire.

Parmi les 219 métabolites suraccumulés chez *jao2* on retrouve la glucobrassicine (de 3,96 fois) et l'un de ses dérivé, la 4-méthoxyglucobrassicine (de 3,18 fois), qui sont des glucosinolates indoliques dont la synthèse est JAs dépendante (Annexe 4 lignes 66 et 40 respectivement) (Ku et al., 2014; Thiruvengadam et al., 2016). Leur synthèse est dépendante de plusieurs gènes tels le FT *MYB51* pour la glucobrassicine et *CYP81F2* et *IGMT1* (indole glucosinolate O-méthyltransférase 1) pour son dérivé (Pfalz et al., 2011; Kim et al., 2013). Or dans les données de transcriptomique on observe que ces trois gènes sont surexprimés chez le mutant *jao2*, respectivement de 2,11 ; 3,31 et 7,75 fois (Annexe 2B, lignes 303, 135 et 33 respectivement). Ces données montrent qu'il y a une corrélation entre le transcriptome et le métabolome obtenues dérégulés chez *jao2*.

Au vu du phénotype de résistance élevée contre *Botrytis* de *jao2* (Smirnova et al., 2017), on peut s'attendre à retrouver certains composés avec une activité antifongique décrite, telle la phytoalexine camalexine dont la synthèse est partiellement JAs dépendante (Figure 1.20) (Kuc, 1995; Schuhegger et al., 2006). Or la camalexine ne compte pas parmi les métabolites différenciellement accumulés (Annexe 4), bien qu'elle soit identifiée dans les extraits. Par ailleurs, le gène *PAD3* qui catalyse la dernière étape de la formation de la camalexine et dont l'expression est en partie dépendante de la signalisation JA-Ile (Figure 1.20) (Zhou et al., 1999; Schuhegger et al., 2006), ne fait pas partie des gènes sur-exprimés chez *jao2* (Annexe 2B). Dans les données métaboliques obtenues, on retrouve d'autres molécules qui sont associées au métabolisme des JAs et qui ont des propriétés défensives comme les arabidopsides (Annexe 4) (Andersson et al., 2006; Kourtchenko et al., 2007). Les arabidopsides sont des conjugués d'OPDA et, ou, de dnOPDA avec des galactolipides plastidiaux (Mosblech et al., 2009). Plusieurs arabidopsides sont suraccumulés chez *jao2* ce qui corrèle avec les données de transcriptomique car leur formation est dépendante de *LOX2*, d'*AOS* et d'*AOC* qui sont tous trois surexprimés chez *jao2* de 4,14 ; 2,05 et 4,57 fois respectivement (Annexe 2B, lignes 96, 323 et 85 respectivement et Figure 4.5) (Genva et al., 2019). Ces exemples montrent une cohérence et complémentarité entre les analyses de transcriptomique et de métabolomique. Ils informent sur les bases moléculaires du phénotype de résistance de *jao2* à des stress biotiques et la connaissance du transcriptome en particulier permet de fournir une vision plus large des réponses réprimées par l'action de JAO2.

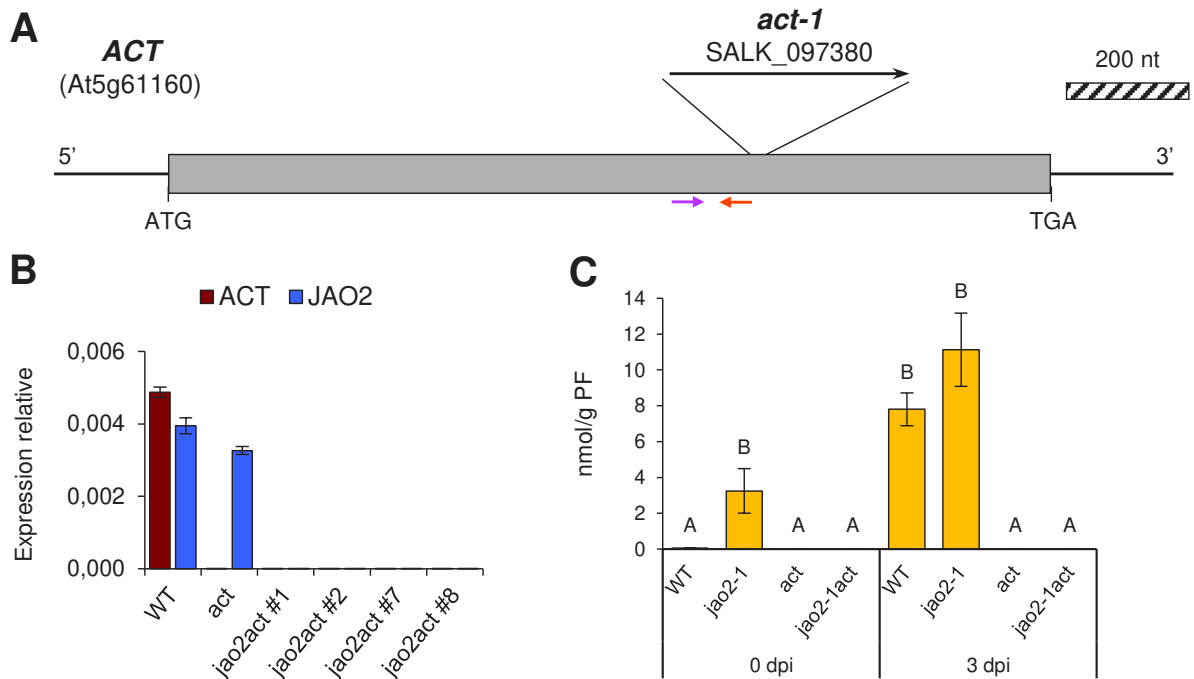


Figure 4.8. Caractérisation des mutants *act-1* et *jao2 act*.

A, représentation schématique de la position d'insertion du T-DNA dans la séquence du gène *ACT*, il se situe dans l'exon en position 1084. La boîte grise représente l'exon et les traits les séquences non codantes.

B, expression de *JAO2* et d'*ACT* en F2 après stimulus infection par *Botrytis cinerea* chez un WT, un mutant simple *act* et quatre candidats doubles mutants *jao2act*. L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par le gène de référence *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un répliqua biologique analysé en triplicat technique. L'histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm l'écart-type. Les amorces qPCR de mesure d'expression d'*ACT* sont représentés par les flèches sur le schéma **A**. L'amorce *forward* par la flèche rose et l'amorce *reverse* par la flèche orange.

C, le feruloyl-agmatine a été extrait et quantifié par UHPLC-MS/MS sans stimulus et deux jours après infection (dpi pour *day post infection*) et le niveau d'accumulation est exprimé en nmol g^{-1} de poids frais. L'histogramme représente la moyenne de l'accumulation d'un triplicat biologique \pm l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative à un même temps déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

La donnée la plus intéressante de l'analyse métabolique est représentée par les deux composés qui sont les plus suraccumulés chez *jao2* par rapport à WT, il s'agit de la feruloyl-agmatine (**F**Ag) et de la *p*-coumaroyl-agmatine (**p**-C**A**g) qui sont respectivement $1,45 \cdot 10^{13}$ et $3,84 \cdot 10^4$ fois suraccumulés ([Annexe 4](#)). Ces deux composés sont des amides d'acides hydroxycinnamiques appartenant à la classe des phénolamides, et connus pour leurs propriétés antifongiques (Li et al., 2018). La dernière étape de leur biosynthèse, la conjugaison de l'acide hydroxycinnamique à la polyamine agmatine, est catalysée par l'*Agmatine coumaroyl-transferase* (ACT), dont l'expression est strictement dépendante de la signalisation JA-Ile et du FT ORA59 ([Figure 1.21](#)) (Muroi et al., 2009; Li et al., 2018). Or *ORA59* est 187,8 fois et *ACT* est 4,56 fois surexprimés chez le mutant *jao2* ([Annexe 2B, lignes 2 et 87 respectivement](#)), ce qui est cohérent avec la suraccumulation des deux composés ([Annexe 4](#)). De plus, le gène *DETOXIFICATION18* (**DTX18**), qui code pour un transporteur impliqué dans l'export dans l'apoplasme des amides acides hydroxycinnamiques pour permettre leur fonction antifongique à la surface foliaire (Dobritsch et al., 2015), est également surexprimé 11,23 fois chez *jao2* ([Annexe 2B, ligne 25](#)). Les approches transcriptomique et métabolomique concordent parfaitement et démontrent que les deux phénolamides FAg et *p*-C**A**g ont une voie biosynthétique activée et sont suraccumulées chez *jao2*, mutant qui présente également une moindre multiplication du pathogène *Botrytis cinerea* (Smirnova et al., 2017). La préexistence abondante de ces deux composés antifongiques est-elle à l'origine du phénotype de résistance élevée de *jao2* ?

1.2.1. Rôles des phénolamides dans le phénotype de résistance de *jao2* ?

Pour répondre à cette question nous avons réalisé le double mutant *jao2 act*. *ACT* étant un gène essentiel à la synthèse de la FAg et de la *p*-C**A**g ([Figure 1.21](#)), le mutant *act* est caractérisé par l'absence de ces composés (Muroi et al., 2009). Ce que nous cherchons à déterminer est si le double mutant *jao2 act* qui ne produira plus les conjugués d'agmatine est altéré dans le phénotype de résistance à *Botrytis* par rapport au mutant simple *jao2*. Est-ce qu'il présente une sensibilité de type WT, ce qui traduirait que les phénolamides ont un impact majeur sur le phénotype de résistance *jao2*, ou est-il à un niveau intermédiaire de sensibilité entre *jao2* et WT, signifiant un rôle partiel des composés. Dans ce deuxième cas, d'autres métabolites antifongique sont probablement suraccumulés chez le mutant *jao2*.

La position de l'insertion T-DNA a été confirmée dans la lignée mutante *act-1* obtenue du NASC ([Figure 4.8A](#)), en amont du croisement avec le mutant *jao2-1*. Dans la génération F2, nous avons identifié des plantes qui n'expriment ni *ACT* ni *JAO2* après infection par *B. cinerea* ([Figure 4.8B](#)). La descendance homozygote F3 *jao2-1 act* a été analysée pour l'impact des phénolamides sur la résistance antifongique. En premier lieu, l'abondance de la FAg, composé

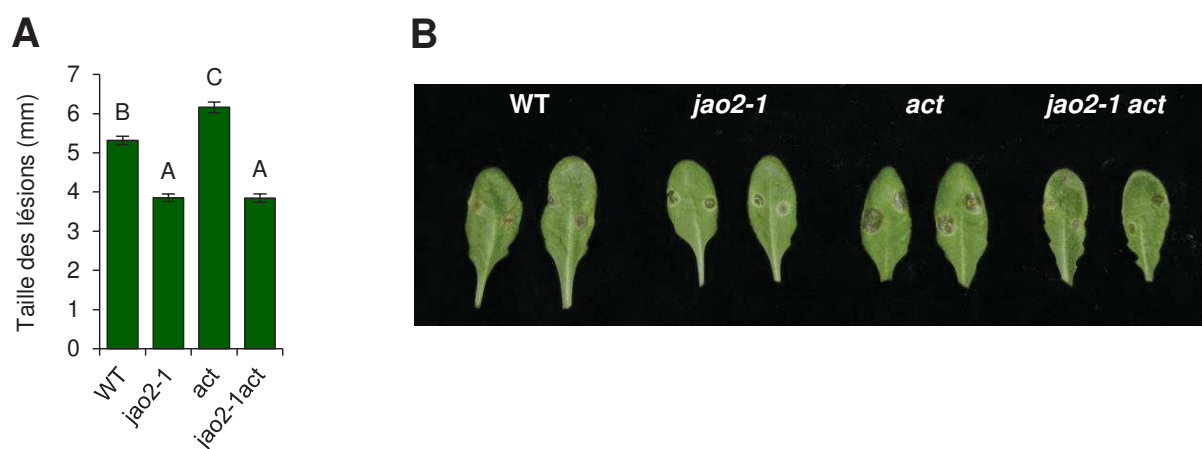


Figure 4.9. Phénotype de résistance à *Botrytis* du mutant *jao2 act*.

A, évaluation des symptômes en F3 par le diamètre des lésions trois jours après l'infection. L'histogramme représente la moyenne du diamètre d'une centaine de lésions \pm SEM d'une dizaine de plantes différentes pour chaque génotype. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,01$).

B, aspect des lésions trois jours après infection par *Botrytis cinerea* chez WT, *jao2-1*, *act* et *jao2-1act*.

pour lequel nous avons obtenu un standard (Professeur S. Rosahl, IPB, Halle, Allemagne), a été déterminée par LC-MS/MS, avant et après infection par *B. cinerea*. La *p*-CAG a pu être détecté mais non quantifiée, en raison d'un standard déficient. Comme montré en [Figure 4.8C](#), la FAg est indétectable chez *act* et *jao2-1 act*. Chez le WT, une très faible quantité est détectée à T0, et augmente considérablement après infection, en accord avec un résultat similaire décrit en réponse à l'infection par *Alternaria brassicicola* (Muroi et al., 2009). A partir d'une **MRM** (*multiple reaction monitoring*) publiée (Muroi et al., 2012), nous avons pu détecter que le signal du *p*-CAG est plus abondant par rapport à celui du FAg, présageant une abondance supérieure. Lors du test de résistance à *Botrytis cinerea*, mesurée après 56 h d'infection, on retrouve des résultats que nous avons déjà observés ou qui sont décrits dans la littérature. Premièrement le mutant *jao2* présente des diamètres de lésions plus petits que le WT, reflétant la résistance élevée au pathogène ([Figure 4.9A](#)) (Smirnova et al., 2017). Deuxièmement le mutant *act*, à l'inverse, montre des lésions plus grandes, il est donc plus sensible, du fait de l'absence des amides d'agmatine antifongiques ([Figure 4.9A et 4.9B](#)), là aussi comparable à la réponse à *Alternaria* (Muroi et al., 2009). Le double mutant *jao2 act* présente étonnamment des lésions de diamètre très similaire à celui du mutant *jao2* ([Figure 4.9A et 4.9B](#)), ce qui signifie que l'absence des composés antifongiques FAg et *p*-CAG n'affaiblit pas la résistance élevée de *jao2*. Ce résultat surprenant indique que les deux phénolamides sont dispensables à la résistance élevée du mutant *jao2* à l'infection. On peut supposer que chez le WT, l'activation par ORA59 de la synthèse (*ACT*) et de l'export (*DTX18*) de phénolamides est un déterminant important de la résistance antifongique induite, mais que chez *jao2*, de nombreuses autres voies de défense sont pré-activées ([Annexe 2B](#), [Figure 4.4](#) et [Figure 4.5](#)) et agissent de façon synergique. En effet, les données de métabolomique révèlent que d'autres molécules suraccumulées chez *jao2*, telle la quinoline, l'ascorbigen, l'arabidopsides B, l'arvelexine... ont toutes des propriétés antifongiques (Kourtchenko et al., 2007; Pedras et Adio, 2008; Wagner et Rimbach, 2009; Shin et al., 2011; Marella et al., 2013). L'ensemble des réponses activées résulte en une résistance très élevée et génère un état antimicrobien « saturant », de sorte que l'absence d'une des réponses n'est pas déterminante sur le phénotype de *jao2*.

2. Quelle est l'implication du mécanisme d'atténuation de JAO2 à l'échelle de l'organisme ?

Cette question a été initiée avant mon arrivée au laboratoire par E. Smirnova et T. Heitz suite à l'obtention des premiers résultats sur l'étude et la caractérisation de JAO2 (Smirnova et al., 2017). La signalisation JAs est impliquée dans plusieurs processus physiologiques et dans plusieurs organes (Wasternack et Hause, 2013), on peut supposer que JAO2 pourrait aussi

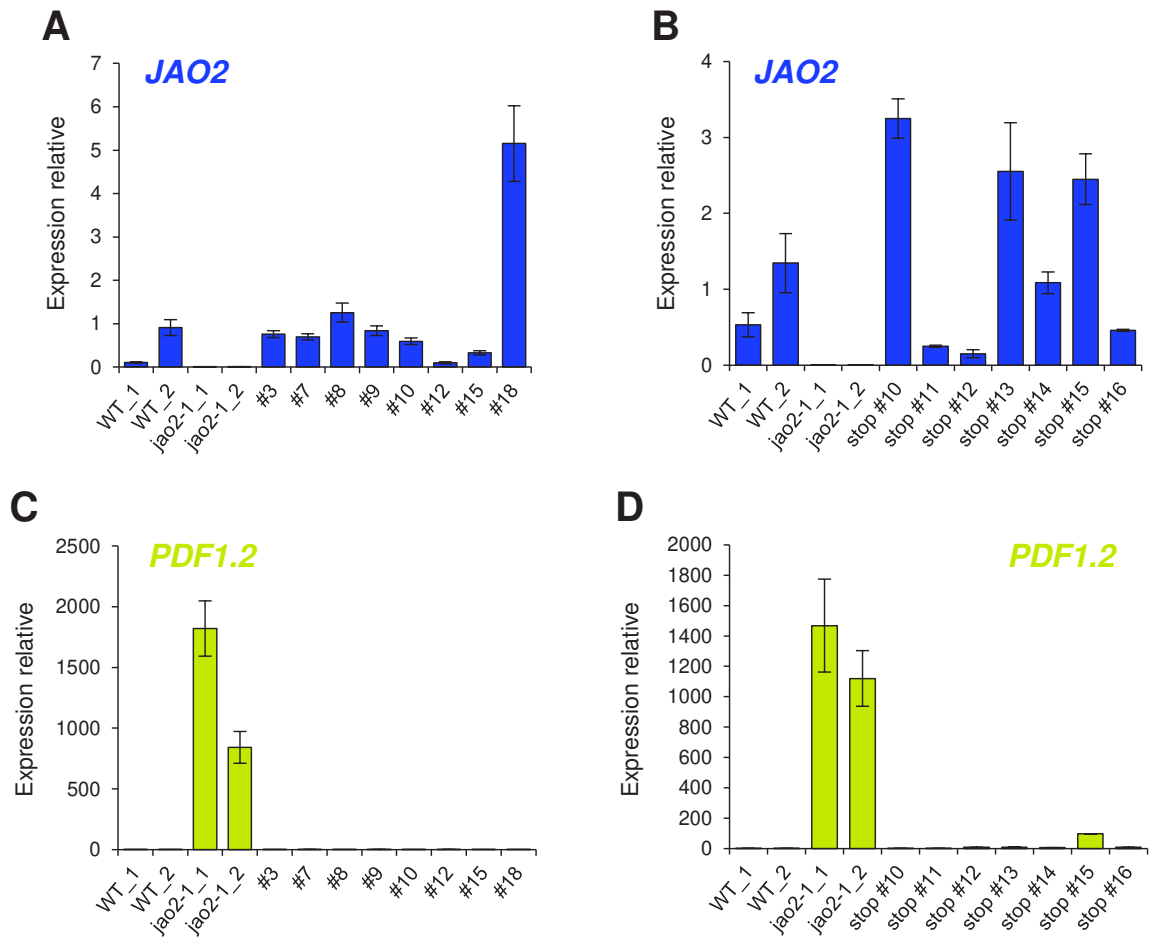


Figure 4.10. Complémentation des transformants primaires *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS* et *jao2-1 pJAO2:JAO2stop-GUS*.

Expression de *JAO2* (A et B) et de *PDF1.2* (C et D) chez les transformants primaires *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS* (A et C) et *jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS* (B et D). L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un répliqua biologique analysé en triplicat technique. L'histogramme représente la moyenne de l'expression relative \pm l'écart-type.

atténuer la signalisation basale d'autres réponses que la défense foliaire. Par ailleurs les données d'expression publiques sur eFP Browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> ; At5g05600) montrent que JAO2 s'exprime également dans les pièces florales, plusieurs tissus racinaires et dans les graines. L'enzyme pourrait avoir un rôle dans ces différents organes. Pour commencer à le définir, E. Smirnova a développé un outil de visualisation de l'expression et de la localisation de JAO2. Elle a réalisé le clonage d'une construction rapportrice GUS (β -glucuronidase), constituée du promoteur natif du gène *JAO2* (At5g05600, 3,1 kb), placé en amont d'une fusion traductionnelle entre l'ADNg *JAO2* et *GUS*. Une construction contrôle contenant un codon stop entre les séquences *JAO2* et *GUS* a été réalisée, afin de pouvoir tester l'impact éventuel de GUS sur la fonction de JAO2. Les deux constructions introduites dans le vecteur pGWB633 seront appelées ***pJAO2:JAO2-GUS*** et ***pJAO2:JAO2-stopGUS*** respectivement dans le présent document. Je suis arrivé au laboratoire au moment de la réalisation des transformations des plantes *jao2-1* avec ces deux constructions, pour réintroduire une copie fonctionnelle de l'enzyme JAO2 dans le but de réverter le phénotype *jao2*.

2.1. Localisation de JAO2 par marquage histologique GUS

Une vingtaine de transformants primaires résistants au Basta a été analysée pour chaque construction, je ne présenterai ici qu'un patron représentatif de huit plantes (Figure 4.10). L'expression de *JAO2* a d'abord été examinée par qRT-PCR. Les transformants *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS* (Figure 4.10A) et *jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS* (Figure 4.10B) montrent une expression de *JAO2* qui concorde avec celle mesurée dans les deux WT contrôles, comparé aux plantes mutées *jao2-1* qui n'expriment pas le gène. Le promoteur pJAO2 est donc fonctionnel dans ces lignées. En raison de la relation antagoniste établie entre l'expression de *JAO2* et des gènes de défenses (Smirnova et al., 2017), j'ai ensuite mesuré l'expression du marqueur de défense *PDF1.2*. Comme attendu, les plantes WT n'expriment pas ce gène en absence de stimulus, alors que son expression est forte chez les mutants *jao2-1* (Figure 4.10C et 4.10D). Cette relation est bien vérifiée puisque les lignées exprimant JAO2, fusionné à GUS ou non, sous son promoteur natif, présentent une réversion de l'expression de *PDF1.2* à des niveaux très faibles, similaires au WT. Ceci démontre d'une part la complémentation fonctionnelle du mutant *jao2-1*, et d'autre part que la fusion GUS n'altère pas la fonction de JAO2. Les lignées *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS* (Figure 4.10C) et *jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS* (Figure 4.10D) qui ont une expression de *PDF1.2* quasi-nulle comme le WT, ont été sélectionnées et établies à l'état homozygote. Cet outil peut donc être utilisé pour étudier la distribution de JAO2-GUS dans la plante.

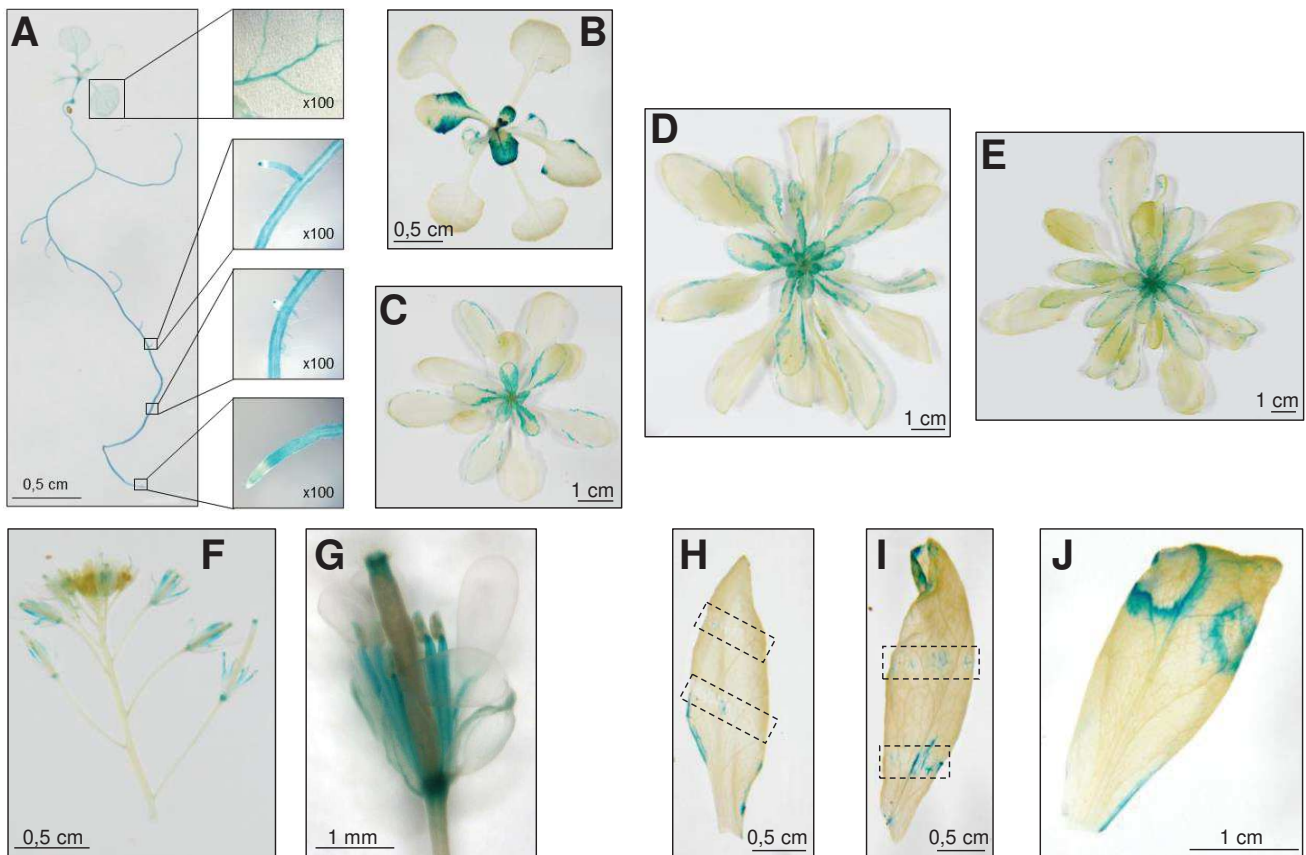


Figure 4.11. Colorations histologiques GUS de la lignée *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3*.

A, plantule de 10 jours, génération T2, incubée 4 h 30 dans le substrat de coloration, observée à la loupe binoculaire x20 dans son ensemble et au microscope optique x100 pour les zooms sur les différentes parties de la plantule.

B, jeune rosette de 20 jours, génération T2, incubée 20 h dans le substrat de coloration, observée à la loupe binoculaire.

C, jeune rosette de 28 jours, génération T3, incubée 4 h dans le substrat de coloration, observée à l'œil nu.

D, rosette de 35 jours, génération T3, incubée 6 h 30 dans le substrat de coloration, observée à l'œil nu.

E, rosette de 43 jours, génération T3, incubée 7 h dans le substrat de coloration, observée à l'œil nu.

F, inflorescence, génération T2, incubée 5 h 30 dans le substrat de coloration, observée à la loupe binoculaire x20.

G, fleur, génération T2, incubée de 5 h 30 dans le substrat de coloration, observée à la loupe binoculaire x20.

H, feuille de rosette de 5 semaines 1 h après blessure, génération T2, incubée 17 h 30 dans le substrat de coloration, observée l'œil nu. Les blessures sont encadrées en pointillés.

I, feuille de rosette de 5 semaines 4 h après blessure, génération T2, incubée 17 h 30 dans le substrat de coloration, observée l'œil nu. Les blessures sont encadrées en pointillés.

J, feuille de rosette de 5 semaines 3 jours après infection par *Botrytis cinerea*, génération T2, incubée 4 h 30 dans le substrat de coloration, observée l'œil nu.

Les colorations histologiques GUS ont été réalisées sur les générations T2 et T3 à plusieurs stades de développement en absence de stimulus ainsi que sur des feuilles trois jours après infection avec *Botrytis cinerea* et à la suite de blessures. Les résultats ont été obtenus chez six lignées indépendantes en T2 et trois d'entre elles sont analysées en T3. Le patron GUS aux différents stades testés est le même dans les différentes lignées indépendantes, pour les deux générations. Les résultats sont représentés par une seule lignée, *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3* (Figure 4.11). Deux lignées indépendantes *jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS* servent de contrôles négatifs et ne montrent aucune coloration bleue (Figure 4.12A à 4.12J), signifiant qu'il n'y a pas de réponse GUS aspécifique.

L'analyse effectués au stade le plus jeune, des plantules de 10 jours, démontre après un temps d'incubation court dans le substrat un marquage GUS fort dans les racines par rapport aux feuilles qui sont marquées plus faiblement, au niveau des veines (Figure 4.11A). Au stade plantule, le site majeur d'expression de *JAO2* est donc la racine. Les plantules sont ensuite observées au microscope optique pour avoir un aperçu plus précis de la localisation de l'enzyme dans la racine (Figure 4.11A). L'observation de ces zooms montre que *JAO2* à un expression homogène dans les tissus de la racine principale et des racines secondaires mais absente des tissus vasculaires du cylindre central. Ce dernier point ne corrèle pas avec les données d'expression publiques sur eFP Browser. *JAO2* n'est pas présente non plus dans la zone méristématique à l'exception d'un marquage fort au niveau du méristème apicale racinaire (**MAR**) des racines latérales (Figure 4.11A). Au cours de la même expérience, j'ai analysé de jeunes rosettes entières de 20 jours, pour lesquelles le marquage histologique GUS n'est observé que dans les feuilles les plus jeunes, en cours de développement, mais nécessitant un temps d'incubation dans le substrat près de cinq fois plus long par rapport aux racines de plantules (Figure 4.11B). La distribution du marquage GUS dans la rosette est retrouvée en génération T3, de la même lignée #3, à différents âges de développement de la rosette : 28 jours (Figure 4.11C), 35 jours (Figure 4.11D) et 43 jours (Figure 4.11E) ce qui démontre que tout au long de la vie de la plante, *JAO2* s'accumule dans les feuilles jeunes plutôt que dans les feuilles matures. J'ai ensuite examiné le marquage *JAO2-GUS* au sein des inflorescences (Figure 4.11F) et des fleurs (Figure 4.11E). Il est observé une coloration au niveau des étamines et plus précisément au niveau du filet (Figure 4.11E).

Enfin les dernières analyses ont été faites sur des feuilles stimulées par blessure (1 h et 4 h), et par infection avec *Botrytis cinerea*. La blessure induit peu voire pas du tout l'accumulation de la protéine de fusion *JAO2-GUS*, peu de bleu étant observé après un temps d'incubation long (Figure 4.11H et 4.11I). 4 h après blessure on observe un marquage très faible au niveau des zones blessées (Figure 4.11I) alors qu'après 1 h aucune coloration n'est visible (Figure 4.11H), à l'exception de la marge mais il est plus probable que ce soit une coloration

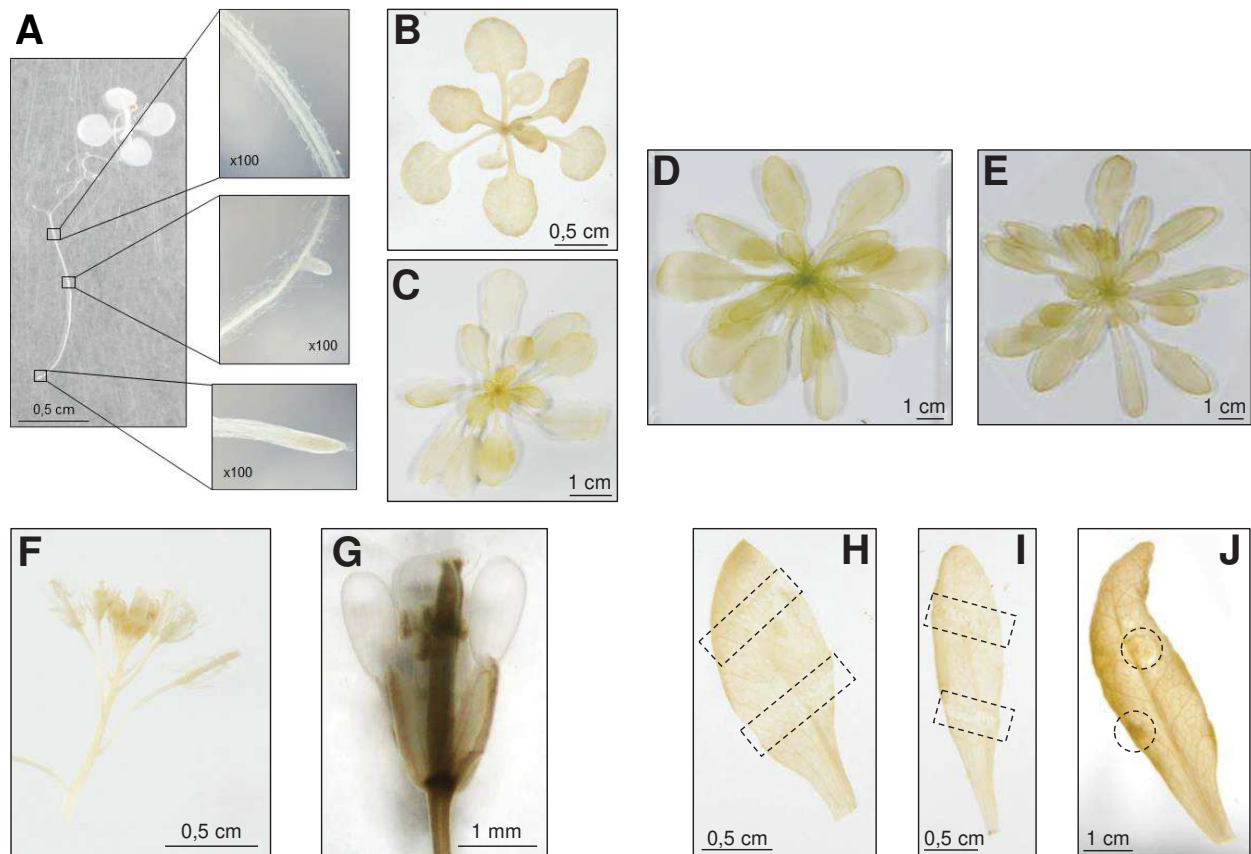


Figure 4.12. Colorations histologiques GUS de la lignée *jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS* #16.

A, plantule de 10 jours, génération T2, incubée 4 h 30 dans le substrat de coloration, observée à la loupe binoculaire x20 dans son ensemble et au microscope optique x100 pour les zooms sur les différentes parties de la plantule.

B, jeune rosette de 20 jours, génération T2, incubée 20 h dans le substrat de coloration, observée à la loupe binoculaire.

C, jeune rosette de 28 jours, génération T3, incubée 4 h dans le substrat de coloration, observée à l'œil nu.

D, rosette de 35 jours, génération T3, incubée 6 h 30 dans le substrat de coloration, observée à l'œil nu.

E, rosette de 43 jours, génération T3, incubée 7 h dans le substrat de coloration, observée à l'œil nu.

F, inflorescence, génération T2, incubée 5 h 30 dans le substrat de coloration, observée à la loupe binoculaire x20.

G, fleur, génération T2, incubée de 5 h 30 dans le substrat de coloration, observée à la loupe binoculaire x20.

H, feuille de rosette de 5 semaines 1 h après blessure, génération T2, incubée 17 h 30 dans le substrat de coloration, observée l'œil nu. Les blessures sont encadrées en pointillés.

I, feuille de rosette de 5 semaines 4 h après blessure, génération T2, incubée 17 h 30 dans le substrat de coloration, observée l'œil nu. Les blessures sont encadrées en pointillés.

J, feuille de rosette de 5 semaines 3 jours après infection par *Botrytis cinerea*, génération T2, incubée 4 h 30 dans le substrat de coloration, observée l'œil nu. Les lésions sont entourées en pointillés.



Figure 4.13. Distinction entre feuilles jeunes et feuilles matures.

Les feuilles jeunes, en cours de développement, sont dans l'encadré rouge ; les feuilles matures dans l'encadré jaune.

aspécifique due à la manipulation des feuilles sectionnées. Ces résultats sont assez surprenants du fait qu'on a montré que *JAO2* est induit par la blessure et que son expression est plus forte dans les temps les plus précoces après la blessure par rapport aux temps les plus tardifs (Figure 3.7). Après infection en revanche on observe un marquage fort autour de la lésion nécrotique en seulement quelques heures d'incubation (Figure 4.11J). Ce résultat corrèle avec nos données d'expression qui montrent que *JAO2* est induit par l'infection (Figure 3.8D), on peut supposer que *JAO2* est induit par l'infection pour atténuer la signalisation JA-Ille à l'image des CYP94 et des AH.

En conclusion, les colorations histologiques révèlent qu'en absence de stimulus *JAO2* s'exprime dans plusieurs organes et tissus : les racines (seul un stade plantule a été analysé), les feuilles jeunes et les étamines. Pour chacun de ces organes, tissus, il est connu et caractérisé que les JAs ont un rôle sur leur développement (Wasternack et Hause, 2013; Huang et al., 2017). On peut supposer que le mécanisme d'atténuation de *JAO2* n'est pas spécifique des réponses basales foliaires de défenses (Caarls et al., 2017; Smirnova et al., 2017) mais qu'il impact la signalisation JAs à l'échelle de la plante entière. Par exemple, dans les étamines (Figure 4.11G), l'action de *JAO2* pourrait réprimer l'allongement du filet des étamines pour optimiser le moment de la pollinisation en fonction de la maturation des organes reproducteurs. Au niveau de la racine principale (Figure 4.11A), l'enzyme favoriserait l'allongement racinaire et réprimerait le développement des racines latérales au niveau des MAR. En effet, les JAs répriment la croissance racinaire et favorisent l'initiation et le développement des racines latérales de façon ET et auxine dépendante (Wasternack et Hause, 2013; Cai et al., 2014; Huang et al., 2017). L'impact biologique de *JAO2* dans ces organes reste à démontrer. Une conclusion surprenante c'est qu'au niveau des feuilles de la rosette, *JAO2* ne s'accumule pas dans les feuilles matures mais que dans les feuilles jeunes, en cours de développement (Figure 4.11B, 4.11C, 4.11D et 4.11E). On observe par ailleurs que les feuilles jeunes perdent leur coloration progressivement lorsqu'elles grandissent. *JAO2* montre une accumulation foliaire âge dépendant.

Le résultat majeur issu des colorations histologiques GUS montre que le site d'expression majeure de *JAO2* est dans les racines (Figure 4.11A) et que dans les feuilles, jeunes (Figure 4.13), son expression est plus modérée (Figure 4.11B). On s'est demandé lequel de ces deux sites d'expression de *JAO2* est nécessaire pour atténuer la signalisation JAs dans les feuilles, en particulier dans les feuilles matures (Figure 4.13) où on a démontré l'action de *JAO2* sur la défense et la résistance (Smirnova et al., 2017). Pour répondre à cette interrogation nous avons dissocié ces deux sites d'expressions de *JAO2* par une expérience de greffe.

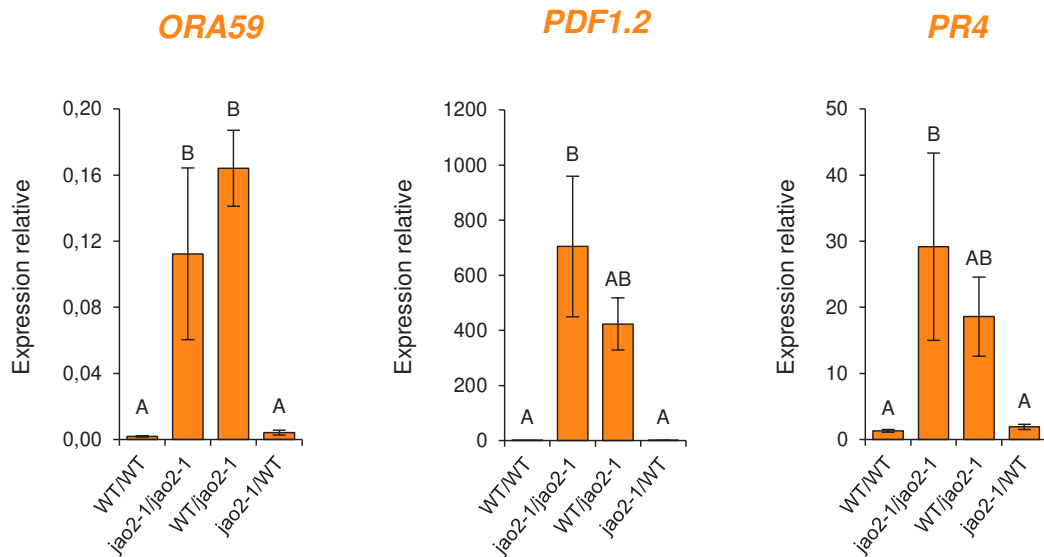


Figure 4.14. Expression de gènes marqueurs de défenses lors de la dissociation des sites d'expressions foliaires et racinaires de *JA02*.

Quatre greffes sont réalisées au niveau de l'hypocotyle de type racines/partie foliaire : WT/WT, *jao2-1/jao2-1*, WT/*jao2-1* et *jao2-1*/WT. L'expression foliaire des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un quintuplicat biologique analysé en triplicat technique. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative \pm l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

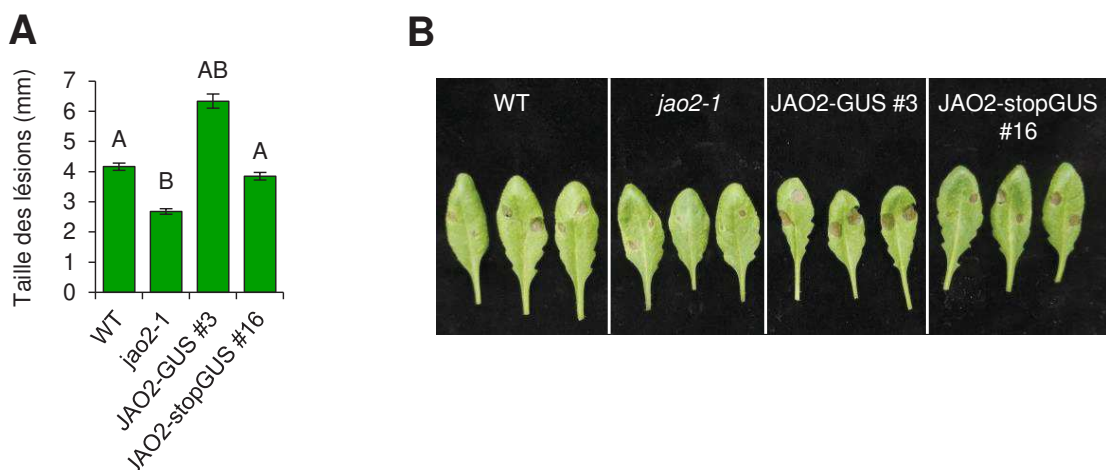


Figure 4.15. Phénotype de résistance à *Botrytis* des lignées *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3* et *jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS #16*.

A, évaluation des symptômes des feuilles matures par le diamètre des lésions trois jours après l'infection. L'histogramme représente la moyenne du diamètre d'une centaines de lésions \pm SEM de 6-8 plantes différentes pour chaque génotype. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,01$).

B, aspect des lésions trois jours après infection par *Botrytis cinerea* chez WT, *jao2-1*, *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3* et *jao2-1 pJAO2:JAO2-stopGUS #16*.

2.2. Dissociation des sites d'expressions racinaire et foliaire de *JAO2*

Pour définir où l'absence de *JAO2* augmente les défenses foliaire chez *jao2*, quatre combinaisons de greffes ont été réalisées avec les génotypes WT et *jao2-1* au niveau de l'hypocotyle, entre les racines et la partie foliaire, annotées de la façon suivante : porte-greffe/greffon. WT/WT sert de contrôle de l'impact de la manipulation sur le niveau des défenses et *jao2-1/jao2-1* renseigne sur les niveaux d'expressions chez le mutant. Les deux combinaisons WT/*jao2-1* et *jao2-1*/WT indiqueront dans quel organe l'absence de *JAO2* allume l'expression des défenses. Après récupération, les plantes greffées sont repotées et cultivées en terre pendant 19 jours, à l'issue desquelles l'expression basale de trois gènes marqueurs de défense, *ORA59*, *PDF1.2* et *PR4* est testée dans les feuilles de la rosette entière. Ceux-ci montrent les mêmes tendances d'expression pour une même greffe (Figure 4.14). L'expression des trois gènes est très faible chez la combinaison contrôle WT/WT et forte pour la greffe *jao2-1/jao2-1* (Figure 4.14), l'expérience est donc fonctionnelle puisque la procédure de greffe n'altère pas les phénotypes d'expression des défenses attendus chez WT et *jao2*. Concernant les deux hétérogreffes, lorsque la mutation est présente dans la partie racinaire, chez *jao2-1*/WT, le niveau d'expression foliaire des gènes est similaire à celui de WT/WT (Figure 4.14). En revanche la combinaison WT/*jao2-1* montre une expression foliaire élevée des trois marqueurs, de niveau comparable à celle chez *jao2-1/jao2-1* (Figure 4.14). Ce résultat démontre que c'est l'absence d'expression de *JAO2* dans les parties foliaires qui est responsable du phénotype de défense constitutive de *jao2* (Smirnova et al., 2017) et donc que l'expression foliaire de *JAO2* est nécessaire pour atténuer la signalisation JAs dans les feuilles.

Lorsqu'on associe cette conclusion aux résultats des colorations histologiques GUS, on peut l'affiner en précisant que l'expression de *JAO2* dans les feuilles WT jeunes est nécessaire pour atténuer la signalisation JAs foliaire (Figure 4.11B à 4.11E et 4.14). Cependant, pour toutes les analyses effectuées, dont celles publiées (Smirnova et al., 2017), que ce soit sans stimulus, après blessure ou infection, nous avons utilisé des feuilles matures, qui sont plus grande (Figure 4.13), et plus propice à l'application du stress et la mesure de résistance. Ceci signifie que tous les résultats ayant conduit au modèle d'atténuation de la signalisation JAs par *JAO2* proviennent de feuilles matures, chez lesquelles les colorations histologiques GUS révèlent une absence de marquage (Figure 4.11B à 4.11E). Il est improbable que l'action biologique de *JAO2* soit observée dans des feuilles matures alors que l'enzyme n'y est pas détectée. Nous avons cherché à voir chez les lignées complémentées GUS si dans les feuilles matures la protéine de fusion *JAO2*-GUS est active en mesurant la résistance à *Botrytis* (Figure 4.15). Le test d'infection montre comme attendu que *jao2-1* présente des lésions plus

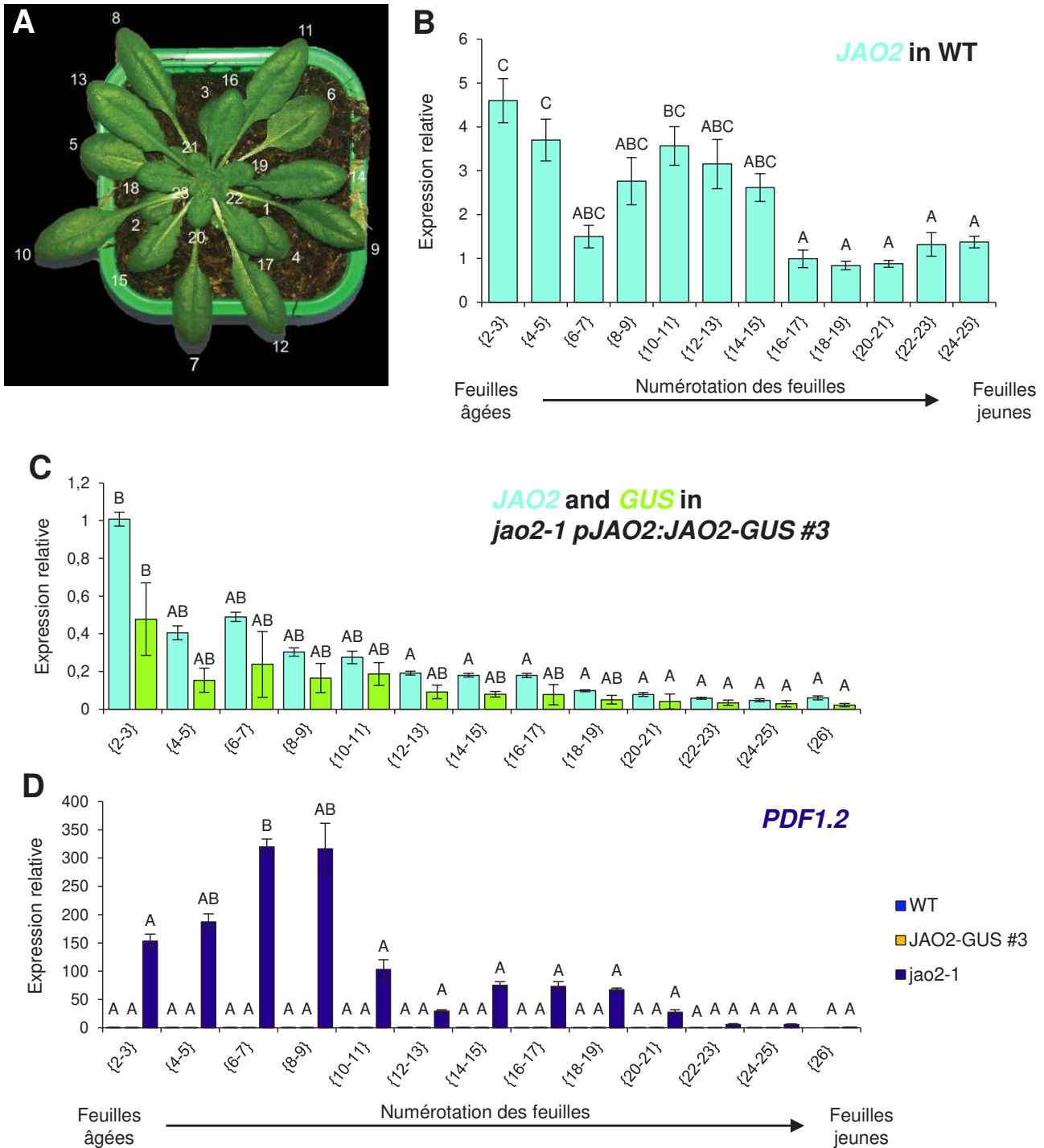


Figure 4.16. Expression de *JAO2* et de *PDF1.2* en fonction de l'âge des feuilles.

A, exemple de numérotation des feuilles d'une rosette d'*Arabidopsis* de la feuille la plus âgée (1) à la plus jeune (23) sur une plante *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3*.

B, moyenne d'expression de *JAO2* chez WT.

C, moyenne d'expression de *JAO2* (en bleu) et de *GUS* (en vert) du transcrit *JAO2-GUS* chez la lignée complétée *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3*.

D, moyenne d'expression de *PDF1.2* chez WT (en bleu foncé), chez la lignée complétée *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3* (en jaune) et chez le mutant *jao2-1* (en violet).

L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un quadruplat biologique analysé en triplicat technique. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative \pm l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey (**C**, $p < 0,05$; **B** et **D**, $p < 0,01$).

petites que le WT (Figure 4.15A). Les lignées complémentées avec JAO2-GUS et JAO2-stopGUS ont un diamètre des lésions similaire au WT (Figure 4.15A), JAO2-GUS a même une tendance à avoir des lésions plus grandes (Figure 4.15A et 4.15B). Ces deux lignées ont perdu le phénotype de résistance accrue typique de *jao2*, l'expression de la protéine de fusion JAO2-GUS régule donc bien la résistance dans les feuilles matures.

Nous obtenons donc une incohérence entre les différents résultats. D'une part, les colorations histologiques montrent que JAO2 ne s'accumule pas dans les feuilles matures (Figure 4.11B à 4.11E) et d'autre part, l'atténuation du phénotype de résistance à *Botrytis* de *jao2* par l'enzyme JAO2-GUS est observée dans ces mêmes feuilles (Figure 4.15A). Le mécanisme d'atténuation est fonctionnel dans les feuilles matures, il est étonnant que la protéine ne soit pas détectée (Figure 4.11B à 4.11E). Pour répondre à l'incohérence que nous venons de mettre à jour, nous avons cherché à compléter les données du GUS et des greffes en analysant plus précisément l'expression de *JAO2* en fonction de l'âge des feuilles. En effet, les greffes prouvent que c'est l'expression dans les feuilles qui est responsable du mécanisme d'atténuation de la signalisation JAs (Figure 4.14) et les GUS indiquent que *JAO2* a une localisation foliaire âge dépendant (Figure 4.11B à 4.11E). L'analyse de l'accumulation du transcrite *JAO2* en fonction de la croissance des feuilles révélera si l'expression du gène montre une cohérence avec la localisation de la protéine révélée par les GUS.

2.3. Expression de *JAO2* lors de la croissance foliaire

L'expression de *JAO2* est déterminée dans des feuilles individuelles, d'âge croissant. Ces expériences ont été conduites avec Pauline Delcros qui m'a secondé de manière efficace dans le cadre de son stage de Master 2 en 2018. Les feuilles sont numérotées en fonction de leur âge sur la base de différents paramètres décrits par E. Farmer (Farmer et al., 2013). Dans ce protocole, la feuille 1 représente la première feuille développée après les cotylédons et correspond donc à la feuille la plus âgée de la rosette. Les chiffres croissants représentent les feuilles issues successivement du méristème apical caulinaire et donc de plus en plus jeunes. Les analyses ont été faites avec des plantes de 43 jours cultivées en jours moyens, pour avoir une rosette bien développée, présentant en moyenne 23 à 26 feuilles (Figure 4.16A). Nous avons numéroté puis collecté les feuilles en regroupant 2 feuilles successives, une résolution jugée suffisante, afin d'effectuer une analyse, en quadruplicat, de l'accumulation des transcrits des gènes d'intérêt. Chez les plantes WT, il est observé que globalement les transcrits natifs *JAO2* s'accumulent plus fortement dans les feuilles matures (n°1 à n°15) que dans les feuilles jeunes (N16 à N°26) (Figure 4.16B). Il y a bien une expression de *JAO2* et une accumulation des transcrits foliaire âge-dépendante, mais qui de façon surprenante, ne corrèle pas avec les colorations histologiques GUS. La lignée rapportrice *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS #3* montre au

contraire une accumulation de la protéine de fusion JAO2-GUS dans les feuilles jeunes et son absence dans les feuilles matures (Figure 4.11B à 4.11E).

Nous avons réalisé la même analyse détaillée avec des plantes de cette lignée (Figure 4.16C). Il apparaît que chez cette lignée complémentée, le profil des transcrits *JAO2* issus du transgène sous le contrôle du promoteur *JAO2* est sensiblement similaire à celui des transcrits *JAO2* natifs des plantes WT (Figure 4.16B et 4.16C), à savoir une accumulation préférentielle dans les feuilles matures. De façon prévisible, l'utilisation d'amorces *GUS* sur le même matériel produit un profil similaire (Figure 4.16C), contredisant le marquage histologique GUS. Nous avons ensuite examiné l'expression du marqueur *PDF1.2* dans une série foliaire chez *jao2-1*, et confirmé que celle-ci est forte dans les feuilles matures (Figure 4.16D). Ce résultat montre en particulier que l'impact de la mutation *jao2-1* sur le niveau de défense est maximal dans les feuilles n°6 à n°9, qui est le stade utilisé pour étudier la résistance à *Botrytis*. Il réitère également à l'échelle des différents stades foliaires de la rosette l'antagonisme établi précédemment de façon globale entre les niveaux de transcrits *JAO2* et *PDF1.2*. Comme attendu, l'expression de *PDF1.2* est réversée au niveau très faible du WT dans toutes les feuilles du mutant complémenté, témoignant de la fonctionnalité de la construction. Il est à noter que la complémentation est indépendante du niveau de transcrit *JAO2*. Ces résultats surprenants posent plusieurs questions : on ne retrouve pas le parallélisme classique entre les niveaux de transcrits et ceux de la protéine JAO2. Les données présentées laissent penser à un, ou des, niveaux de régulation supplémentaire(s).

En résumé on a une contradiction marquée entre les données d'expression qui montrent une accumulation des transcrits majoritaire dans les feuilles matures (Figure 4.16) et les données histologiques qui montrent l'absence de la fusion protéique JAO2-GUS dans ces mêmes feuilles, mais en revanche qui la visualisent dans les feuilles jeunes (Figure 4.11). Comme le mécanisme d'atténuation des défenses par JAO2 est observé dans les feuilles matures, pourquoi n'observe-t-on pas de marquage histologique JAO2-GUS dans ces feuilles ? Il est possible que dans les feuilles matures les transcrit *JAO2* ne soient pas traduits en protéine. Une autre possibilité est que dans les feuilles matures, JAO2-GUS subit une modification post-traductionnelle qui altère soit sa stabilité, soit l'activité GUS. La protéine pourrait aussi subir un turnover ou une dégradation différentielle en fonction de l'âge des feuilles, ou un renouvellement trop rapide dans les feuilles matures pour permettre à l'enzyme GUS d'avoir son activité. Ces hypothèses pourraient aussi expliquer pourquoi aucune coloration n'est observée non plus dans les feuilles stimulées par la blessure (Figure 4.11H et 4.10I) alors que ce stimulus induit l'expression de *JAO2* (Figure 3.7). Dans ce cas de figure cela voudrait dire que l'infection par *Botrytis cinerea* stabiliserait la protéine puisqu'un marquage JAO2-GUS est observé autour de la lésion nécrotique (Figure 4.11J).

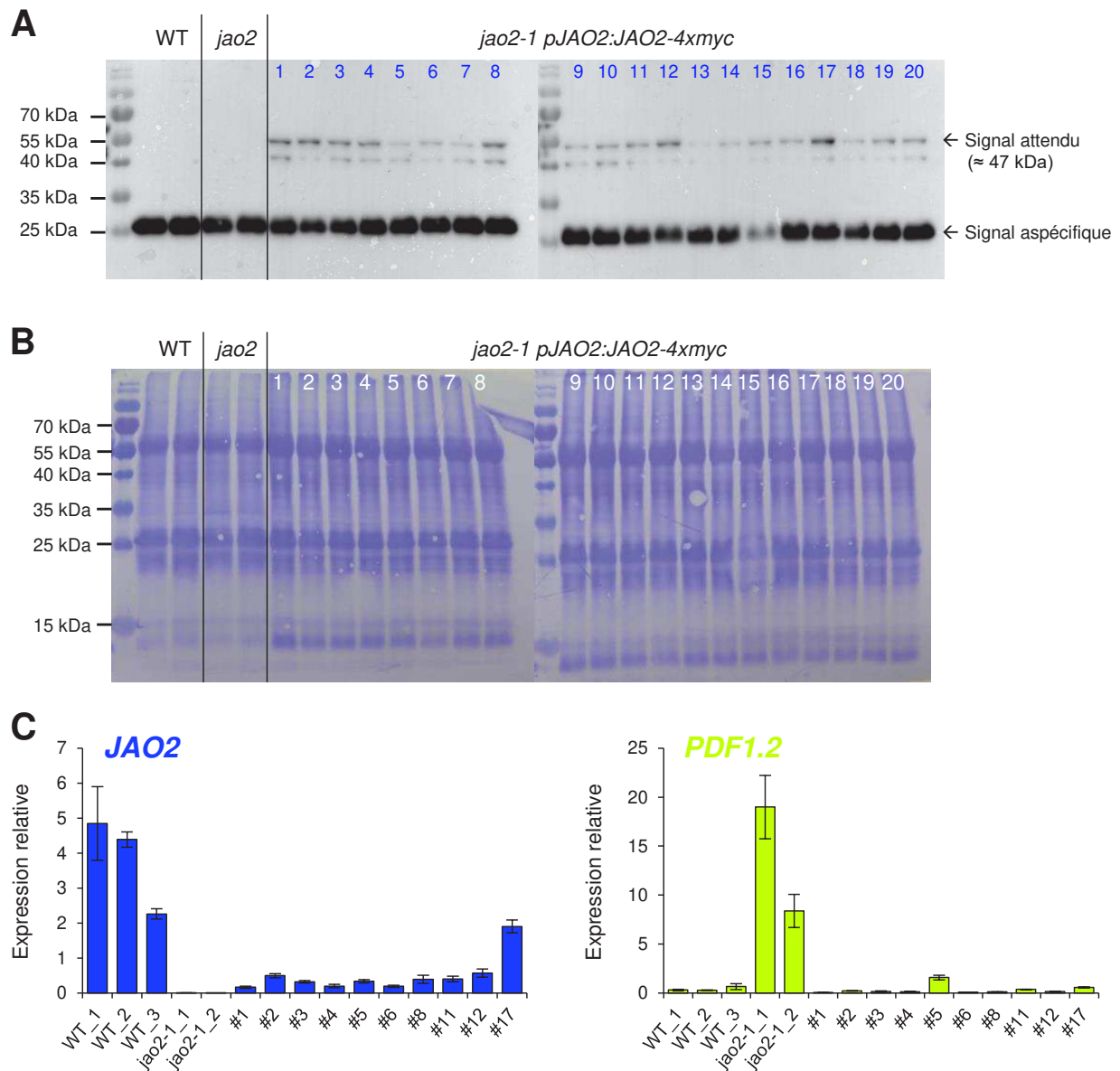


Figure 4.17. Analyse des transformants primaires *jao2-1 pJAO2:JAO2-4xMYC*.

A, western blot pour détecter le tag 4xMYC de la fusion JAO2-4xMYC chez vingt transformants primaires, exposition d'un minute. Le signal attendu est de 47 kDa, pour JAO2 qui fait 42 kDa et 4xMYC qui fait 4 x 1,2 kDa.

B, coloration au bleu de Coomassie des protéines totales des membranes exposées en **A**.

C, expression de *JAO2* et de *PDF1.2* chez les dix transformants primaires sélectionnés *jao2-1 pJAO2:JAO2-4xMYC*. L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un répliqua biologique analysé en triplicat technique. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative \pm l'écart type.

2.4. Analyse de l'accumulation foliaire d'une version étiquetée de JAO2

Nous avons développé un dernier outil en complétant *jao2-1* avec une construction exprimant JAO2 avec une étiquette myc C-terminale, que nous chercherons à détecter par *western blot*. Cette stratégie permet une détection immunologique de la protéine JAO2, indépendamment de l'activité enzymatique d'un rapporteur. J'ai réalisé le clonage de la construction *pJAO2:JAO2-4xmyc* dans le vecteur pGWB616 puis la transformation dans le mutant *jao2-1*. Vingt transformants primaires (T1, stade jeunes rosettes) ont été analysés pour la détection de l'étiquette 4xmyc par *western blot* (Figure 4.17A). Après un temps d'exposition d'une minute, la révélation des membranes montre un signal, plus ou moins intense, spécifique aux transformants, à la taille attendue de 47 kDa (Figure 4.17A). Une seconde bande est révélée à une taille un peu plus petite d'environ 40 kDa, au vu de sa taille il pourrait s'agir d'une forme tronquée de JAO2. L'anticorps anti-myc révèle chez les transformants, mais aussi chez WT et *jao2*, une bande intense aux environs de 15 kDa (Figure 4.17A), qui, au vu de la coloration des membranes au bleu de Coomassie (Figure 4.17B) semble indiquer qu'il correspondrait à une détection aspécifique de la petite sous unité de la Rubisco. Dix transformants ont été sélectionnés sur la base de l'intensité du signal myc (Figure 4.17A) pour avoir un panel représentatif d'un signal faible à fort. Pour ces dix plantes, les niveaux d'expressions de JAO2 et du marqueur de défense *PDF1.2* ont été mesurés dans les feuilles, indépendamment de leur âge, pour vérifier la fonctionnalité de la complémentation (Figure 4.17C). Toutes présentent une expression de JAO2 confirmant que la construction est transcrite, même si l'expression est plus faible par rapport au WT (Figure 4.17C). Les transformants présentent une extinction de l'expression de *PDF1.2*, comparable au WT, illustrant la réversion du phénotype de défense de *jao2* et donc la fonctionnalité de l'enzyme JAO2 étiquetée avec 4xmyc. Comme pour les lignées JAO2-GUS, la complémentation est indépendante du niveau de transcrit JAO2.

Des lignées mono-insertion homozygotes ont été établies en T3 et ont été utilisées pour analyser le signal @myc par *western blot* en fonction de l'âge des feuilles selon le protocole utilisé pour l'analyse de l'expression de JAO2 lors de la croissance foliaire (Figure 4.16A). La révélation de la membrane a nécessité cette fois-ci un temps d'exposition plus long, de cinq minutes, et l'intensité des signaux, spécifiques et aspécifiques, est malgré tout plus faible (Figure 4.18A) que ce qui a été obtenu en T1 (Figure 4.17A). Concernant le signal à 47 kDa correspondant à la protéine étiquetée JAO2-4xmyc, on observe un signal très faible au niveau des feuilles les plus âgées qui s'intensifie vers les feuilles les plus jeunes (à partir de 11-12 jusqu'à 17-18) (Figure 4.18A). La coloration au bleu de Coomassie de la membrane montre que chaque puits contient une quantité similaire de protéines totales (Figure 4.18B), confirmé

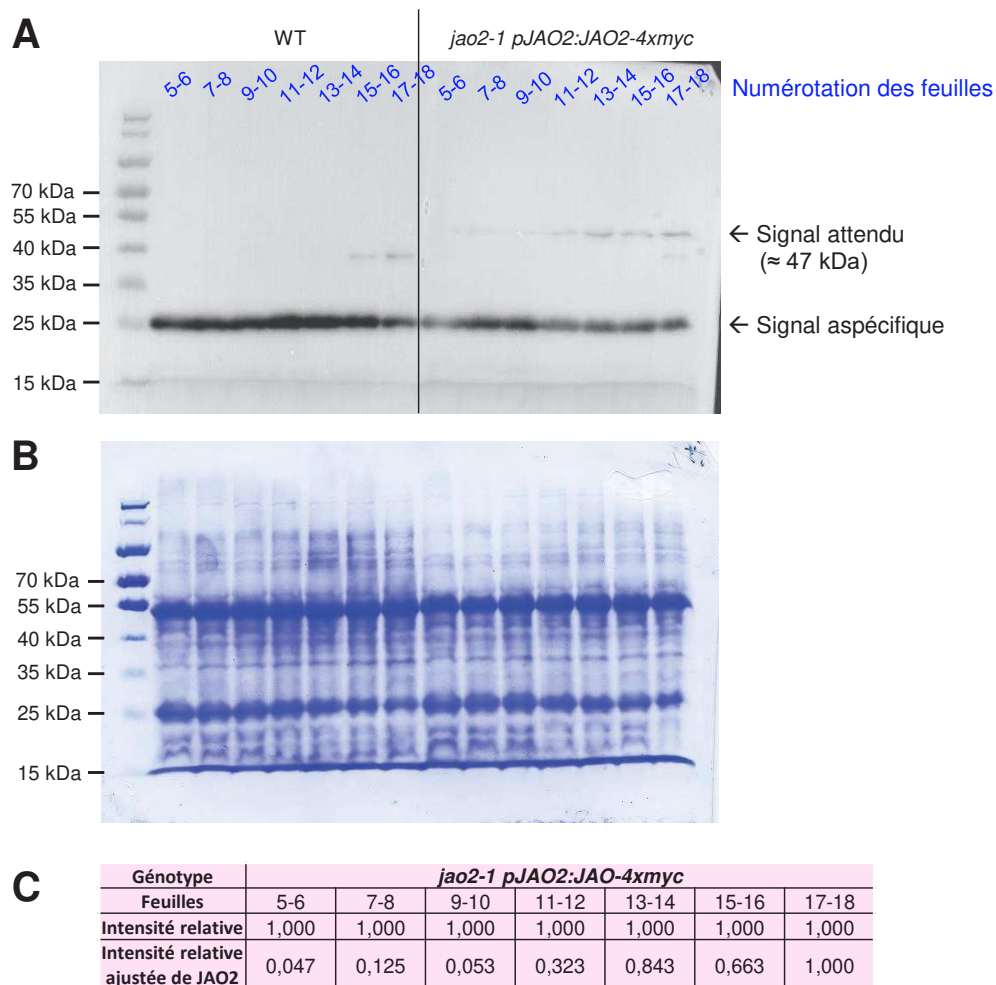


Figure 4.18. Détection du tag myc dans une lignée *jao2-1 pJAO2:JAO2-4xmyc* selon la croissance foliaire.

A, détection par *western blot* de l'étiquette 4xmyc de la fusion JAO2-4xmyc d'une plante *jao2-1 pJAO2:JAO2-4xmyc* de 36 jours, exposition de cinq minutes. Le signal attendu est de 47 kDa, pour JAO2 qui fait 42 kDa et 4xmyc qui fait 4 x 1,2 kDa. Les feuilles analysées sont numérotées de la plus âgée (5) à la plus jeune (18).

B, coloration au bleu de Coomassie des protéines totales de la membrane exposée en **A**.

C, intensité relative ajustée de la bande correspondant à JAO2-4xmyc (**A**), en fonction de l'intensité relative des protéines totales (**B**), fixé à 1 pour le dernier puits, déterminée à l'aide du logiciel Image J (<https://imagej.net/Welcome>).

par une analyse quantitative de l'image (Figure 4.18C). La détermination de l'intensité relative ajustée de la bande correspondant à JAO2-4xmyc (Figure 4.18C) confirme le patron observé en Figure 4.18A, à savoir un signal plus fort dans les feuilles les plus jeunes. On peut conclure que l'intensité plus importante de la bande JAO2-4xmyc dans les feuilles jeunes de la plante *jao2-1 pJAO2:JAO2-4xmyc* (Figure 4.18A) est due à une accumulation plus importante de la protéine étiquetée par rapport aux feuilles matures.

En conclusion, l'analyse de la protéine étiquetée JAO2-4xmyc conforte les colorations histologiques GUS (Figure 4.11B à 4.11E), les deux techniques localisant la protéine JAO2 dans les feuilles jeunes, et montrent une absence de détection dans les feuilles matures. Ces deux expériences s'opposent au résultat de l'analyse de l'accumulation du transcrite de *JAO2* qui montre une abondance des transcrits plus forte dans les feuilles matures (Figure 4.16B et 4.16C). Le rôle d'atténuation de JAO2 est, quant à lui, observé majoritairement dans les feuilles matures (Figure 4.15 et Figure 4.16D), corrélant avec le profil d'expression de *JAO2*. Nous obtenons une absence de corrélation entre l'expression du gène, l'accumulation de la protéine et son action biologique au niveau des feuilles matures.

3. La fonction de JAO2, contrôle-t-elle la tolérance à d'autres types de stress, par exemple des stress abiotiques ?

Depuis quelques années des indications convergent vers l'implication des JAs dans la tolérance à des stress abiotiques, notamment le stress hydrique où, suite à la perception du stress, une accumulation transitoire des JAs est observée (Ruan et al., 2019). Dans le présent document je considère le stress hydrique dû au manque d'eau et non pas dû à un excès d'eau. De plus, plusieurs voies qui permettent la tolérance et la résistance à la déshydratation qui sont induites par l'ABA, l'hormone dite de stress hydrique, le sont via des FT également inductibles par le JA-Ile (Figure 1.24B) (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Pauwels et al., 2015; Skubacz et al., 2016). Enfin les travaux de Kim *et al.*, (2017) sur le stress hydrique ont démontré que la synthèse d'acétate favorise la tolérance d'*Arabidopsis* à ce stress par la synthèse de JA, de JA-Ile et une signalisation COI1 dépendante (Figure 1.24A) (Kim et al., 2017). Ces données bibliographiques démontrent une implication des JAs contre le stress hydrique, ce qui corrèle avec les données de transcriptomique issue de la comparaison entre WT et *jao2*. En effet, sur les 41 FT surexprimés chez *jao2*, six d'entre eux sont impliqués dans la résistance au stress hydrique (Annexe 3). Parmi eux, on retrouve deux DREB et le *Related to ABI3/VP1 2* (**RAV2**), qui appartient à la famille des ERF/**APT2** (*APETALA2*). Ces trois FT sont caractérisés pour être induits en réponse à divers stress abiotiques mais plus particulièrement au stress hydrique (Sakuma et al., 2002; Agarwal et al., 2006; Khan, 2011).

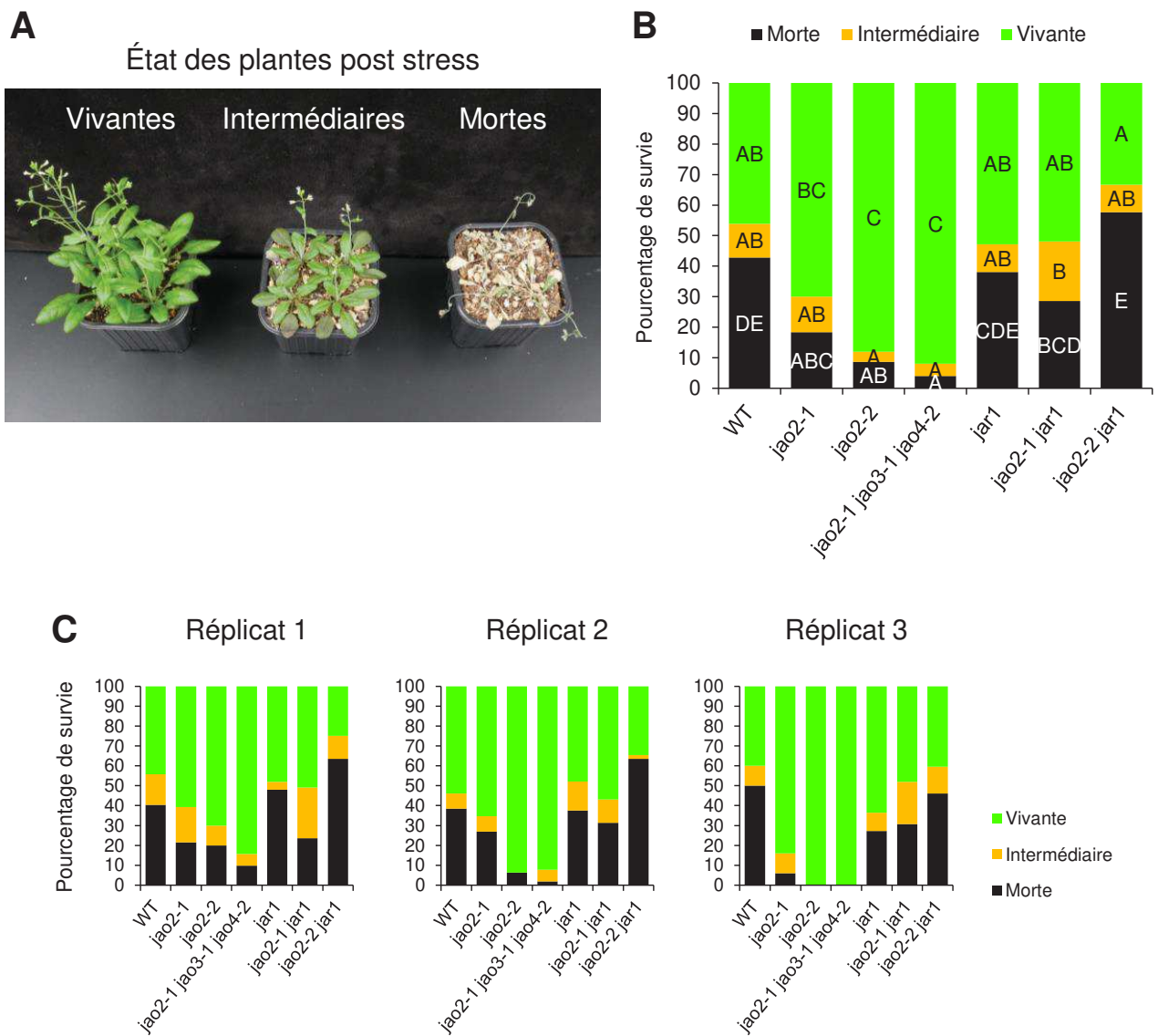


Figure 4.19. Taux de survie de mutants *jao2* à la suite d'un stress hydrique.

A, illustration des trois stades de survies définis suites à l'arrêt du stress : vivantes, ce qui représente les plantes ne présentant aucun symptôme dû au stress ; mortes, ce qui définit les plantes qui n'ont pas survécus au stress ; et intermédiaire, représentant les plantes qui ont survécus mais qui montrent des symptômes de déshydratation tel un assèchement foliaires ou des tissus anthocyanés.

B, l'histogramme empilé représente le pourcentage moyen de trois réplicats biologiques de chacun des trois états des plantes (**A**) pour chaque génotype, comptabilisé sur plus de 150 plantes par génotypes. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative entre génotype pour un même état déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

C, histogrammes empilés des trois réplicats biologiques indépendants moyennés en **B**. Les histogrammes représentent le pourcentage de chacun des trois états des plantes (**A**) pour chaque génotype, comptabilisé sur plus de 50 plantes par réplicats.

Les DREB sont des acteurs majeures dans l'induction de la tolérance à la déshydratation chez de nombreuses espèces de plantes, de façon ABA dépendante et indépendante (Agarwal et al., 2006; Khan, 2011; Golldack et al., 2014). Un quatrième FT, le NAC appelé RD26, qui est induit par l'ABA et est caractérisé pour induire des réponses de tolérance à la déshydratation (Fujita et al., 2004; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Ye et al., 2017) est également surexprimé chez *jao2* (Annexe 3). Par ailleurs, la caractérisation de RD26 a révélé qu'il est aussi induit par un traitement avec du MeJA (Fujita et al., 2004), il n'est donc pas surprenant de le retrouver parmi les FT induits chez le mutant *jao2* avec une signalisation basale constitutive (Annexe 3). Du fait de ces informations, nous nous sommes demandé si *jao2*, qui présente des réponses de résistances allumées en permanence (Annexe 3), est également plus résistant au stress hydrique.

3.1. Tolérance de *jao2* au stress hydrique

Pour tester si le mutant *jao2* est plus résistant, j'ai réalisé une expérience de stress hydrique en me basant sur le protocole usité par Kim *et al.*, (2017). Il s'agit d'un protocole pour appliquer un stress hydrique sévère qui amène les plantes à leur limite de résistance pour déterminer leur taux de survie. Lors de l'expérimentation j'ai travaillé sur deux allèles *jao2*, ainsi qu'avec le triple mutant *jao* (*jao2-1 jao3-1 jao4-2*, abrégés ***jao234*** dans la suite de ce document), afin de tester d'éventuels effets additifs. Les plantules des différents génotypes sont cultivées en conditions optimales (avec contrôle de l'humidité) jusqu'au stade jeune rosettes, de 17 jours, puis l'arrosage est complètement arrêté pendant 14 jours. Passé ce délai les plantes sont réarrosées pendant 4 jours avant de définir le pourcentage de survie de chaque génotype (Figure 4.19). Il est visuellement défini trois états de survie pour les plantes après le réarrosage : vivantes, mortes et intermédiaire (Figure 4.19A). Les vivantes représentent les plantes sans symptôme, les mortes celles qui n'ont pas survécus au stress et les intermédiaire, c'est les plantes qui ont survécus mais qui montrent des symptômes de déshydratation tel un assèchement foliaires ou des tissus anthocyanés. L'état intermédiaire ne révèle pas de différences majeures entre les génotypes (Figure 4.19B), les interprétations qui suivent sont donc basées sur les états vivantes et mortes.

Le WT montre un taux équivalent de plantes mortes et de plantes vivantes à environ 45 %, (Figure 4.19B). Par suite d'une sécheresse sévère, les deux allèles simples *jao2* ont un pourcentage de plantes vivantes plus important par rapport au WT, de 70 % pour *jao2-1* et de 88 % pour *jao2-2* (Figure 4.19B). Le taux de mortalité est, par ailleurs, plus faible pour les deux mutants, de seulement 18 % pour *jao2-1* et de 9 % pour *jao2-2*. On observe un effet plus marqué pour l'allèle *jao2-2* (Figure 4.19B). Ce résultat est accentué chez *jao234* qui, même s'il n'est pas significativement plus résistant que le mutant simple *jao2-1*, montre une tendance

à un taux de plantes vivantes plus élevé, à raison de 92 % pour 4 % de mortes (Figure 4.19B). Ces données démontrent que la mutation *jao2*, à l'image de la résistance aux stress biotiques (Caarls et al., 2017; Smirnova et al., 2017), favorise la tolérance au stress abiotique sécheresse sévère en permettant un meilleur taux de survie des plantes. La tendance de *jao234* à avoir un taux de survie plus important que *jao2-1* suppose un effet additif des mutations en réponse à ce stress. De façon spectaculaire, la survie élevée des allèles *jao2* est perdue chez les doubles mutants *jao2 jar1*. En effet, *jao2-1 jar1* présente un taux de survie de 52 % pour un taux de décès de 29 % (Figure 4.19B). Ce résultat démontre que l'absence de JA-Ile réverte le phénotype *jao2* et la perte est encore plus marquée chez *jao2-2 jar1* qui a un taux de survie de seulement 33 % pour un taux de décès de 58 % (Figure 4.19B). Le phénotype de résistance au stress hydrique apporté par *jao2* est donc clairement dépendant de la formation de JA-Ile.

Le mutant simple *jar1* à un taux de survie similaire au WT, avec 53 % de survie des plantes pour 38 % de mortes (Figure 4.19B). L'absence de formation de JA-Ile n'impacte pas la résistance à un stress hydrique sévère. Néanmoins une étude récente montre une accumulation tardive de JA-Ile en réponse à un stress hydrique modéré, associé avec une induction de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la signalisation JA-Ile (Urano et al., 2017). Il est possible que cette accumulation tardive ait un impact secondaire sur la tolérance lorsque le stress hydrique se prolonge. Dans les conditions du test que j'ai appliqué, qui est un stress sévère, au bout de 14 jours le JA-Ile n'a peut-être plus d'impact sur la tolérance au stress ce qui pourrait expliquer pourquoi le mutant *jar1* ne se montre pas plus sensible que WT au niveau du taux de survie (Figure 4.19B).

Le résultat phénotypique de *jao2* confirme les prédictions issues de l'analyse du transcriptome de *jao2-1* et montre que sa tolérance élevée au stress concerne aussi le stress abiotique de type hydrique. Les cibles moléculaires JA-Ile dépendants responsables de ce phénotype restent à identifier, on peut néanmoins supposer que c'est dû à l'expression basale de voies de résistance au stress hydriques qui ne seraient plus réprimées chez *jao2* (Annexe 3).

3.2. Implication de l'ABA dans le phénotype de tolérance à la déshydratation de *jao2*

L'ABA est l'hormone majoritaire dans l'induction des réponses au stress hydrique (Golldack et al., 2014). Parmi les FT de réponse au stress hydrique surexprimé chez *jao2*, les DREB A2 et A5, RAV2 et le NAC ANAC055 (Annexe 3) peuvent être induit de façon ABA dépendante (Agarwal et al., 2006; Khan, 2011; Golldack et al., 2014; Dong et al., 2015). Il n'existe pas encore d'informations sur la dépendance à l'ABA de MYB47, un autre FT de réponse à la

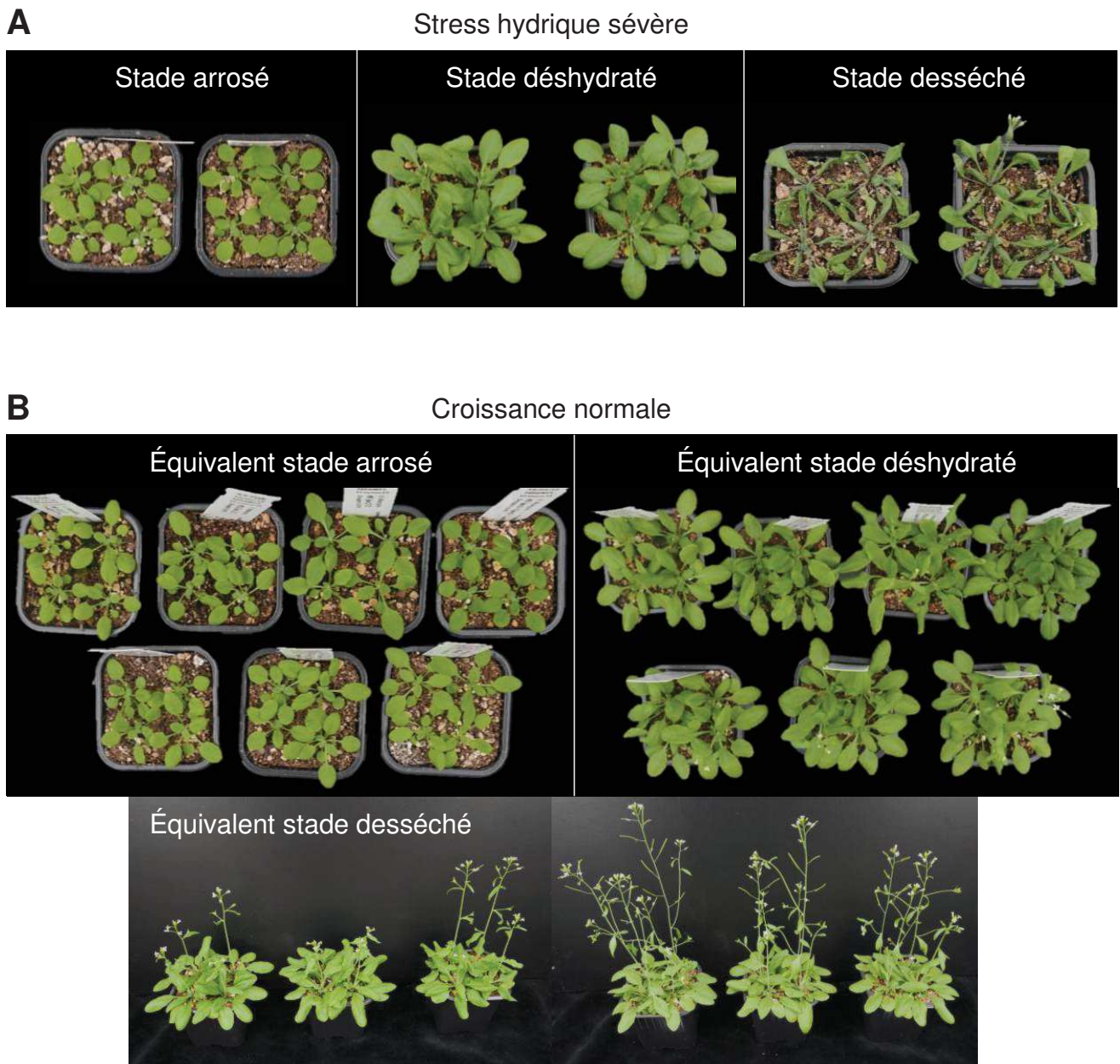


Figure 4.20. Stades d'études du stress hydrique sévère.

A, le stade arrosé correspond à des plantules de 18 jours en condition hydrique optimale, le lendemain du dernier arrosage. Le stade déshydraté correspond à des plantes de 26 jours, soit 9 jours après le dernier arrosage. Les plantes du stade déshydraté présentent un retard de croissance mais pas d'autres symptômes. Le stade desséché correspond à des plantes de 31 jours, soit 14 jours après le dernier arrosage. Les plantes de ce troisième stade présentent de nombreux symptômes de stress hydrique : des feuilles flétries, sèches et cassantes, qui ont perdu leur chlorophylle.

B, les plantes dites en croissances normales n'ont pas subi le stress est ont reçu un arrosage optimale pendant toute la durée du test.

déshydratation induit chez *jao2*. Néanmoins il est connu qu'en réponse au stress hydrique, l'induction de la voie de tolérance qui passe par les MYB est activée par la signalisation ABA (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Khan, 2011). Au vu de l'ensemble de ces informations, nous nous sommes demandé si le phénotype de tolérance à la déshydratation de *jao2* est ABA dépendant. J'ai mesuré l'expression de gènes marqueurs de la voie de l'ABA pour définir l'impact de *jao2* sur la synthèse et la signalisation de l'ABA au cours du stress hydrique.

L'expression de gènes marqueurs de la synthèse et de la signalisation ABA est mesurée dans les parties foliaires pour chaque génotype, à trois stades du test de stress hydrique (Figure 4.20). Le premier temps correspond au stade nommé **arrosé**. Il s'agit de plantules récoltées le lendemain du dernier arrosage, soit des plantules de 18 jours en conditions optimales (Figure 4.20A). Le second temps correspond au stade dit **déshydraté**. 9 jours après le dernier arrosage, les plantes de 26 jours présentent un retard de croissance par rapport à des plantes contrôles non stressées, mais leur feuillage présente un aspect quasi normal (Figure 4.20A). Dès le lendemain, lors du dixième jour du stress, des symptômes plus forts sont apparus telles qu'un assombrissement des feuilles, probablement dû à la production d'anthocyanes lorsque le contenu foliaire en eau diminue (Sperdouli et Moustakas, 2012). Le troisième et dernier stade correspond au quatorzième jour depuis le début du stress et est appelé stade **desséché**. Ces plantes de 31 jours présentent de forts symptômes de déshydratation avec des feuilles flétries, sèches et cassantes, qui ont perdu leur chlorophylle (Figure 4.20A). Ce stade est prélevé juste avant la reprise de l'arrosage. En parallèle, plusieurs pots de quatre plantes par génotypes ont reçu un arrosage optimal pendant toute la durée du stress pour visualiser son effet sur la croissance. Un panel représentatif est présenté en Figure 4.20B. Au temps du stade déshydraté, on remarque que les plantes avec une croissance sans stress apparaissent plus grandes et présentent déjà des hampes florales pour certaines (Figure 4.20B). L'équivalent au dernier stade, le desséché, la différence de développement avec les plantes stressées est conséquente, les plantes en croissance normale ont une large rosette foliaire et pour la plupart de grandes hampes florales (Figure 4.20B).

Aux trois stades, trois gènes sont choisis comme marqueurs de la voie ABA et du stress hydrique. Le gène *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3* (**NCED3**), qui est nécessaire à la biosynthèse d'ABA lors d'un stress hydrique (Luchi et al., 2001), pour définir si la mutation *jao2* entraîne l'expression pour la néosynthèse d'ABA. *Responsive to Deseccation 29A* (**RD29A**) révèle si la signalisation ABA est impliquée chez *jao2* car c'est un gène induit de façon ABA dépendante qui participe à la tolérance à la déshydratation, bien que la fonction de la protéine ne soit pas encore déterminée (Msanne et al., 2011). Enfin le troisième gène étudié code la *pyrroline-5-carboxylate synthase 1* (**P5CS1**) dont l'expression peut être ABA dépendante et

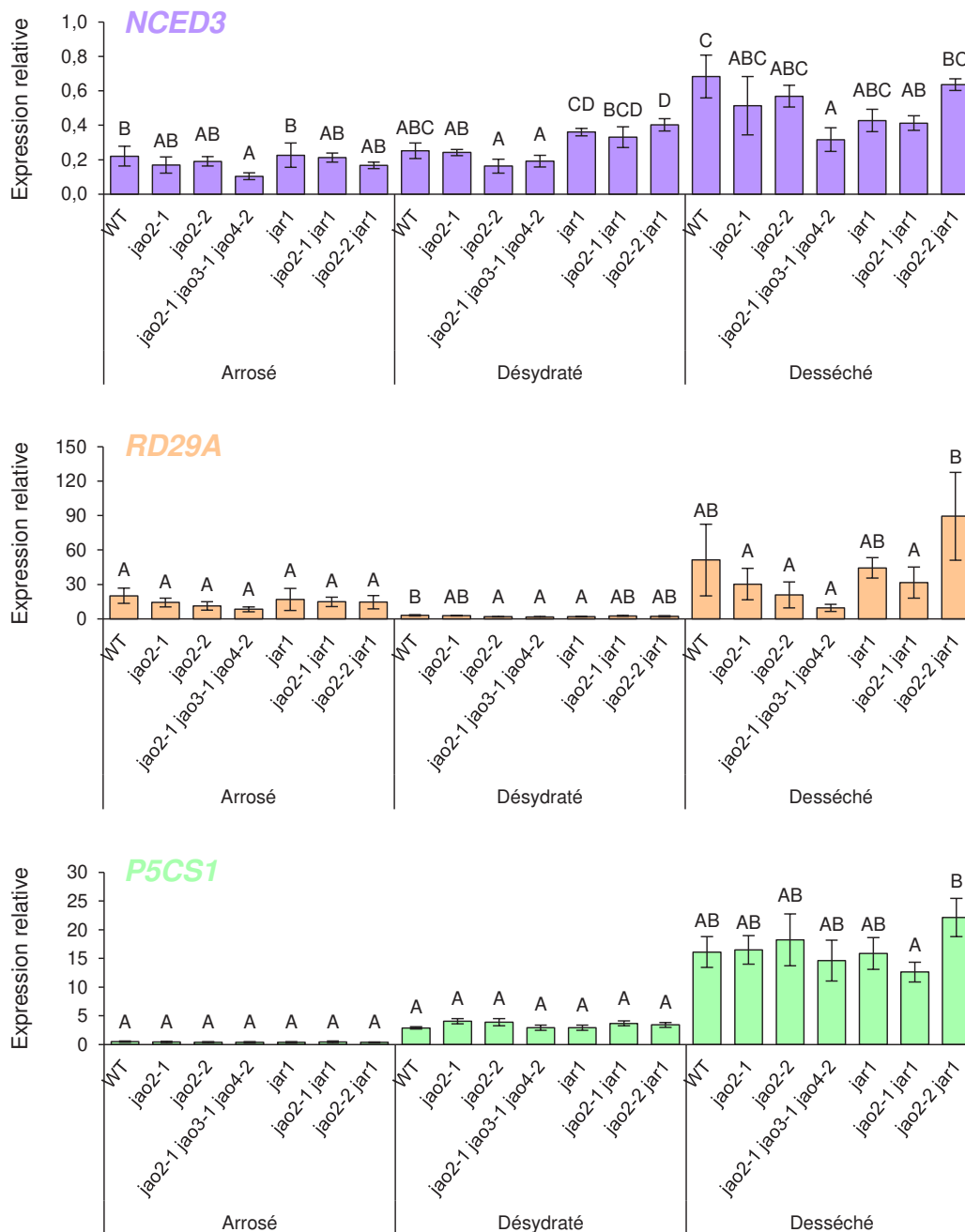


Figure 4.21. Expression de marqueurs de réponses à la déshydratation au cours d'un stress hydrique par manque d'eau.

Au cours d'un test de stress hydrique par arrêt complet d'arrosage, les parties foliaires de quatre plantes par génotype et par réplica sont récoltées et groupées à trois stades distincts. Le stade arrosé qui correspond au premier jour du stress où les plantes n'ont pas encore perçu un manque d'eau, le stade déshydraté neuf jours après l'arrêt d'arrosage où les plantes montrent juste un retard de croissance, et le stade desséché au bout de quatorze jours de stress où les plantes sont pratiquement mortes. L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un triplicat biologique analysé en triplicat technique. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative \pm l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative à un même stade déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,01$).

dont l'enzyme définit une étape clé dans la production de l'acide aminé proline (Yoshida et al., 1999). La proline est un osmoprotecteur qui, entre autres, protège les protéines et les parois cellulaires en prenant la place de l'eau qui leur est initialement liée afin d'éviter leur dénaturation (Szabados et Szeve, 2010). L'intérêt d'étudier l'expression de *P5CS1* est qu'il peut également informer sur une tolérance au stress hydrique ABA indépendante comme l'induction du gène peut être induit par d'autres facteurs que cette hormone (Sharma et Versluis, 2010). De plus, l'expression de *P5CS1* est régulée par le FT ANAC055 (Fu et al., 2018) qui est l'un des FT surexprimé chez *jao2* d'après les données de RNAseq (Annexe 3). La tolérance de *jao2* à la déshydratation peut être due à une production accrue de l'osmoprotecteur proline.

Pour les trois gènes, en ce qui concerne WT, on observe comme attendu que le stress hydrique induit leur expression (Figure 4.21). Étrangement une baisse de l'expression de *RD29A* au stade déshydraté est observée avant que celle-ci ne soit induite au stade desséché. Il est possible que la fonction de *RD29A* intervienne lorsque le stress se prolonge. L'augmentation de l'expression est particulièrement marquée pour *P5CS1* (Figure 4.21). La proline intervient majoritairement lorsque le stress hydrique se prolonge et devient extrême pour la plante, comme c'est le cas pour le stade desséché. Aucune différence d'expression de *P5CS1* n'est obtenue entre WT et les génotypes mutants pour chacun des trois stades du stress (Figure 4.21). Ce résultat démontre que la synthèse de l'osmoprotecteur proline n'est pas impliquée dans le phénotype différentiel de tolérance au stress hydrique observée chez les différents phénotypes. Un dosage de cet osmoprotecteur est nécessaire pour le confirmer.

L'expression de *NCED3* est significativement plus faible, dès le stade arrosé, uniquement chez le triple mutant *jao*, ce qui soutient que *JAO3* ou *JAO4* a également un rôle qui impacte, directement ou indirectement, la voie de synthèse de l'ABA. Cette tendance se retrouve aux deux stades suivants bien qu'elle ne soit significative qu'au stade desséché (Figure 4.21). Les deux mutants simples *jao2* montrent aussi une tendance à une expression plus faible de *NCED3*. Encore une fois ce résultat est plus marqué pour l'allèle *jao2-2*. Cette tendance est perdue chez les doubles mutants *jao2 jar1*, ce qui est particulièrement visible au stade déshydraté (Figure 4.21). L'ABA intervient pour l'induction de la résistance au stress hydrique dès la perception de celui-ci (Gollack et al., 2014). Il n'est pas surprenant que l'effet des différents génotypes sur l'expression de *NCED3* soit plus marqué aux stades arrosé et déshydraté par rapport au stade desséché où l'ABA a déjà induit la signalisation pour la résistance à la déshydratation. Pour vérifier si la synthèse de l'hormone est réellement réprimée chez les mutants *jao2*, j'ai effectué le dosage de l'ABA aux trois stades (Figure 4.22). Les génotypes *jao2* et *jao234* sont ceux qui accumulent le moins l'hormone, en particulier aux stades déshydraté et desséché (Figure 4.22). Le profil d'accumulation de l'ABA corrèle avec

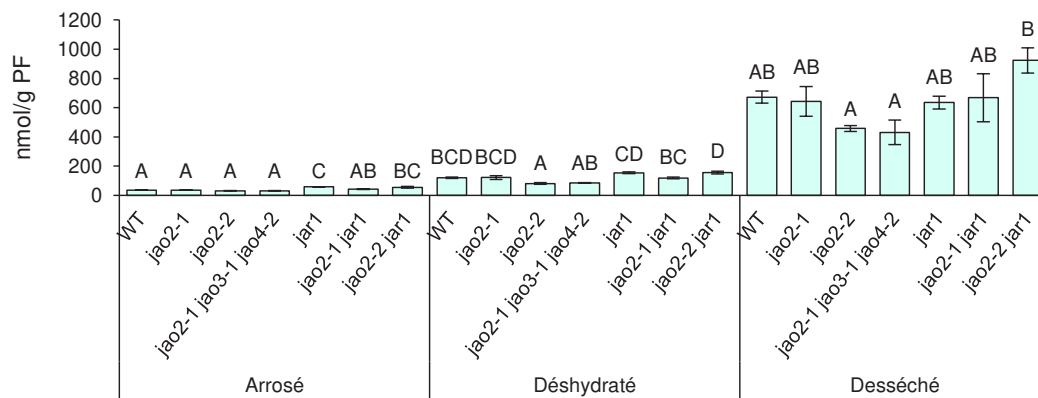


Figure 4.22. Dosage de l'ABA au cours d'un stress hydrique par manque d'eau.

Au cours d'un test de stress hydrique par arrêt complet d'arrosage, les parties foliaires de quatre plantes par génotype et par réplica sont récoltées à trois stades distincts. Le stade arrosé qui correspond au premier jour du stress où les plantes n'ont pas encore perçu un manque d'eau, le stade déshydraté neuf jours après l'arrêt d'arrosage où les plantes montrent juste un retard de croissance, et le stade desséché au bout de quatorze jours de stress où les plantes sont pratiquement mortes. L'ABA a été extrait et quantifié par UHPLC-MS/MS, le niveau d'accumulation est exprimé en nmol g^{-1} de poids frais. L'histogramme représente la moyenne de l'accumulation \pm l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative à un même stade déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

le profil d'expression de *NCED3* (Figure 4.21) chez ces mutants. En présence de la mutation *jar1*, l'ABA s'accumule comme chez le WT à l'exception du stade arrosé, en absence de stress, où les mutants *jar1* présentent une suraccumulation de l'ABA (Figure 4.22). On peut supposer que la signalisation JA-Ile réprime, directement ou indirectement, l'accumulation d'ABA. Il a été montré, par ailleurs, que dans les racines la formation du JA-Ile impact la synthèse de l'ABA en condition de stress hydrique (de Ollas et al., 2015). Cependant, contrairement à nos résultats, le JA-Ile permet suite à la perception du stress l'induction de l'expression de la biosynthèse de l'ABA (via *NCED3*) et son accumulation racinaire (de Ollas et al., 2015). Les résultats obtenus confirment que la tolérance au stress hydrique des mutants *jao* est corrélé avec une accumulation plus faible d'ABA, probablement par répression de sa biosynthèse de façon JA-Ile dépendante (Figure 4.19, 4.21 et 4.22). L'ABA et le JA-Ile interagissent et s'influencent à plusieurs niveaux de signalisation (Nguyen et al., 2016; Skubacz et al., 2016). Il est connu que l'ABA réprime l'accumulation de JA-Ile durant un stress hydrique modéré (Urano et al., 2017), on pourrait supposer que l'ABA induit les JAO au cours du stress pour consommer la pro-hormone JA par exemple. Les *crossstalks* hormonaux présentent parfois des effets réciproques, il est possible que le JA-Ile réprime également l'accumulation d'ABA pendant le stress. Cette conclusion est également soutenue par la relation inverse qui montre que le génotype *jao2-2 jar1*, qui est celui qui a le plus faible taux de survie après le stress, possède la plus forte accumulation d'ABA au stade desséché (Figure 4.19 et 4.22). L'accumulation d'ABA ne semble pas affecter positivement la survie des mutants *jao*. Pour le confirmer, il faudrait déterminer la tolérance au stress d'un mutant *jao2 nced3* afin de voir s'il est encore plus résistant à la déshydratation que le mutant simple *jao2*. On peut supposer que JAO2 atténue une signalisation JA-Ile qui permet, d'une part, d'activer une expression basale de gènes de réponses à la déshydratation, tels les six FT révélés par l'analyse transcriptomique de *jao2* (Annexe 3), et d'autre part, de réprimer l'expression de gène de la synthèse de l'ABA tel *NCED3* (Figure 4.21). Il serait complémentaire d'étudier l'expression de ces six FT dans cette expérience.

Au-delà de l'accumulation de l'ABA, l'expression de *RD29A* nous révèle l'impact des mutations *jao2* sur la signalisation ABA dépendante au cours du stress hydrique. Le profil d'expression de *RD29A* corrèle avec le profil de *NCED3* (Figure 4.21). En effet au stade arrosé il est observé une tendance à une expression plus faible de *RD29A* chez les mutants *jao* par rapport au WT, surtout chez *jao234*. Cet effet se retrouve de façon significative au stade déshydraté et apparaît encore plus prononcé au stade desséché bien que pour celui-ci, la différence avec WT ne soit pas significative (Figure 4.21). Comme pour *NCED3*, la tendance de chute d'expression de *RD29A* chez les mutants *jao* est perdue lorsque la mutation est conjuguée à celle de *jar1* (Figure 4.21). En conclusion, en réponse au stress hydrique, la mutation *jao2*

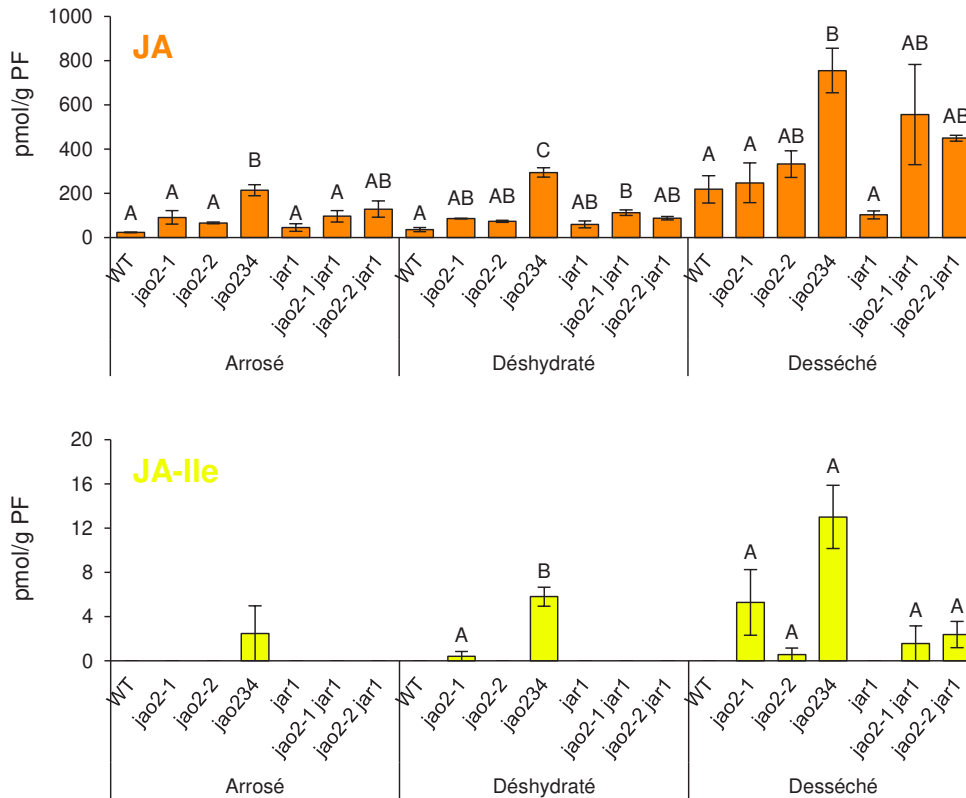


Figure 4.23. Dosage des JAs au cours d'un stress hydrique par manque d'eau.

Au cours d'un test de stress hydrique par arrêt complet d'arrosage, les parties foliaires de quatre plantes par génotype et par réplica sont récoltées à trois stades distincts. Le stade arrosé qui correspond au premier jour du stress où les plantes n'ont pas encore perçu un manque d'eau, le stade déshydraté neuf jours après l'arrêt d'arrosage où les plantes montrent juste un retard de croissance, et le stade desséché au bout de quatorze jours de stress où les plantes sont pratiquement mortes. Les JAs ont été extraits et quantifiés par UHPLC-MS/MS, les niveaux d'accumulations sont exprimés en pmol g^{-1} de poids frais. Les histogrammes représentent la moyenne de l'accumulation \pm l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative à un même stade déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

jao234 = triple mutant *jao2-1 jao3-1 jao4-2*.

réprime l'expression de gène de biosynthèse (*NCED3*) et de signalisation (*RD29A*) de l'ABA, et favorise la tolérance et la survie des plantes (Figure 4.19), de façon JA-Ile dépendante. La réciproque s'observe également car le mutant *jao2-2 jar1* qui présente le taux de survie le plus faible à la fin du stress (Figure 4.19) est celui qui possède l'expression la plus forte de *NCED3* et de *RD29A* corrélé à l'accumulation la plus importante de l'ABA (Figure 4.21 et 4.22).

Ces résultats originaux indiquent que dans nos conditions, une activation préalable de la voie JAs permet un gain substantiel dans la survie des plantes, et que ceci s'accompagne de la répression de la voie classique de tolérance dépendant de l'ABA. Les effecteurs exacts activés par la voie JAs restent à découvrir. La tolérance au stress hydrique par des voies ABA indépendantes est décrite de longue date (Khan, 2011). De plus la caractérisation du rôle de l'acétate, qui favorise la résistance à la déshydratation via l'induction de la synthèse de JA et JA-Ile, ne nécessite pas la synthèse d'ABA (Kim et al., 2017). Ces données supposent qu'une voie de résistance à la déshydratation ABA indépendante et JAs dépendante pourrait exister.

3.3. Implication des JAs dans le phénotype de tolérance à la déshydratation de *jao2*.

La tolérance au stress hydrique peut être induite de façon JAs dépendante, notamment par l'induction de FT qui régulent positivement la tolérance à ce stress tel MYC2, des MYB ou RD26 (de Ollas et Dodd, 2016). Nous avons montré qu'à l'état basal la mutation *jao2* impact peu les profils d'accumulations des JAs mais qu'elle a un effet marqué après stimulus infection sur la plupart des JAs (Smirnova et al., 2017). J'ai cherché à déterminer l'évolution des JAs au cours du stress hydrique, aux trois mêmes stades d'analyses que l'ABA (Figure 4.20A).

Pour la pro-hormone JA, il est observé chez le WT qu'elle s'accumule au cours du stress (Figure 4.23), soutenant l'hypothèse d'une résistance JAs dépendante. On observe qu'au stade arrosé, les trois mutants *jao* présentent une tendance à une suraccumulation du JA par rapport au WT, qui est significative chez *jao234* (Figure 4.23). Cette tendance s'amplifie aux stades déshydraté et desséché. Comme *jao234* suraccumule plus le JA que les mutants simples *jao2*, on peut supposer que les JAO agissent en synergie dans la consommation du JA en réponse à la déshydratation. L'hormone JA-Ile n'est presque pas détecté dans les plantes à l'exception de *jao234* dès le stade arrosé (Figure 4.23). On observe chez ce mutant une suraccumulation croissante de JA-Ile au cours du stress (les quantités restent assez faibles), ce qui corrèle avec le taux de survie le plus élevé de *jao234* (Figure 4.19B) et l'hypothèse d'une tolérance JA-Ile dépendante. Au stade le plus tardif du stress, le JA-Ile est détecté dans les autres génotypes qui présentent une mutation *jao2* (Figure 4.23), même chez les doubles *jao2 jar1*. JAR1 est l'enzyme majeure de formation du JA-Ile, mais la déficience

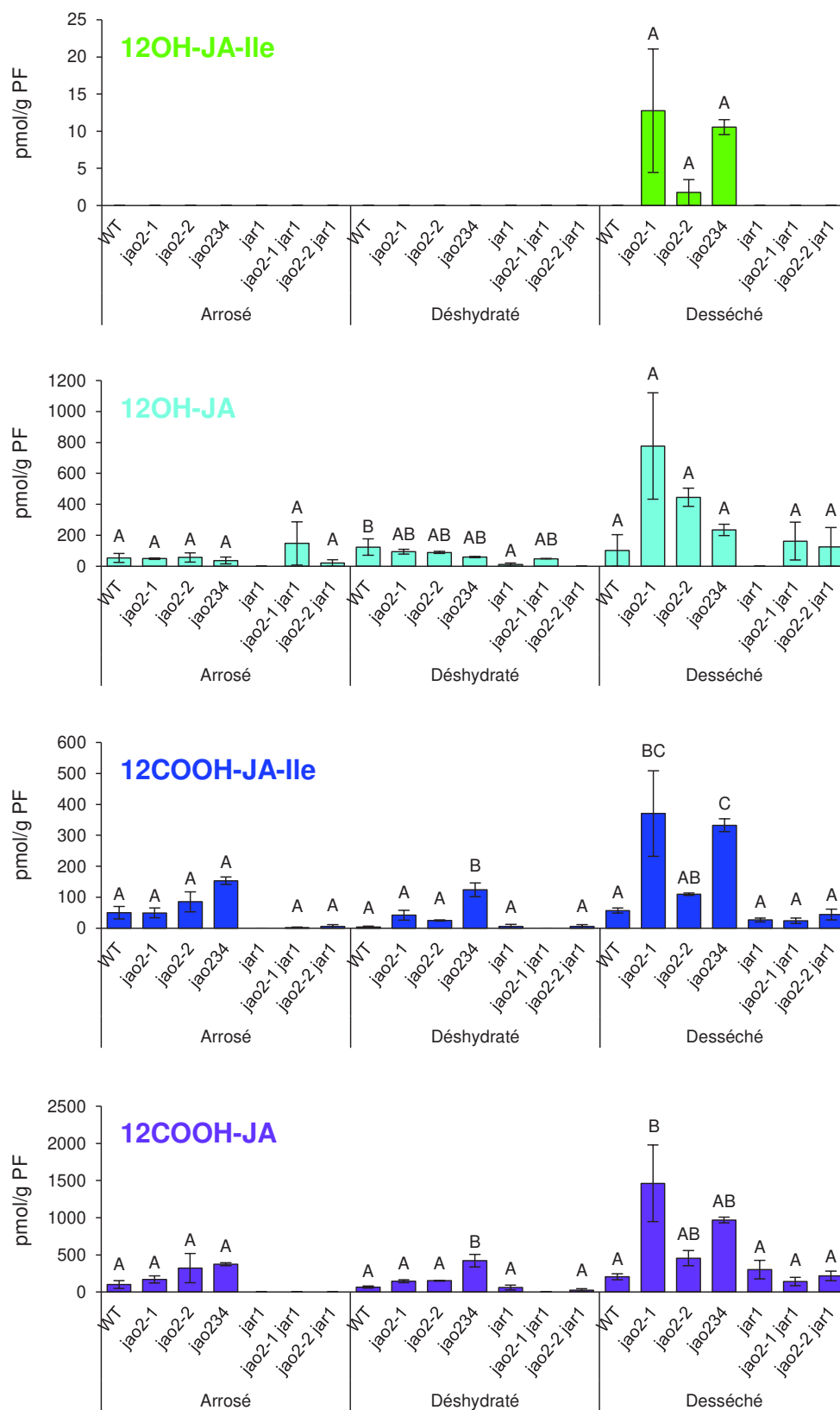


Figure 4.24. Dosage des catabolites des JAs au cours d'un stress hydrique par manque d'eau.

Voir légende de la figure précédente.

jao234 = triple mutant *jao2-1 jao3-1 jao4-2*.

du gène ne cause pas une perte totale de JA-Ile, indiquant qu'une autre enzyme peut catalyser cette conjugaison (Staswick et Tiryaki, 2004). De façon inattendue, à l'exception de *jao234*, l'accumulation de JA-Ile et de JA ne diffère pas entre les mutants simples *jao2* et les doubles *jao2 jar1* (Figure 4.23). Nous n'observons pas de relation quantitative entre les niveaux d'hormones et les taux de survie (Figure 4.23 et 4.19).

Cependant, lorsqu'on analyse les profils d'accumulations des catabolites du JA et du JA-Ile (Figure 4.24), on observe une tendance à une suraccumulation seulement dans les trois mutants *jao* (Figure 4.24). Cette suraccumulation signifie qu'il y a un flux plus important de JA-Ile qui est catabolisé. La tendance à la suraccumulation s'observe dès le stade arrosé pour les deux catabolites carboxy (12COOH-) et est la plus marquée, pour les quatre composés, au stade desséché (Figure 4.24). De plus, le catabolite le plus terminal, le 12COOH-JA, est le composé qui présente la plus forte accumulation (Figure 4.24). La mutation *jao2* renforce dès l'état basal le flux de JA-Ile vers ses catabolites. Chez les conjugués *jao2 jar1*, la perte de tolérance est corrélée avec l'absence d'augmentation de flux catabolique bien qu'il présente une légère suraccumulation de JA-Ile (Figure 4.23 et 4.24).

En conclusion, l'absence de JAO2 dé-réprime des réponses qui permettent une meilleure survie à un stress hydrique sévère (Figure 4.19B). Ces réponses passent par l'activation du flux métabolique du JA-Ile, sont perdues quand on empêche sa synthèse (Figure 4.23 et 4.24) et antagonisent la réponse classique ABA-dépendante, puisque des marqueurs de synthèse et de signalisation de l'ABA sont inversement corrélés à la tolérance (Figure 4.21 et 4.22). De plus, les résultats sur *jao234* montrent un effet additif des mutations (Figure 4.19B, 4.21 et 4.23) suggérant qu'au moins l'une des deux autres JAO aurait une fonction redondante avec JAO2 pour l'atténuation des réponses au stress hydrique. Ce résultat diffère du stress biotique ou JAO2 portait seul la fonction d'atténuation (Smirnova et al., 2017). Les JAO sembleraient avoir un patron d'action spécifique à chacune, dépendant du stimulus.

4. Les JAO peuvent-elles avoir un rôle d'atténuation en réponses à d'autres situations physiologiques ?

Nous venons de démontrer que la signalisation activée par l'absence de JAO2 (et probablement les autres JAO) impacte la réponse au stress hydrique, qui est connu pour être en partie JAs régulée (Ruan et al., 2019). En plus des réponses aux stress, biotiques ou abiotiques, les JAs ont des rôles dans certains processus développementaux, comme la fertilité mâle, la croissance racinaire ou la sénescence par exemple, qui sont largement étudiées et bien documentées (Wasternack et Hause, 2013; Huang et al., 2017). On peut

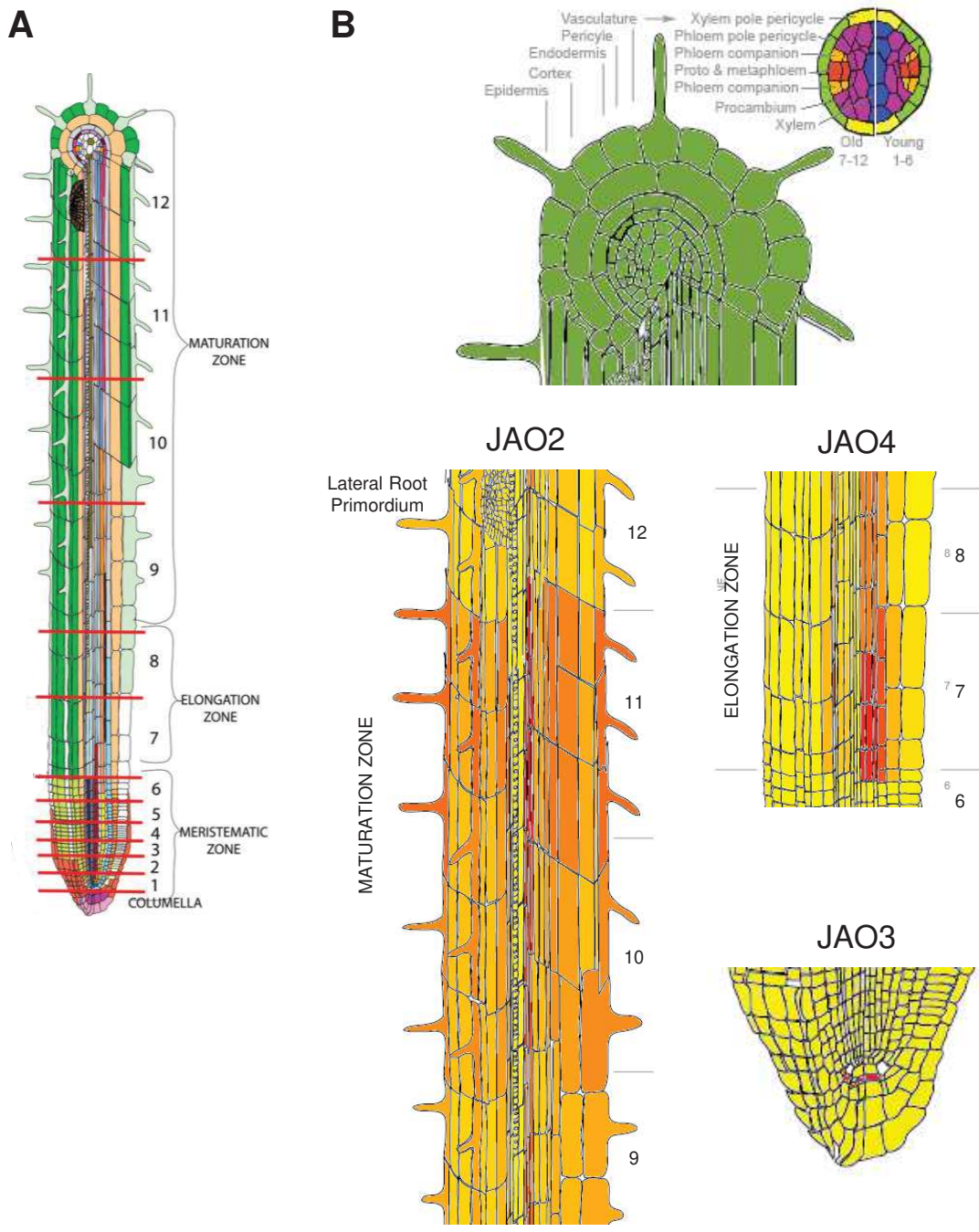


Figure 4.25. Localisation racinaire de l'expression de *JAO2*, *JAO3* et *JAO4* d'après les données d'expressions publiques d'eFP Browser.

A, schématisation des différentes zones racinaires, adapté de Brady *et al.*, 2007.

B, la localisation de l'expression des JAO est issue des données d'expression publique d'eFP Browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> ; At5g05600, At3g55970 et At2g38240 pour *JAO2* *JAO3* et *JAO4* respectivement).

supposer que les JAO atténuent également la signalisation JAs basale de ces processus développementaux JAs régulés.

4.1. Rôle des JAO dans la croissance racinaire

Nous avons choisi pour plusieurs raisons de nous intéresser à l'impact des JAO sur les racines, pour lesquelles les JAs ont un rôle d'inhibition de la croissance (Wasternack et Hause, 2013). Premièrement l'histologie GUS montre que le site majeur d'expression de *JAO2* chez les plantules est dans la racine (Figure 4.11A). Ensuite les données d'expressions publiques du site eFP Browser, corrélient avec l'histologie GUS, et localisent, d'après la représentation des zones et des tissus racinaires (Figure 4.25A) (Brady et al., 2007), l'expression de *JAO2* dans le cortex, l'endoderme et le système vasculaire racinaire de la zone de maturation (ou différenciation) (Figure 4.25B). Troisièmement, le stress hydrique est perçu en premier lieu au niveau des racines. La tolérance de *jao2* à ce stress pourrait venir de l'absence d'atténuation de la signalisation JA-Ile racinaire. Il est montré que le JA-Ile s'accumule dans les racines suite à la perception d'une carence en eau (de Ollas et al., 2015), bien que le rôle exact de cette accumulation ne soit pas encore défini. On peut postuler qu'en absence de la fonction de *JAO2* il y a une accumulation plus importante de JA et de JA-Ile dans les racines, favorisant la tolérance au stress hydrique. Ces trois informations indiquent que *JAO2* devrait avoir une fonction au niveau racinaire. On a également étudié *JAO3* et *JAO4* dans les racines car les données d'expressions eFP Browser montrent que ces deux gènes s'y expriment (Figure 4.25B). *JAO3* est exprimé dans la columelle initiale et *JAO4* dans la zone d'élongation, au niveau de l'endoderme, du péricycle et des tissus vasculaires (Figure 4.25B). Par ailleurs, d'après les expressions absolues données par eFP Browser, *JAO3* est le gène qui à l'expression la plus forte dans les racines (15 169) par rapport à *JAO2* (4 935) et *JAO4* (4 987), qui ont une expression équivalente. Cette dernière information nous permet de supposer que dans les racines les trois JAO et pas uniquement *JAO2* pourraient avoir une fonction d'atténuation des réponses JAs dépendantes. Les JAs inhibent la croissance racinaire, via la répression de la prolifération et de l'élongation cellulaire (Chen et al., 2011; Acosta et al., 2013; Scheres et Krizek, 2018). Il paraît logique que les JAO favoriseraient par leur action l'allongement des racines. Les JAs ont aussi des effets sur le développement des racines latérales, des racines adventives et sur la rhizotaxie (Huang et al., 2017; Lakehal et al., 2020). Les trois JAO présentent une localisation de leur expression dans des régions et des couches cellulaires distincts (Figure 4.25B). Il est envisageable que dans les racines les JAO ont des actions d'atténuations des réponses JAs dépendantes différentes.

Dans un premier temps, j'ai cherché à confirmer les données d'expression publiques en vérifiant que les trois *JAO* s'expriment dans la racine, sur des plantules de 14 jours. Lors de

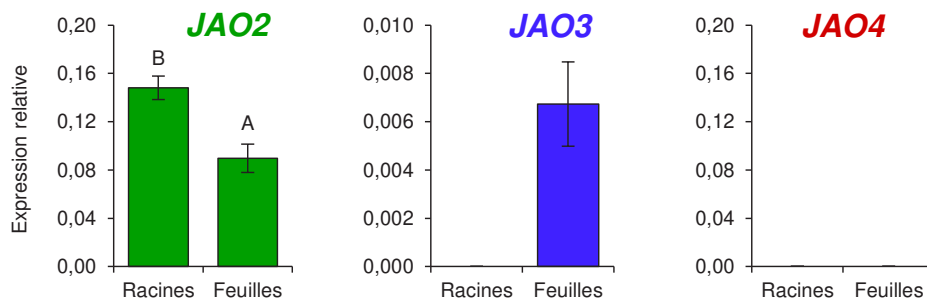


Figure 4.26. Expression des *JAO* dans les parties foliaires et dans les racines.

Expression relative de *JAO2* (en vert), de *JAO3* (en violet) et de *JAO4* (en rouge) de plantules de 14 jours dans les feuilles et dans les racines préalablement séparées. L'expression des gènes a été déterminée par qPCR avec des amorces spécifiques et normalisée par les gènes de références *EXP* et *TIP41*. La quantification des transcrits a été réalisée sur un triplicat biologique analysé en triplicat technique, chaque réplica étant constitué d'un regroupement de sept plantules. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative \pm l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,01$).

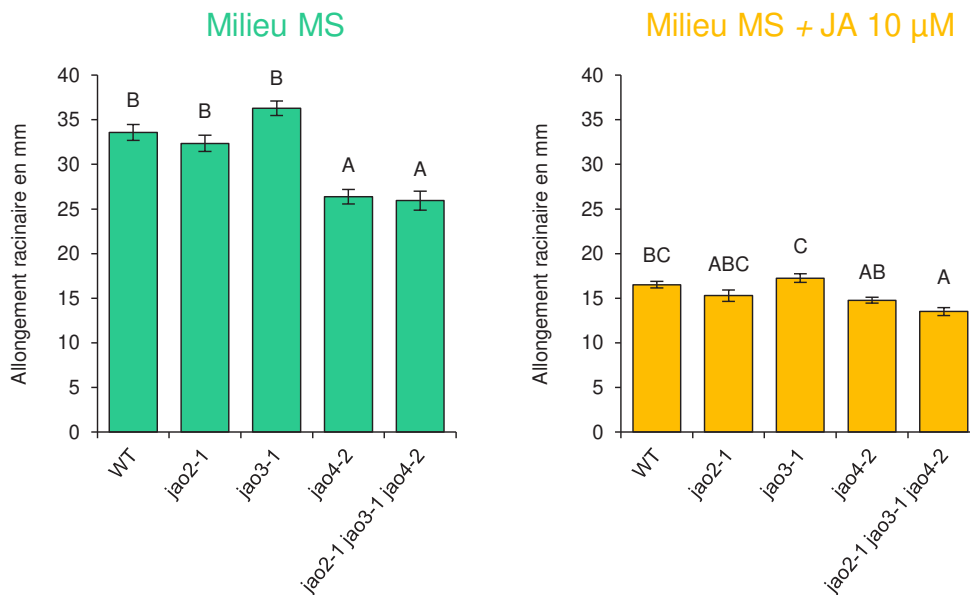


Figure 4.27. Allongement racinaire des mutants *jao* en présence ou non de JA.

Le WT et les quatre génotypes *jao* se développent en culture verticale *in vitro* sur du milieu MS (histogramme de gauche) ou du milieu MS complété avec 10 μ M de JA (histogramme de droite). Lorsque les plantules ont 10 jours, la longueur des racines est mesurée à l'aide du logiciel Image J (<https://imagej.net/Welcome>). Les histogrammes représentent la moyenne en mm de l'allongement racinaire \pm l'écart type d'un quintuplicat constitué de six plantules par génotype par réplica. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,01$).

cette analyse j'ai séparé les racines de la partie foliaire et analysé l'expression dans ces deux organes afin de définir un patron d'expression des *JAO* entre les racines et les feuilles. Le résultat montre que seul *JAO2* s'exprime dans les racines et avec une expression plus forte par rapport aux parties foliaires (Figure 4.26), ce résultat corrèle avec les colorations histologiques GUS (Figure 4.11A et 4.11B). Cependant, les résultats que nous avons publiés démontraient que *JAO4* s'exprime dans les feuilles (Smirnova et al., 2017) alors que dans cette analyse son expression n'est pas détectée (Figure 4.26). L'expérience, et le résultat associé qui montre que *JAO3* et *JAO4* ne s'expriment pas dans les racines, est remise en cause et nécessite d'être refaite pour confirmer ou infirmer l'absence d'expression de *JAO3* et *JAO4* dans les racines.

Selon notre hypothèse, les *JAO* favorisent l'allongement racinaire, en atténuant la signalisation JA-Ile. Une expérience simple à mettre en place pour le tester est de mesurer l'allongement des racines chez les mutants *jao*. Pour ce faire les trois mutants simples et le triple *jao234* sont semés *in vitro* sur du milieu de Murashige et Skoog (**MS**) complémenté ou non avec du JA (10 μ M). L'ajout de JA dans le milieu active la signalisation JA-Ile, par suite de la conjugaison par JAR1, entraînant une réduction de l'allongement racinaire ce qui imite l'effet d'un stimulus induisant la synthèse des JAs. La mesure des racines est effectuée sur des plantules des 10 jours, pour le WT on observe comme attendu que l'ajout de JA dans le milieu réduit la taille des racines (Figure 4.27). En présence de JA, seul *jao234* présente des racines significativement plus courtes par rapport au WT (Figure 4.27). Ce résultat montre que les *JAO* agissent en synergie pour favoriser l'allongement racinaire à la suite de l'accumulation de JA. Pour les plantules cultivées sur MS, le mutant *jao4-2* présente des racines plus courtes, tout comme le triple *jao234* qui a un raccourcissement racinaire similaire (Figure 4.27). Ce résultat démontre que *JAO4* favorise la croissance racinaire et l'absence d'effet additif des mutations chez *jao234* prouve que seul *JAO4* a cet effet biologique sur les racines en absence d'accumulation de JAs. Pour déterminer si le phénotype de *jao4* est JA-Ile dépendant, le test de croissance racinaire sera effectué sur le double mutant *jao4-2 jar1* qui est en cours d'obtention au laboratoire. Nous avons également croisé *jao4-2* avec une lignée exprimant le rapporteur *p35S:JAZ9-VENUS*. Cependant par manque de temps, les populations F2 n'ont pas encore pu être criblées. La construction *JAZ9-VENUS* permet de localiser au microscope la localisation nucléaire de JAZ9 via la fluorescence de VENUS (Larrieu et al., 2015). La signalisation JA-Ile entraîne la dégradation de JAZ9-VENUS et une diminution voir une perte de la fluorescence (Larrieu et al., 2015). On peut prédire que *jao4-2 p35S:JAZ9-VENUS* pourrait avoir un signal plus faible que la lignée *p35S:JAZ9-VENUS* dans la zone de signalisation JA-Ile stimulée par *jao4-2*, ce qui établirait un lien fonctionnel avec le raccourcissement racinaire chez *jao4-2*.

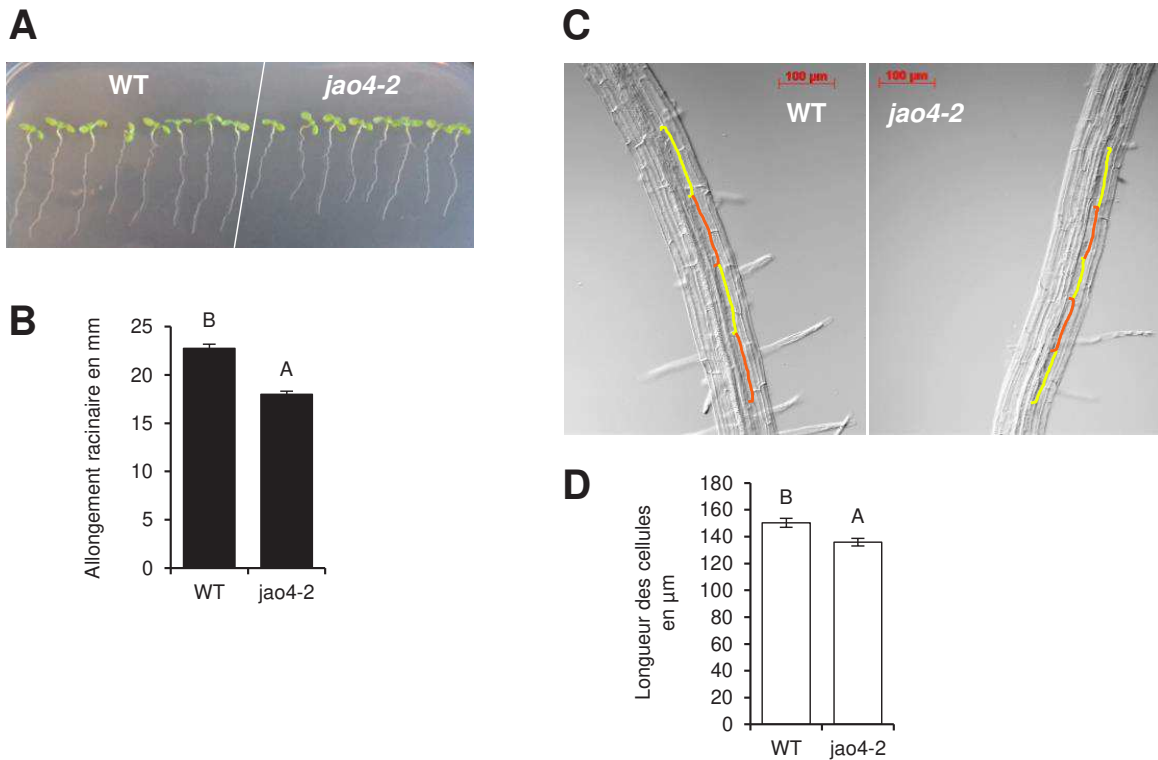


Figure 4.28. Mesure de la taille des cellules racinaire de la zone d'élongation.

A, photo des racines WT et *jao4-2* de plantules de 10 jours en culture verticale *in vitro* sur du milieu MS.

B, la longueur des racines (**A**) est mesurée à l'aide du logiciel Image J (<https://imagej.net/Welcome>). L'histogramme représente la moyenne en mm de l'allongement racinaire \pm l'écart type d'un duplicat constitué de seize plantules par génotype par réplica.

C, photo des racines WT et *jao4-2* (**A**) au niveau de la zone 9 de maturation (Figure 4.20A) prise au microscope optique Zeiss Imager Z1 à un grossissement $\times 200$.

D, mesure de la taille des cellules de la file du cortex, marquées par un trait jaune/orange en **C**, à l'aide du logiciel Image J (<https://imagej.net/Welcome>). L'histogramme représente la moyenne en μm de la taille des cellules \pm l'écart type de 10 racines pour WT et 11 pour *jao4-2* pour un total de 117 et 118 cellules mesurées respectivement.

Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,01$).

Nous avons formulé deux hypothèses qui peuvent expliquer pourquoi *jao4-2* présentant des racines plus courtes (Figure 4.27) : soit le mutant possède moins de cellules, soit ses cellules sont plus courtes. Il est aussi possible que le phénotype soit dû à une combinaison de ces deux facteurs. La signalisation JAs réprime la prolifération et l'élongation cellulaire (Chen et al., 2011; Acosta et al., 2013) et d'après les données eFP Browser, *JAO4* s'exprime dans la zone d'élongation cellulaire (Figure 4.25). Au vu de ces éléments, l'hypothèse que *JAO4* favorise l'allongement cellulaire est la plus probable des deux. Pour le déterminer j'ai réalisé une analyse au microscope optique des racines de *jao4-2* pour mesurer la taille de cellules par rapport au WT (Figure 4.28). Pour des plantules de 10 jours, le mutant présente des racines en moyenne 20 % plus courtes, à raison de 22,74 mm pour WT contre 17,98 mm pour *jao4-2* (Figure 4.28A et 4.28B). Ces racines sont blanchies pour être observées au microscope optique afin de mesurer la longueur des cellules d'une file cellulaire du cortex (Figure 4.28C). Les mesures sont faites au niveau de la zone d'élongation, mais surtout de la partie 9 de la zone de maturation (Figure 4.25A) où les cellules ont atteint leur taille définitive. Plus d'une centaine de cellules ont été mesurées sur une dizaine de racines différentes pour chaque génotype, il en résulte que *jao4-2* a significativement des cellules plus courtes que WT (Figure 4.28D). *JAO4* aurait un rôle sur la croissance des racines en favorisant l'élongation cellulaire. Le mécanisme moléculaire est probablement lié à une atténuation de la signalisation JA-Ile favorisant une meilleure croissance. Pour le démontrer, cette expérience sera répétée avec le double mutant *jao4-2 jar1*, pour voir si le phénotype d'élongation cellulaire racinaire de *jao4* est perdu lorsque la plante est bloquée dans la formation du JA-Ile. Cependant, la différence de longueur des cellules entre les deux génotypes n'est que de 10 % (150 µm pour WT contre 136 pour *jao4-2*) (Figure 4.28D) là où celle sur la longueur totale de la racine est de 20 % (Figure 4.28B). L'impact de *jao4-2* sur l'élongation cellulaire n'explique pas totalement la différence de taille racinaire entre les deux génotypes. *JAO4* doit avoir un autre rôle sur la croissance racinaire et l'hypothèse la plus probable est que l'enzyme intervient également sur la prolifération cellulaire, signifiant que le mutant pourrait avoir moins de cellules.

4.2. Rôle des JAO pour la croissance

Le compromis entre la défense et la croissance chez les plantes est établi depuis longtemps et est basé sur la restriction des ressources, qui demande une priorisation vers l'un ou vers l'autre de ces deux processus en fonction des stimuli internes et externes (Huot et al., 2014). L'équilibre entre les réponses de défenses et les réponses de croissance est majoritairement régulé par les phytohormones (Huot et al., 2014). En ce qui concerne les JAs, nombreux articles montrent qu'effectivement lorsqu'ils induisent des réponses de défenses, c'est couplé à une répression des réponses de croissances de deux façons (Wasternack et Hause,

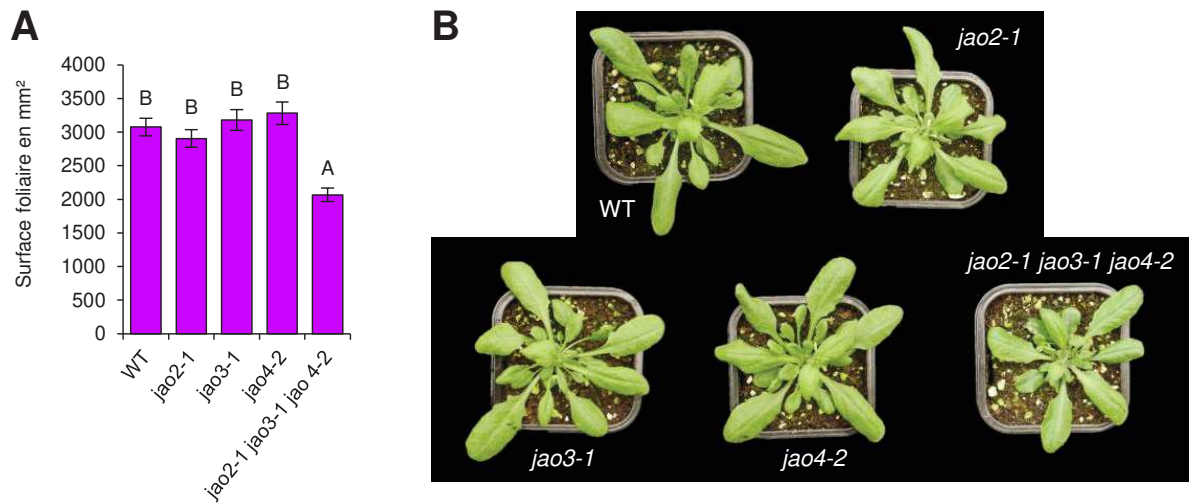


Figure 4.29. Mesure de la surface foliaire des mutants *jao*.

A, la surface foliaire est mesurée à l'aide du logiciel Image J (<https://imagej.net/Welcome>) sur 20 plantes de 5 semaines par génotypes. L'histogramme représente la moyenne en mm² de la surface foliaire ± l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,01$).

B, photos représentatives des rosettes des cinq génotypes mesurées en **A**.

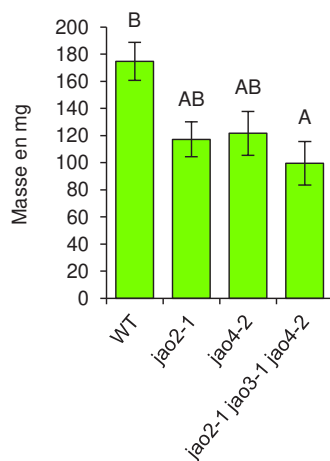


Figure 4.30. Masse totale des graines produites par les mutants *jao*.

La masse de la totalité des graines produites par une plante est pesé, 20 plantes sont mesurée par génotype. L'histogramme représente la moyenne en mg de la masse de graines ± l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,01$).

2013; Huot et al., 2014; Guo et al., 2018a). Premièrement, la caractérisation d'un mutant déficient pour dix des treize *JAZ*, qui présente une signalisation JA-Ile constitutive associée à une résistance accrue aux pathogènes et aux insectes herbivores, montre une allocation élevée des ressources au métabolisme défensif (Guo et al., 2018b). Deuxièmement, l'inhibition de la croissance qui peut être observée chez un quintuple mutant *jaz* (**jazQ**), due à la signalisation JA-Ile constitutive, est perdue lorsque *jazQ* est combiné à une mutation dans le phytochrome B (**phyB**) (Campos et al., 2016). *jazQ phyB* présente une croissance de type WT, les auteurs concluent que l'inhibition de la croissance est due à un réseau transcriptionnel conservé impliquant la perception lumineuse, qui atténue la croissance lorsque la signalisation JAs est activée (Campos et al., 2016). En résumé, les connaissances actuelles permettent de dire que la signalisation JAs inhibe la croissance par des mécanismes de contrôle de FT répresseurs et par une réallocation des ressources vers le métabolisme défensif (Guo et al., 2018a). Un exemple typique, la défense racinaire contre les nématodes nécessite la signalisation JA-Ile, qui réprime dans le même temps les FT PLT qui sont essentiels pour la division et la différenciation des cellules-souches du MAR (Chen et al., 2011; Scheres et Krizek, 2018). Bien que *jao2* présente une signalisation JA-Ile défensive basale constitutive, nous avons démontré que la mutation impacte peu la croissance de la plante (Smirnova et al., 2017). Par ailleurs l'analyse transcriptomique révèle que plusieurs FT surexprimés chez *jao2-1* régulent des processus développementaux (Annexe 3). Par exemple *HOMEODOMAIN PROTEIN 2* (**HB2**) est impliqué dans l'architecture et la croissance de la plante, ce FT active des gènes pour la synthèse et le transport de l'auxine (He et al., 2020). *jao2* induit, à un niveau basal, des réponses de croissance en plus des réponses de défenses.

Avec les analyses sur la résistance au stress hydrique et sur la croissance racinaire, nous avons conclu que les JAO régulent des réponses à ces stimuli, de façon JA-Ile dépendante (bien que ce soit encore à confirmer dans le contexte racinaire). Dans le cas du stress hydrique, nous sommes allés jusqu'à montrer qu'il y a un effet synergique entre les JAO là où pour la racine seul JAO4 a un effet. Ces résultats nous permettent de proposer que les JAO ont chacune un patron d'expression spécifique et pourraient assurer diverses fonctions d'atténuation de signalisation à l'échelle de la plante entière. En raison de cela, on peut se demander si l'addition des mutations chez *jao234* impacterait négativement la croissance. Pour répondre à cette question, nous avons mesuré la surface foliaire de rosettes entières des mutants *jao* simples et du triple à l'aide du logiciel Image J (Figure 4.29). Les trois mutants simples *jao* ont une surface foliaire similaire au WT (Figure 4.29A), ce qui signifie que ces mutations n'ont pas d'impacts sur la croissance de la plante. Cette conclusion corrobore celle sur la masse des rosettes des données publiées (Smirnova et al., 2017). En revanche le triple mutant *jao* montre une surface foliaire plus faible par rapport au WT (Figure 4.29A). L'addition

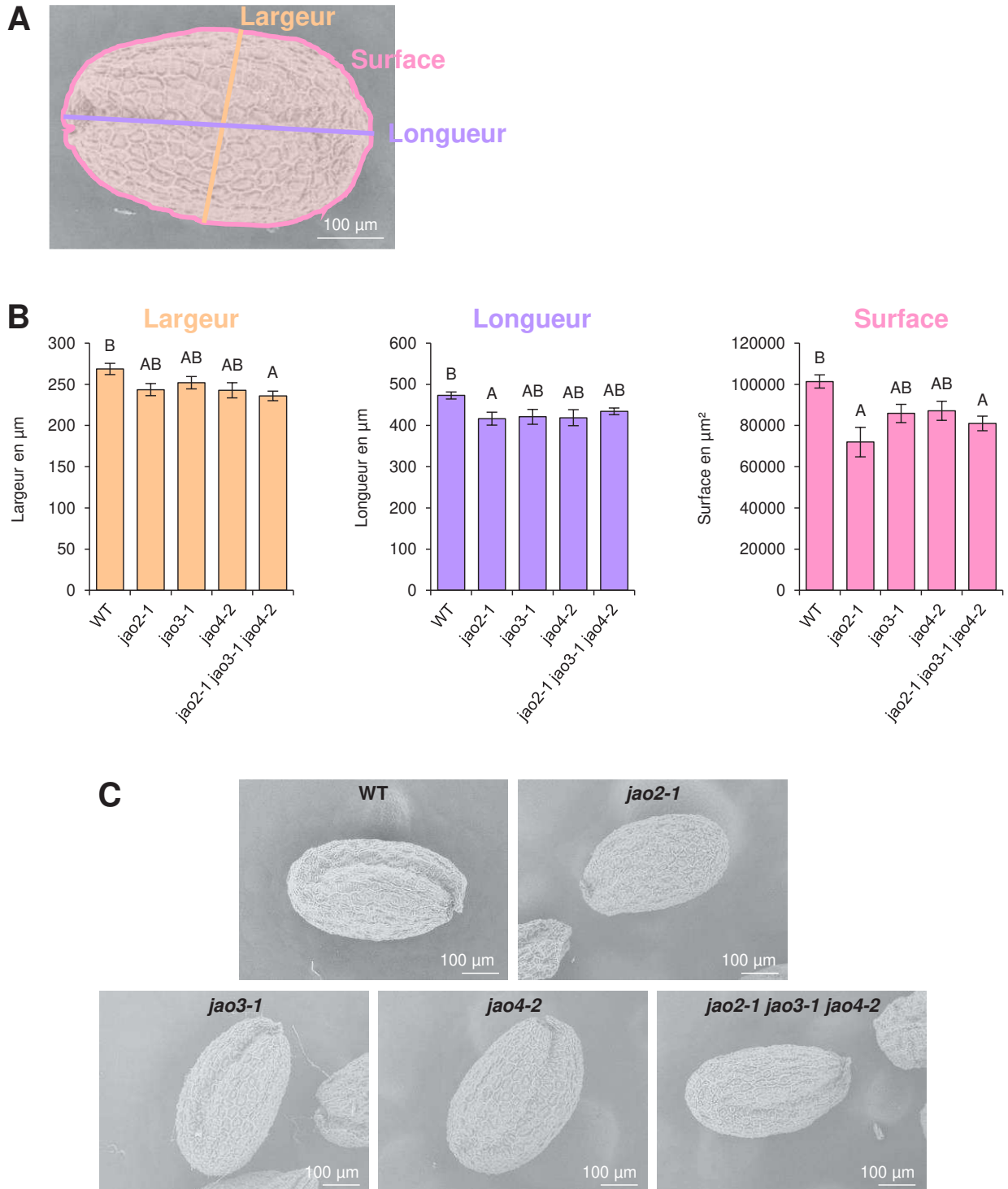


Figure 4.31. Mesure de la taille des graines produites par les mutants *jao*.

A, les paramètres mesurés sont la largeur en µm, la longueur en µm et la surface en µm² de graines.

B, mesure de 10 graines par génotypes à l'aide du logiciel Image J (<https://imagej.net/Welcome>) de leur largeur (histogramme orange), de leur longueur (histogramme violet) et de leur surface (histogramme rouge). Les histogrammes représentent la moyenne ± l'écart type. Les colonnes marquées avec des lettres différentes indiquent une différence significative déterminée par une ANOVA one-way suivit du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

C, photos représentatives des graines des cinq génotypes mesurées en **B**. Les photos des graines sont prise au microscope électronique mini-SEM Hotachi TM-1000.

des mutations à un effet synergique et réprime la croissance optimale de la plante (Figure 4.29B). On peut supposer que JAO3 et, ou, JAO4 atténuent une signalisation basal dans un organe, ou un tissu, qui cause une répression du développement. Cependant, il faut noter que les plantes avaient 5 semaines lors de l'analyse et certaines feuilles en recouvraient d'autres, ce qui masquait une partie de la surface foliaire totale. Les résultats obtenus (Figure 4.29A) correspondent donc à une approximation de la surface foliaire réelle. L'expérience nécessite d'être refaite, sur des plantes plus jeunes où les feuilles se recouvrent moins, pour confirmer le phénotype de *jao234*. Par ailleurs, l'analyse du quadruple mutant *jao/jox* (**joxQ**) révèle qu'il est plus petit que des plantes WT, il présente également des racines plus courtes (Caarls et al., 2017), confirmant que l'addition des mutations *jao* réprime la croissance optimale de la plante.

Un autre impact connu de la répression du développement concomitant à l'activation des défenses est la réduction de la production de graines, une mesure de l'aptitude reproductrice (Van Hulten et al., 2006). L'induction de la signalisation JA-Ile, via un traitement au MeJA, cause chez *Nicotiana attenuata* une diminution du nombre de graines produites (Baldwin, 1998). Comme *jao234* présente une croissance altérée, nous avons voulu déterminer si ce mutant produit moins de graines et comparer au résultat obtenu avec *joxQ* (Caarls et al., 2017). J'ai pesé la masse totale des graines produites par les mutants *jao* simples et triple (Figure 4.30). Par suite d'un incident technique, le génotype *jao3-1* a été perdu et n'a pas pu être mesuré lors de cette étude. Les deux mutants simples *jao2-1* et *jao4-2* ont une masse totale de graines qui ne diffère pas significativement du WT, bien qu'une tendance soit observée vers une réduction de la masse (Figure 4.30). Le mutant triple *jao234* quant à lui à une masse de graines significativement plus faible que le WT (Figure 4.30) tout comme *joxQ* (Caarls et al., 2017). Ce résultat prouve, une nouvelle fois, que l'addition des mutations à un effet synergique sur le développement de la plante et réduit la production de graines.

La question qui a résulté de cette expérience est si la réduction de la masse de graines est due à moins de graines produites ou à des graines plus petites (on peut imaginer que les graines accumulent moins de ressources). Pour définir si les graines sont plus petites, à l'aide d'un microscope électronique j'ai mesuré la taille de dix graines des mutants *jao* selon trois paramètres : la longueur, la largeur et la surface (Figure 4.31A). Pour les trois paramètres, les mutants montrent une tendance à être plus petits que WT, en revanche ce n'est significatif que dans certains cas : *jao2-1* a des graines moins longues et *jao234* quant à lui présente des graines moins large (Figure 4.31B). De plus, ces deux mutants sont les seuls à avoir une surface significativement plus petite que WT (Figure 4.31B). La signalisation activée chez *jao2-1* et chez *jao234* induit une répression du développement des graines. Cependant, *jao2-1* ne montrait pas de différence dans la masse de graines produites par plantes, contrairement à

jao234 (Figure 4.30), malgré tout il a une tendance à une masse plus faible que WT. Répéter ces deux expériences avec un nombre plus important de réplica apportera plus de robustesse aux statistiques et pourrait fournir une corrélation qui n'est pas observée ici pour le génotype *jao2-1*. Nous n'avons pas encore vérifié si la signalisation constitutive *jao* impact le nombre de graines formées. Il est possible que la réduction de la masse de graines, surtout pour *jao234* (Figure 4.30), soit la résultante de graines à la fois plus petites et moins nombreuses.

En conclusion les données sur la croissance et sur l'allongement racinaire démontrent que les JAO ont un impact sur différentes situations physiologiques développementales. Les données de transcriptomiques le montrent également comme chez *jao2* plusieurs FT impliqués dans des processus développementaux sont surexprimés (Annexe 3). Mais surtout, il apparaît que selon la situation physiologique une JAO peut avoir seule une fonction, ou qu'il y a une action synergique entre les enzymes.

5. Quelle est la structure exacte du produit d'oxydation de JAO ?

Nous l'avons démontré et publié, les JAO forment toutes les trois de l'OH-JA à partir du substrat JA (Smirnova et al., 2017), mais quelle forme d'OH-JA produisent-elles ? Les plantes produisent du 12OH-JA mais aussi l'isomère de position 11OH-JA (Figure 1.9) (Miersch et al., 2008). Comme le 12OH-JA représente la forme majoritaire des plantes, nous avons supposé que les JAO produisent cette forme. Cependant, certaines 2-ODD sont capables de former plusieurs produits différents à partir d'un même substrat, différent notamment par la position d'hydroxylation (Hutton et al., 1967; Farrow et Facchini, 2014; Martinez et Hausinger, 2015). Or aucune voie de formation enzymatique de 11OH-JA n'a été décrite (Figure 1.9) (Miersch et al., 2008). Les JAOs sont de bonnes candidates pour la formation du 11OH-JA, et/ou du 12OH-JA. Les deux isomères d'OH-JA ne sont pas distingués par les techniques d'analyses UHPLC-MS/MS utilisées en routine, car ils partagent le même temps de rétention et le même spectre de masse. Une étude structurale plus détaillée est donc nécessaire pour discriminer quel est, ou quels sont, les produits d'oxydations des JAO. La caractérisation du produit est une première étape pour comprendre s'il est un simple catabolite formé lors du processus d'atténuation des réponses (Smirnova et al., 2017) ou s'il présente un rôle biologique pour la plante. Le 12OH-JA intervient, par exemple, pour la tubérisation chez les plantes à tubercules, mais aucun rôle n'est actuellement connu chez *Arabidopsis* (Yoshihara et al., 1989).

La discrimination de deux isomères de position d'hydroxylation peut être faite par exemple par résonance magnétique nucléaire (RMN) qui fournit une caractérisation structurale des noyaux atomiques composants les molécules. L'analyse RMN est effectuée par notre collaboratrice,

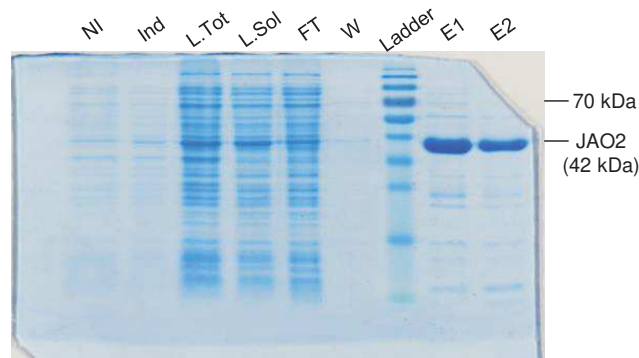


Figure 4.32. Contrôle sur gel SDS-Page de la purification protéique de JAO2.

La bande correspondant à JAO2 est attendue à 42 kDa. Les contrôles non-induit (NI) et induit (Ind) permettent de vérifier l'induction de la synthèse bactérienne de la protéine JAO2. Le lysat total (L.Tot) et le lysat soluble (L.Sol) permettent de contrôler que la protéine n'est pas perdue ou détruite au cours de la lyse bactérienne. La protéine JAO2 soluble est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité et les contrôles *flow through* (FT), *wash* (W) et les éluions (E) révèlent l'efficacité de la purification.

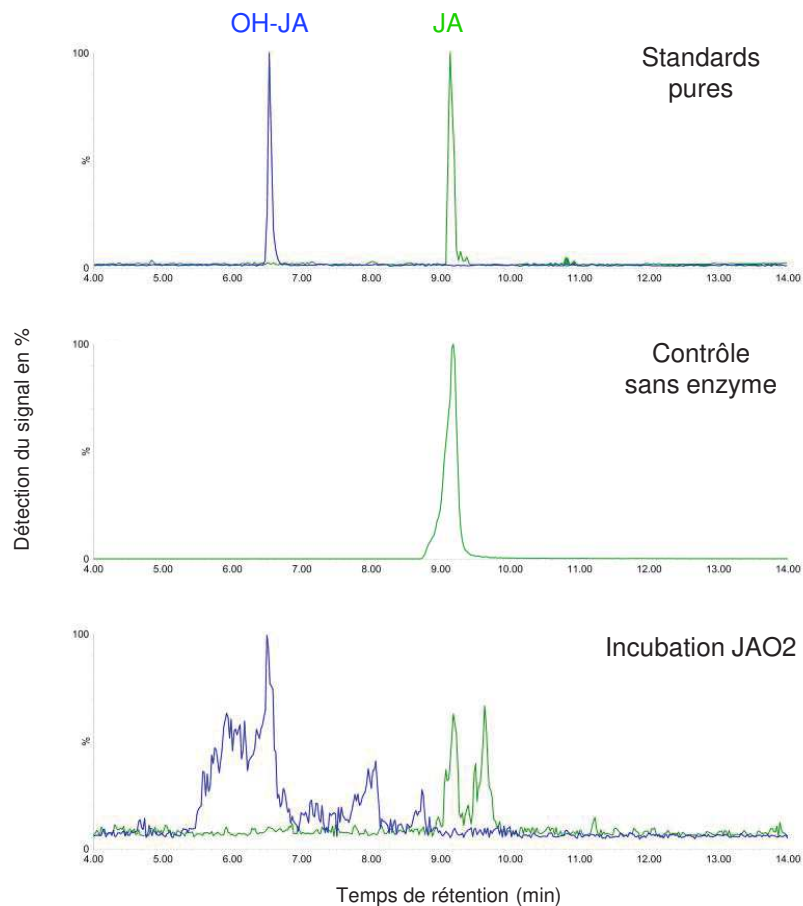


Figure 4.33. Contrôle de l'activité enzymatique de JAO2 par UHPLC-MS/MS.

L'intensité des pics est relativisée en pourcentage, par rapport au pic le plus haut du chromatogramme. Le chromatogramme du haut est issu de l'analyse des standards pures, il indique les temps de rétentions du substrat JA (en vert) et du produit attendu OH-JA (en bleu). Le chromatogramme du milieu est issu de l'analyse de l'incubation sans enzyme. Le chromatogramme du bas représente l'analyse des produits de réactions du regroupement des 30 incubations enzymatiques JAO2 de 500 μ L. Les produits sont identifiés selon leur temps de rétention et la détection des transitions de fragmentation (MRM pour *multiple reaction monitoring*), m/z 209>59 pour le JA et m/z 225>59 pour l'OH-JA.

le Dr. Laurence Miesch, et son équipe (laboratoire de chimie « synthèse organique et phytochimie », UMR 7177, Strasbourg). Pendant la durée de son stage de master 2, nous avons réalisé avec Pauline Delcros un essai préliminaire de production du produit des JAO pour faire une analyse RMN, à partir du clone d'expression bactérienne *pHGWA:JAO2-6xhis* réalisé par le Dr. E. Smirnova. À partir d'une souche d'*Escherichia coli* transformée, nous avons induit la synthèse de JAO2 dans les bactéries avant de lyser celles-ci. L'enzyme a ensuite été purifiée par Laurence Herrgott à la plateforme Production et Purification des Protéines (**P3P**) de l'IBMP par chromatographie d'affinité de type cation métallique-chélat (**IMAC** pour *immobilized metal affinity chromatography*). Le contrôle sur gel SDS-PAGE montre que les deux éluions récupérées après la purification sont fortement enrichies en protéine JAO2 par rapport aux lysats (Figure 4.32). Nous avons ensuite regroupé les deux éluions pour mesurer par dosage Bradford la concentration de protéines purifiées, qui est de 1,08 µg/µL. Avec le volume total nous avons réalisé 30 réactions enzymatiques de 500 µL où 50 µg d'enzyme purifiée est incubée avec 100 µM de substrat JA, plus deux réactions sans enzymes qui servent de contrôle négatif. À la fin de l'incubation nous avons regroupé les 30 réactions, précipités les protéines et extraits les produits pour faire une analyse par UPLC-MS/MS. Le but est de vérifier que l'enzyme est active, qu'il y a eu une consommation du substrat et une apparition du produit dans les incubations. Les chromatogrammes obtenus montrent pour l'incubation contrôle sans enzyme aucun pic correspondant au produit OH-JA et une intensité maximale du pic du substrat JA (Figure 4.33). Pour l'incubation enzymatique JAO2, l'intensité du pic correspondant au JA est fortement réduite et un pic correspondant au produit OH-JA apparaît (Figure 4.33). Cette analyse a été effectuée avec un ancien instrument UPLC-MS/MS, dont la sensibilité réduite procure un signal médiocre. Malgré une détection faible du pic du produit, la chute d'intensité du pic du substrat montre une consommation de celui-ci, l'enzyme est active.

L'analyse RMN demande en général une quantité confortable de 1 mg du produit à analyser. Des 30 incubations de 500 µL à 100 µM de JA nous avons une quantité totale de 0,31 mg de substrat, ce qui ne prend pas en compte le taux de conversion du substrat en produit ni les pertes liées aux manipulations. La quantité réelle de produit est certainement inférieure à 0,31 mg. Un essai d'analyse RMN a été effectué par Laurence Miesch sur cet échantillon. L'analyse RMN a été effectuée sur les spins des noyaux atomiques ¹H et ¹³C et les chromatogrammes qui en résultent représentent le spectre des produits d'oxydation (Figure 4.34). Le spectre de l'incubation JAO2 est comparé au spectre des standards purs JA et 12OH-JA, nous ne disposons pas du standard pur 11OH-JA. Les signaux détectés issus des produits d'extractions sont faibles, toutefois le spectre issu de l'incubation avec JAO2 montre clairement que ni le

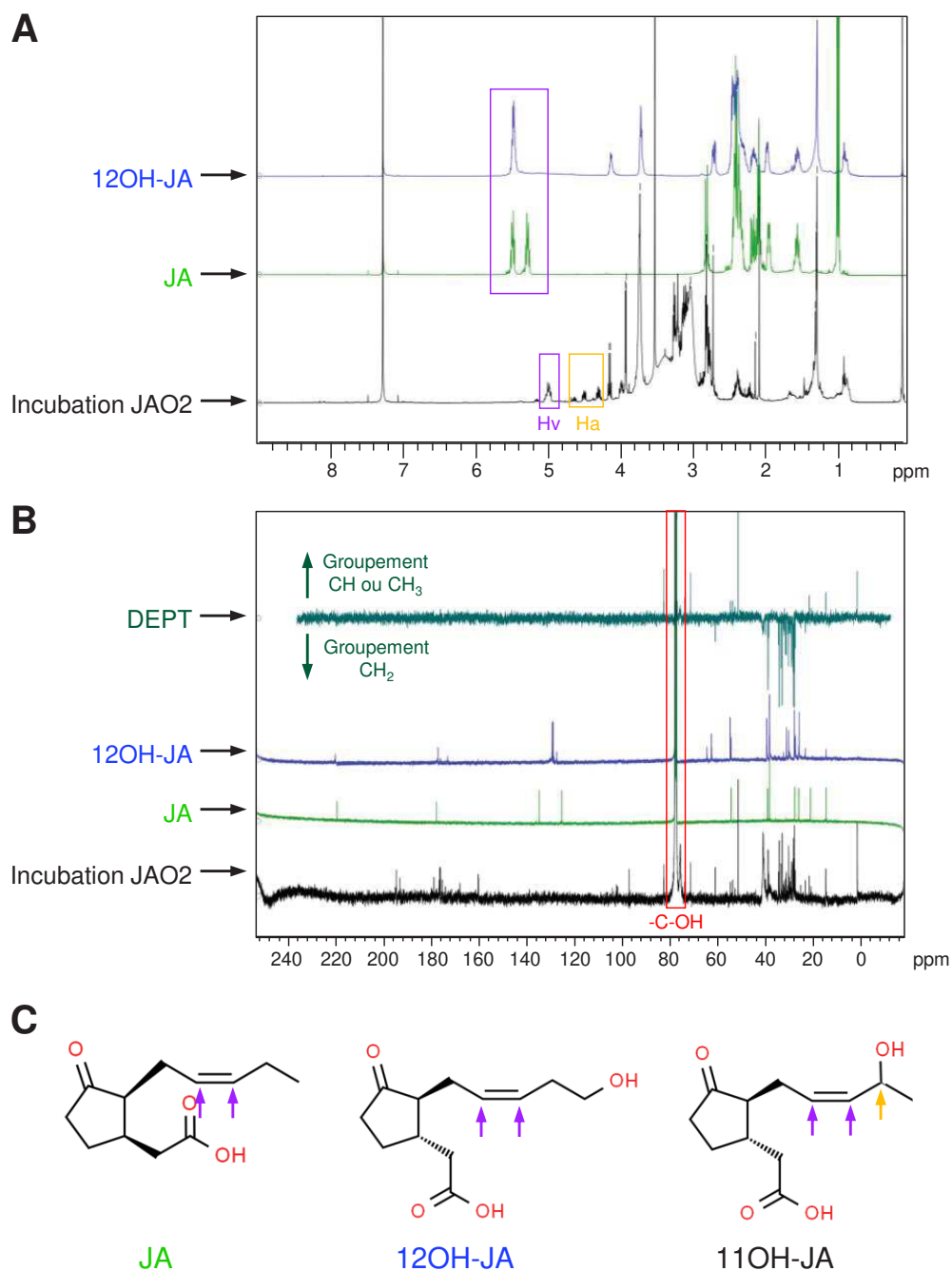


Figure 4.34. Analyse des produits d'oxydation de JAO2 par RMN.

Spectre RMN des spin des noyaux atomiques ^1H (A) et ^{13}C (B) des standards purs JA (en vert) et 12OH-JA (en bleu) ainsi que des produits de l'incubation enzymatique JAO2. L'incubation enzymatique est séchée après extractions des produits, qui sont repris dans du chloroforme deutéré pour l'analyse RMN. Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm). L'ordre des carbones est confirmé par une séquence DEPT (*distortionless enhanced polarization transfer*).

C, schéma moléculaires du substrat JA et des produits potentiels 12OH-JA et 11OH-JA. Les flèches violettes représentent la position des protons vinyliques (Hv) détectés en A. La flèche orange indique la position du proton allylique (Ha) détecté au sein du signal ddd (doublet de doublet de doublet) et celle du carbone portant la fonction hydroxyle détecté en A.

substrat JA ni le produit potentiel 12OH-JA ne sont présents (Figure 4.34A et 4.34B). Le 12OH-JA ne semble donc pas du tout formé par JAO2.

Plusieurs signaux protoniques caractéristiques indiqueraient la présence d'un composé qui peut correspondre au 11OH-JA (Figure 4.34A). En effet, le pic détecté à 5 ppm (parties par million) correspond à l'intégration de deux protons vinyliques (**Hv**) (Figure 4.34A), c'est-à-dire des protons liés à deux carbones reliés entre eux par une double liaison, qui peuvent correspondre à ceux présents chez le 11OH-JA (Figure 4.34C). De plus, le doublet de doublet de doublet (**ddd**) détecté vers 4,5 ppm (Figure 4.34A), avec trois constantes de couplages de respectivement 10,5 ; 9,6 et 4,5 hertz (dont ces valeurs représentent des nombres caractéristiques de l'intensité d'une interaction), représente un proton allylique (**Ha**) (lié à un groupe fonctionnel alcénique $H_2C=CH-CH_2-$) qui pourrait également correspondre à celui du 11OH-JA. Le spectre obtenu par l'analyse du spin du noyau atomique ^{13}C corrobore ces résultats, le pic observé à 75 ppm correspond, d'après le DEPT, à un groupement CH ou CH_3 (Figure 4.34B). Or ce pic représente le carbone qui porte le groupement hydroxyle OH, donc il ne peut être qu'un CH. Si le groupement hydroxyle était porté par le carbone terminal, celui-ci serait un CH_2 et le pic DEPT correspondant aurait dû pointer vers le bas et non vers le haut (Figure 4.34B). Ces données renforcent la présomption que le produit détecté correspond à du 11OH-JA.

Pour confirmer ce résultat préliminaire, l'expérience devra être refaite. Premièrement, le standard pure 11OH-JA est nécessaire pour l'analyse RMN, pour confronter avec les signaux du spectre de l'incubation JAO2 et affirmer de façon sûr si le produit détecté correspond au 11OH-JA. L'obtention de cette référence et actuellement en cours par synthèse chimique par notre collaboratrice Laurence Miesch et il devrait être bientôt disponible. Deuxièmement, il faudra une quantité de produits plus importante (plus de 0,3 mg) pour que les signaux mesurés en RMN soient propres et sûrs. Nous devons donc réaliser une incubation enzymatique à grande échelle, avec un volume plus important de réaction, une concentration plus forte de substrat JA et plus d'enzyme purifiée, afin de maximiser le taux de conversion et la quantité de produits synthétisée. Transposer le protocole de la petite échelle de 500 μ L utilisée pour l'essai préliminaire à une grande échelle de plusieurs dizaines de millilitres a nécessité de nombreuses optimisations et plusieurs tentatives, infructueuses, avant que la réaction ne soit fonctionnelle.

En fin de thèse, j'ai réalisé un dernier essai au cours duquel j'ai utilisé également un vecteur pHGWA contenant la séquence de la *green fluorescent protein* (**GFP**) pour servir de contrôle négatif à l'incubation enzymatique. Après l'induction de leur expression dans les bactéries et la lyse bactérienne, les protéines JAO2 et GFP ont été purifiées par IMAC à la plateforme P3P

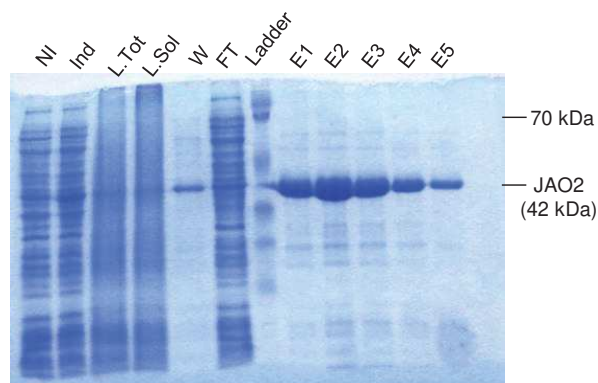


Figure 4.35. Contrôle sur gel SDS-Page de la purification protéique à grand échelle de JAO2.

La bande correspondant à JAO2 est attendue à 42 kDa. Les contrôles non-induit (NI) et induit (Ind) permettent de vérifier l'induction de la synthèse bactérienne de la protéine JAO2. Le lysat total (L.Tot) et le lysat soluble (L.Sol) permettent de contrôler que la protéine n'est pas perdue ou détruite au cours de la lyse bactérienne. La protéine JAO2 soluble est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité et les contrôles *flow through* (FT), *wash* (W) et les éluions (E) révèlent l'efficacité de la purification.

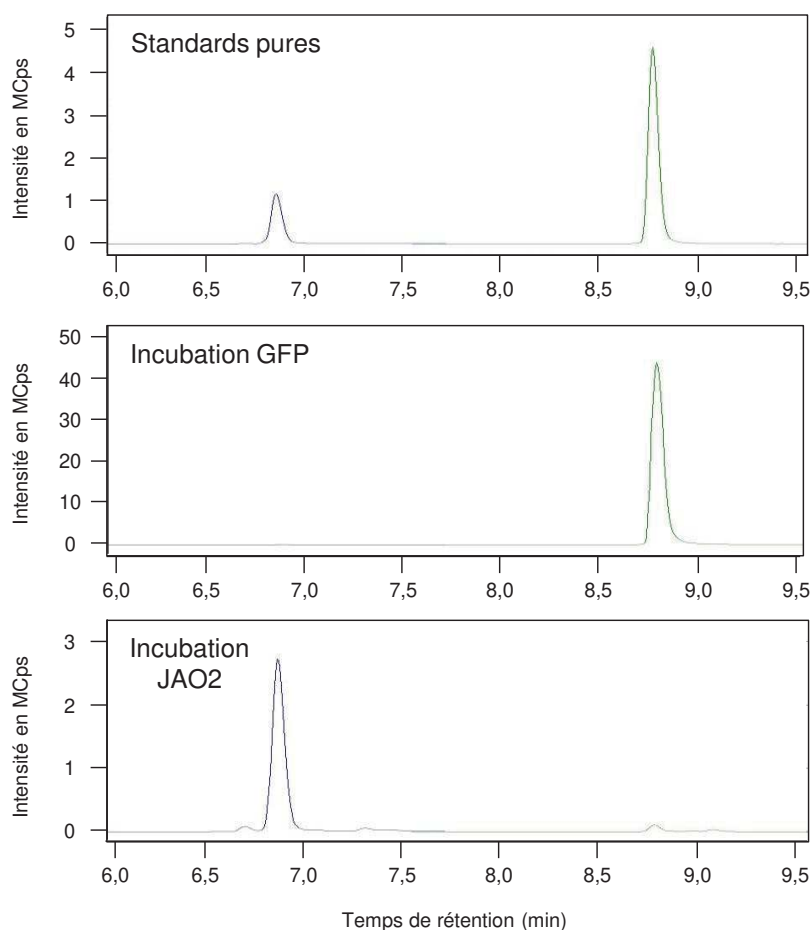


Figure 4.36. Contrôle de l'activité enzymatique à grande échelle de JAO2 par UHPLC-MS/MS.

Le chromatogramme du haut est issu de l'analyse des standards purses, il indique les temps de rétentions du substrat JA (en vert) et du produit attendu OH-JA (en bleu). Le chromatogramme du milieu est issu de l'analyse de l'incubation avec la GFP. Le chromatogramme du bas représente l'analyse des produits de réactions du regroupement des deux incubations enzymatiques JAO2 de 20 mL. Les produits sont identifiés selon leur temps de rétention, en abscisse, et la détection des transitions de fragmentation (MRM pour *multiple reaction monitoring*), m/z 209>59 pour le JA et m/z 225>59 pour l'OH-JA. L'intensité du pic est exprimée en MCps (méga coup par seconde).

par l'ingénieur de recherche Nicolas Baumberger. Cinq éluions ont été récupérées après la purification de JAO2 et l'analyse sur gel SDS-PAGE montre qu'elles sont toutes fortement enrichies avec la protéine (Figure 4.35). Étonnamment, les contrôles lysats, total et clarifié, forment des *smear* attestant que les protéines sont dégradées (Figure 4.35). Comme le *flow through* issu du passage du lysat sur l'IMAC ne forme pas un *smear*, la dégradation des contrôles lysats a dû être causée après la purification. Dans le contrôle *wash* on constate qu'il y a encore une bande intense correspondant à la protéine JAO2 (Figure 4.35), signifiant qu'un passage supplémentaire du *flow through* sur la colonne aurait pu fournir encore plus d'enzyme purifiée. Les cinq éluions de JAO2 purifiée sont regroupées et la concentration, ainsi que celle de la GFP, sont mesurées par dosage Bradford, indiquant des concentrations de 1,81 et 1,12 µg/µL respectivement. On obtient près du double de concentration en protéine JAO2 par rapport au test préliminaire, et ce, pour un volume 2,5 fois plus grand. Nous avons réalisé trois incubations enzymatiques de 20 mL, deux avec la protéine JAO2 et une avec le contrôle GFP, à raison de 1,5 mg de protéine par réaction. Chacune est faite avec 200 µM de substrat JA, signifiant que pour les 40 mL de réaction JAO2 on a 1,68 mg de substrat. En tenant compte des pertes liées à la manipulation et si l'enzyme est active et convertit la quasi-totalité du substrat comme dans l'essai préliminaire, on peut espérer arriver à une quantité proche de 1 mg de produit final, ce qui correspond à la quantité requise pour une analyse RMN claire et sûre. À la fin de l'incubation, les protéines ont été éliminées par précipitation à l'acétone, le surnageant a été extrait et une aliquote a été analysée par UHPLC-MS/MS. Comme pour le test préliminaire, cet essai à grande échelle est concluant et confirme que l'enzyme est active. En effet, la réaction enzymatique avec JAO2 révèle une consommation quasi-totale du substrat, donc l'enzyme est active, et une apparition du pic du produit OH-JA (Figure 4.36). Pour le chromatogramme de l'incubation avec GFP on observe un pic important pour le substrat JA et aucun pour le produit OH-JA (Figure 4.36), sans enzyme le substrat n'est pas consommé. Lorsque la synthèse chimique du standard pure 11OH-JA sera terminée, nous pourrons envoyer nos échantillons en vue d'une analyse structurale par RMN.

En conclusion, l'analyse préliminaire à petite échelle suggère que le produit enzymatique de JAO2 est différent du 12OH-JA synthétique et plusieurs indices de l'analyse RMN supposent qu'il pourrait s'agir du 11OH-JA. L'optimisation du protocole pour une réaction à grande échelle est fonctionnelle et permet de fournir assez du produit de la réaction enzymatique pour obtenir un spectre RMN propre. L'obtention en cours du standard 11OH-JA permettra la confrontation des spectres RMN et devrait permettre l'élucidation structurale de cette étape importante du métabolisme des JAs.

6. Discussion

6.1. Le mécanisme d'atténuation de JAO2 est un régulateur majeur de la signalisation JAs basale

La perception d'un stress entraîne la synthèse et l'accumulation d'hormone JA-Ile, et l'amplitude des réponses est généralement proportionnelle à l'augmentation de cette synthèse (Heitz et al., 2019). Il est souvent admis que le niveau basal d'hormone n'a pas de rôle fonctionnel et est synonyme de réponse éteinte. La mise en évidence d'une biosynthèse de JAs, dont le JA-Ile, en absence de stimulation (détaillé dans la [partie 4.1.1.1 de l'introduction](#)), est compatible avec l'existence d'une signalisation JA-Ile dépendante basale (Yang et al., 2007; Hyun et al., 2008; Miersch et al., 2008; Suza et Staswick, 2008; Rodríguez et al., 2010; Qiu et al., 2012; Gan et al., 2014). Plusieurs mécanismes ont été identifiés pour réguler la synthèse basale des JAs au niveau des précurseurs (Yang et al., 2007; Lenglet et al., 2017). Ce chapitre vient de montrer l'importance de la gestion du JA basal dans le contrôle des réponses JA-Ile dépendantes et révèle un nouveau niveau de régulation à l'échelle de la plante entière.

En effet, nous avons en premier lieu découvert et décrit le mécanisme de JAO2 d'atténuation de la signalisation basale JA-Ile par consommation du JA en réponse à un stress biotique de type pathogène nécrotrophe (Smirnova et al., 2017). Cette conclusion est renforcée par les analyses de transcriptomique et de métabolomiques qui montrent que de nombreux gènes de réponses aux nécrotrophes ont leur expression atténuée et plusieurs métabolites antifongiques leur accumulation réprimée par JAO2 chez les plantes WT ([Annexe 2B et Annexe 4](#)). La caractérisation de JAO2 élargie à la plante entière a apporté la preuve que l'enzyme atténue également la tolérance au stress abiotique de type hydrique de façon JA-Ile dépendante ([Figure 4.19B, 4.23 et 4.24](#)) et probablement ABA indépendante ([Figure 4.21 et 4.22](#)). Cependant l'analyse d'un mutant *jao2* également déficient dans la synthèse de l'ABA est nécessaire pour confirmer que le phénotype de tolérance est indépendant de l'ABA.

Pour l'instant nous disposons essentiellement d'une information au niveau phénotypique : *jao2* et *jao234* sont plus tolérants, mais nous ignorons quel processus physiologique impacté par *jao2* permet cette tolérance. Le stress hydrique est caractérisé pour avoir un impact sur la plante entière, il est détecté au niveau des racines mais entraîne de nombreuses adaptations : le développement de l'appareil racinaire, la fermeture des stomates, la production d'osmoprotecteurs, la synthèse d'enzyme de détoxification des ROS... (Basu et al., 2016). Le rôle de JAO2 pourrait avoir lieu au niveau de l'un ou de plusieurs de ces mécanismes de résistance. Par exemple, chez la tomate un traitement au MeJA induit l'expression d'enzymes

impliquées dans la détoxification des ROS (Zhu et Tian, 2012). Il serait intéressant de quantifier la teneur en ROS des différents génotypes au cours du stress hydriques. Les JAs répriment la croissance des racines (Wasternack et Hause, 2013) et bien que *jao2* ne présente pas un phénotype racinaire sur des plantules (Figure 4.27), l'absence d'atténuation de la signalisation réprimerait probablement le développement racinaire et rendrait la plante plus sensible au stress hydrique. On peut donc supposer que l'impact physiologique de JAO2 en réponse au stress hydrique n'est pas situé dans l'appareil racinaire.

Parmi les osmoprotecteur, nos premier résultats indiquent que la synthèse de la proline n'est pas altérée par la mutation *jao2* (Figure 4.21) et ne serait pas à l'origine de la tolérance au stress des mutants. Cependant, il faudrait déterminer l'accumulation de la proline pour le confirmer. De plus, nous n'avons pas évalué l'impact de la mutation sur l'accumulation d'autres osmoprotecteurs des plantes. Une étude récente a montré qu'un traitement au JA ou au MeJA induit l'accumulation d'osmoprotecteurs, dont la proline, mais de façon dépendante de la variété végétale et de la dose de JAs utilisés (Sirhindi et al., 2018). Cependant, la synthèse de proline peut aussi être réprimée par les JAs de façon MYC2 dépendante en réponse au stress salin (Verma et al., 2020). La mutation *jao2* entraîne une signalisation basale mais pas une suraccumulation de JA ou de JA-Ile conséquente, à l'exception de *jao234* (Figure 4.23 et 4.24) (Smirnova et al., 2017). Il est possible que le flux de JA redirigé vers le JA-Ile chez *jao2* ne permet une accumulation suffisante de JA-Ile pour entraîner la synthèse d'osmoprotecteurs. En définitive, on ne peut pas encore conclure si JAO2 a un impact sur l'accumulation des osmoprotecteurs, le dosage de plusieurs de ces composés durant le stress hydrique est nécessaire pour le définir.

On peut ensuite supposer que l'action de JAO2 peut influencer sur la fermeture des stomates, ce qui modulerait la déperdition d'eau. Les JAs induisent la fermeture des stomates de façon COI1 dépendante mais ABA indépendante, par le même mécanisme que celui ABA dépendant (Munemasa et al., 2007; Riemann et al., 2015), détaillé dans la partie 3.2 de l'introduction. De plus, un mutant qui ne peut plus produire de JA-Ile présente un taux de fermeture des stomates plus faible (Suhita et al., 2004). JAO2 pourrait atténuer une signalisation qui induit la fermeture stomatique, signifiant dans ce cas que *jao2* pourrait avoir un taux de fermeture des stomates plus important. Cet effet permettrait un évitement du stress hydrique par une évapotranspiration et une déperdition en eau plus faible, pouvant résulter en la meilleure tolérance observée (Figure 4.19B). Pour le confirmer, il faudra vérifier le taux d'ouverture des stomates chez le mutant *jao2* par rapport au WT, avant et pendant le stress hydrique, tout en cherchant à définir la déperdition d'eau pour tenter d'obtenir une corrélation physiologique.

Une dernière possibilité d'action physiologique de JAO2 sur la tolérance à la déshydratation concerne la synthèse des anthocyanes. Nous avons montré que *jao2* suraccumule les anthocyanes (Smirnova et al., 2017), dont la synthèse dépend de PAP1 qui est surexprimé en absence de stimulus chez *jao2* (Annexe 3) (Shan et al., 2009). En cas de stress hydrique, il est démontré qu'*Arabidopsis* suraccumule les anthocyanes pour maintenir une meilleure protection antioxydante des photosystèmes afin d'optimiser la captation de la lumière et l'utilisation d'énergie pendant le stress (Sperdoui et Moustakas, 2012). Du fait que *jao2* présente une suraccumulation d'anthocyane avant le stress, on peut supposer que les photosystèmes sont mieux protégés dès la perception du stress, permettant une meilleure optimisation de l'énergie pour la production des mécanismes de résistance à la déshydratation. Nous pourrions le vérifier en testant l'efficacité des photosystème avant et pendant le stress hydrique par mesure de la fluorescence de la chlorophylle a en lumière modulée par exemple.

Du fait que le flux de JA-Ile chez les mutants *jao* est plus fort en fin de stress par rapport au début (Figure 4.23 et 4.24), il est même possible que l'impact de *jao2* s'amplifie au cours du stress et ne soit pas qu'au niveau basale comme nous l'avons démontré en réponse à un nécrotrophe (Smirnova et al., 2017). Pour résumer, JAO2 régule une signalisation JA-Ile impliquée dans la résistance au stress hydrique, l'impact de l'enzyme semble apparaître à l'état basal, comme chez *jao2* plusieurs gènes impliqués dans la tolérance à la déshydratation sont surexprimés sans stimulus (Annexe 3), mais pourrait s'amplifier durant le stress. Lorsque les processus physiologiques qui confère la tolérance chez *jao2* seront identifier, il faudra déterminer quelles sont les cibles moléculaires impliquées.

Le mécanisme de détournement métabolique de JAO2 apparaît comme un régulateur de la signalisation JAs basale avec un impact, par atténuation, modéré sur celle-ci. Néanmoins son action résulte en un impact phénotypique fort en réponses à des stress biotiques et abiotiques, dont les résistances sont JAs dépendantes. La régulation de la synthèse et de l'accumulation basale du JA est nécessaire dans les plantes pour réprimer la signalisation JAs basale (Yang et al., 2007; Lenglet et al., 2017; Smirnova et al., 2017). Parmi les quelques mécanismes connus qui sont impliqués, uniquement la dérégulation du mécanisme impliquant JAO2 entraîne des réponses phénotypiques fortes et multiples, en réponse à divers stimulus. JAO2 définit le mécanisme majeure connu de la régulation de la signalisation basale et son rôle influence fortement l'efficacité des réponses de résistances aux stress.

6.1.1. La régulation par JAO2 encore insuffisamment comprise

Nous avons seulement exploré le rôle de JAO2 en réponse au stress hydrique et au stress biotique nécrotrophe. Les FT surexprimés révèlent que JAO2 pourrait atténuer les réponses basales de nombreux autres stress : le stress lumineux, l'évitement de l'ombre, le stress salin et les stress thermiques chaleur et froid ([Annexe 3](#)). De plus, parmi les gènes dérégulés chez *jao2* ([Annexe 2B](#)), certains sont probablement que des cibles indirectes du mécanisme d'atténuation de JAO2, via l'action des FT ([Annexe 3](#)). La détermination des cibles moléculaires directe de JAO nécessite de plus larges investigations, notamment relier quels gènes peuvent être régulés par quels FT en fonction des éléments régulateurs présents dans les promoteurs. Cependant, les résultats actuels sont suffisants pour prouver que l'accumulation basale de JA n'est pas négligeable et qu'en absence de régulation, peut impacter la signalisation JA-Ile sur plusieurs processus physiologiques de la plante. Les JAs sont catégorisés comme des hormones de stress, tout comme l'ET, le SA et l'ABA ([Figure 1.1](#)). Le mécanisme d'atténuation basale pourrait exister aussi pour ces PhyH, ce qui ouvrirait un nouveau champ de recherches et de possibilités sur le contrôle de la régulation des PhyH. En effet, dans le cas des JAs, JAO2 apparaît comme un outil nouveau et intéressant pour étudier l'effet d'une activation modérée permanente de réponses JAs, sans stimulus ou ajout de JAs externe, qui pourraient causer des symptômes de mort cellulaires par exemple (Zhang et Xing, 2008). Des plus, des 2-ODD sont connues pour être impliquées dans le métabolisme de plusieurs hormones, notamment le catabolisme telles les GA2ox pour les GAs, les DAO dans le cas de l'auxine ou encore S3/5H pour le SA ([Figure 3.4](#)) (Rieu et al., 2008; Hedden et Thomas, 2012; Zhang et al., 2013, 2017; Zhang et Peer, 2017). Comme pour JAO2, la déficience de ces différentes enzymes résulte en une altération phénotypique importante. Les oxydases 2-ODD sont très importantes pour l'homéostasie et les réponses hormonales chez les plantes.

Un nouveau volet qui serait intéressant à développer dans notre étude et de chercher s'il y a un impact de JAO2 post-stimulus. Dans le cadre de la résistance à un pathogène nécrotrophe, l'expression de *JAO2* est induite (Smirnova et al., 2017), corrélé avec un impact presque nul sur la signalisation JA-Ile induite ([Annexe 2A](#)). Concernant la tolérance au stress hydrique, l'implication des JAs semblent être majoritaire lorsque le stress se prolonge ([Figure 4.23 et 4.24](#)) (Urano et al., 2017). Lorsque les cibles moléculaires de JAO2 en réponse à ce stress seront découvertes, il faudra vérifier si leur dérégulation chez *jao2* s'observe uniquement à l'état basal ou si elle s'accroît durant le stress. Par exemple, les JAs régulent la synthèse de métabolites dans les racines (Wasternack et Strnad, 2019), JAO2 pourrait avoir un effet sur leur accumulation et certains peuvent être impliqués dans la tolérance à la déshydratation. En effet, dans les racines le stress hydrique induit un métabolome spécifique, pour développer le

système racinaire et optimiser l'absorption d'eau, métabolome adapté à l'amplitude du stress (Gargallo-Garriga et al., 2014; Basu et al., 2016). Dans notre étude non ciblée du métabolome ([Annexe 4](#)), nous avons considéré uniquement le métabolome foliaire, issu de plantes qui se sont développées en conditions optimales, sans stimulus, ce qui représente une sous-estimation importante du métabolome total. Notamment des métabolomes racinaires et florales qui sont spécifiques. Il serait intéressant de définir le métabolome de ces deux organes pour avoir une indication sur le possible impact de JAO2 sur la signalisation JA-Ile dans les fleurs et les racines. Il est également possible que dans les feuilles, au cours du stress hydrique, *jao2* présente un détournement du métabolisme pour la croissance vers le métabolisme spécialisé plus important, favorisant la tolérance. En conclusion, nombres de cibles de JAO2 restent à découvrir dans les différents organes de la plante, autant en absence de stimulus qu'en réponse à un stress.

6.1.2. Une régulation multi-échelle de JAO2

Au-delà de l'atténuation de la signalisation médiée par JAO2, il existe un mécanisme régulant JAO2 lui-même qui vient complexifier les connaissances sur la régulation des JAs. L'induction de JAO2 en réponse à stress biotique est COI1 dépendante, signifiant que post-stimulus son expression est induite par le JA-Ile (Smirnova et al., 2017). Le rôle de cette induction reste à déterminer mais est sûrement pour atténuer la signalisation induite, en synergie avec les CYP94 et les AH. En revanche, la signalisation JA-Ile n'est pas impliquée dans l'expression basale de JAO2 qui est COI1 et JAR1 indépendante (Smirnova et al., 2017). Le détournement métabolique par JAO2, atténuant la signalisation basale JA-Ile, semble régulé par un mécanisme JAs indépendant. Ce mécanisme pourrait être responsable de l'incohérence obtenue entre les localisations foliaires de l'expression, de l'enzyme, et de la fonction de JAO2. Pour rappel, à l'échelle de la rosette l'expression du gène *JAO2* est majoritaire dans les feuilles matures et décroît dans les feuilles jeunes ([Figure 4.16](#)), la localisation de l'enzyme est dans les feuilles jeunes ([Figure 4.11 et 4.18](#)), et l'impact d'atténuation est démontré dans les feuilles matures majoritairement ([Figure 4.15 et 4.16D](#)). Une possibilité qui peut expliquer ce résultat est le transport du JA, qui peut être excrété de la cellule dans l'apoplasme par le transporteur JAT1 ([Figure 1.10](#)) (Li et al., 2017). En réponse à la blessure il est démontré qu'une accumulation du JA est détectée dans les feuilles distales de la feuille stimulée et ce dans les minutes qui suivent l'application du stress (Glauser et al., 2008, 2009). Même s'il n'existe aucune donnée sur un transport en l'absence de stimulus, du fait que le JA à une vitesse d'environ 4 cm par minute (Glauser et al., 2009), on peut supposer que le JA basal détecté (Yang et al., 2007; Hyun et al., 2008; Rodríguez et al., 2010; Gan et al., 2014) peut également être exporté dans l'apoplasme et transporté rapidement dans le reste de la plante. Le modèle qui découlerait de nos données est que le JA basal est produit dans les jeunes feuilles et

consommé par JAO2. Chez le mutant *jao2*, il y aurait deux possibilités mécanistiques entraînant l'absence d'atténuation de la signalisation dans les feuilles matures. La première, le JA pourrait être transporté dans les feuilles matures où il serait converti en JA-Ile. La seconde, le JA est converti en JA-Ile dans les feuilles jeunes et c'est le JA-Ile lui-même qui est transporté dans les feuilles matures. En effet, le JA-Ile présente aussi un transport distale après blessure, avec une plus grande mobilité que le JA (Sato et al., 2011). Cette hypothèse suppose également que la régulation du JA basal est différente selon l'âge des feuilles.

Cependant, un mécanisme de transport n'explique pas pourquoi les transcrits *JAO2* sont le plus abondants dans les feuilles matures (Figure 4.16), et la protéine JAO2 dans les feuilles jeunes. De plus, l'expérimentation de greffe a démontré qu'il n'y a pas de signalisation inter-organe JAO2-dépendante (Figure 4.14). Actuellement, il est démontré qu'il peut y avoir un transport via le phloème du précurseur OPDA, en réponse à la blessure, des feuilles vers les racines où il est converti en JA et JA-Ile (Schulze et al., 2019). Cependant, toutes les données existantes sur le mouvement axial des JAs montrent uniquement un transport des feuilles vers les racines et non l'inverse (Gasperini et al., 2015a; Schulze et al., 2019) ce qui corrèle avec le résultat des greffes (Figure 4.14). L'ensemble de ces données rendent plus probable l'hypothèse d'une régulation de JAO2 par un mécanisme JAs indépendant dans les feuilles matures plutôt qu'un transport de JA. A moins qu'il existe un mécanisme qui bloque la traduction de l'ARN *JAO2* dans les feuilles matures. Cependant, chez *Arabidopsis*, les enzymes LOX, AOS et AOC montrent une accumulation enzymatique plus abondante chez des tissus matures par rapport aux feuilles en cours de développement (Stenzel et al., 2003). Il est probable d'avoir une biosynthèse basale de JA dans les feuilles matures plutôt qu'une biosynthèse exclusive aux feuilles jeunes avec un transport. Dans ce cas de figure, l'atténuation de la signalisation basale par JAO2 n'est possible que si l'enzyme est présente également dans les feuilles matures. On peut supposer une modification post-traductionnelle qui inactiverait le GUS et peut être cliverait ou dégraderait l'étiquette 4xmyc, masquant la localisation de l'enzyme dans les feuilles matures (Figure 4.11 et 4.18).

En définitive, JAO2 est un régulateur majeur de la signalisation JAs basal, son expression génique foliaire basale est JAs indépendant mais âge-dépendante et antagonise avec la localisation de l'enzyme et sa fonction d'atténuation. Ces données indiquent que le régulateur JAO2 est probablement lui-même régulé, ou modifié, par un mécanisme qui reste à identifier.

6.2. L'activité des JAO régule les réponses développementales JAs dépendantes

Bien que l'expression JAO2 soit manifestée dans des organes où les JAs ont des rôles développementaux comme les racines et les étamines (Figure 4.11A et 4.11G), son abolition n'impacte pas massivement la croissance de la plante (Smirnova et al., 2017). Par ailleurs, JAO2 régule également des réponses développementales, potentiellement par les *crosstalk* avec des hormones de croissance comme plusieurs FT réprimés par JAO2 sont décrits pour interagir avec les BR, les GA ou l'auxine (Annexe 3). Nos données démontrent que l'impact du mécanisme d'atténuation sur le développement n'est pas porté uniquement par JAO2 mais aussi par ses homologues. En effet, *jao2* présente une croissance racinaire et une surface foliaire comme le WT et seulement une surface de graine plus faible (Figure 4.27, 4.29 et 4.31B). En revanche, le mutant *jao4* présente une réduction du développement racinaire (Figure 4.27 et 4.28). Nous avons démontré que l'action de JAO4 favorise la croissance des racines via un effet sur l'allongement des cellules. Cependant, nous avons estimé que chez *jao4* les cellules plus petites justifient à 50 % seulement la réduction de la taille racinaire. Un autre mécanisme impliqué dans le développement des racines doit être impacté par la mutation. Une hypothèse c'est que *jao4* présente également moins de cellules. Il serait intéressant de déterminer le nombre de cellules sur une file cellulaire du cortex tout au long de la racine pour définir s'il y a une division cellulaire altérée. Bien que la démonstration que ce phénotype soit JA-Ile dépendant reste à faire, la redondance enzymatique entre les JAO (Smirnova et al., 2017) suppose que JAO4 agit également par un mécanisme d'atténuation des réponses basales via la consommation de JA. Les JAO présentent des patrons d'expressions spécifiques dans les racines (Figure 4.25), à confirmer, qui pourraient structurer un rôle de répression dans la racine (bien que similaire en intensité globale à celui de JAO4, l'expression de JAO2 ne semble pas nécessaire pour le contrôle de la croissance racinaire).

Pour l'instant nous disposons de très peu d'information sur JAO3, catalytiquement il a la même activité que JAO2 et JAO4, il est exprimé dans les feuilles et sa faible expression basale est COI1 indépendante (Smirnova et al., 2017). Il est faiblement induit par la blessure et par l'infection et le mutant *jao3* ne montre pas de phénotype de résistance par rapport au WT (Smirnova et al., 2017) signifiant que JAO3 n'aurait pas un rôle dans l'atténuation des réponses de stress biotiques. Il pourrait avoir un rôle dans les processus développementaux JAs régulés. Bien que JAO3 possède une expression forte dans la columelle, d'après les données d'expression publique sur eFP Browser, nous pouvons exclure un impact majeur sur le développement racinaire comme *jao3* n'est pas altéré dans l'allongement racinaire (Figure 4.27). Néanmoins, toujours par rapport aux données d'eFP Browser, JAO3 présente une

expression majoritaire dans les étamines (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> ; At3g55970) où les JAs sont essentiels pour l'allongement du filet pour la pollinisation ainsi que dans la maturation du pollen (Wasternack et Hause, 2013). Il est possible que JAO3 atténue la signalisation JAs au cours du développement floral.

Nos résultats actuels et les données publiques indiquent que les JAO auraient chacune la fonction majoritaire en réponse à un processus physiologique spécifique. Dans le cadre du développement il est tout de même possible qu'il existe une redondance dans leur fonction. En effet, le triple mutant *jao234* révèle des phénotypes développementaux qui sont plus forts, ou spécifique, par rapport aux mutants simples : une surface foliaire et une masse de graines plus faible (Figure 4.29 et 4.30), ainsi que des graines plus petites en taille (Figure 4.31B). Ces résultats montrent que l'addition des mutations impactent plus fortement certaines phase du développement, sans montrer un impact qualitatif sur d'autres processus régulés par les JAO comme la résistance à un nécrotrophe (Figure 3.11B). À l'état WT on peut supposer qu'au moins deux JAO, voir les trois, atténuent de façon synergique une signalisation réprimant la maturation ou le développement des organes concernés. Les voies cataboliques oxydatives et par déconjugaison agissent sur le JA-Ile dans les différents organes de la plante (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013; Koo et al., 2014; Aubert et al., 2015; Zhang et al., 2016b), mais en fonction du stimulus il y a une dynamique et une flexibilité dans leurs apports pour le catabolisme du JA-Ile (Widemann et al., 2016; Marquis et al., 2020). Les JAO pourraient présenter également leurs propres dynamismes et flexibilités pour des processus développementaux, avec des situations où l'une des trois enzymes a la fonction majoritaire et d'autres où les trois enzymes agissent en synergie. Il doit exister un mécanisme qui régule et définit le patron d'expression, ou d'action, des JAO de façon JAs indépendante, car leur expression basale est COI1 indépendante (Smirnova et al., 2017).

6.3. Le produit d'oxydation de JAO2 et son impact sur les connaissances du métabolisme des JAs

Aujourd'hui la grille métabolique des JAs et les voies enzymatiques entre les différents composés sont riches et plus d'une cinquantaine de JAs endogènes sont identifiés (Figure 1.9) (Wasternack et Strnad, 2018). La découverte des JAO a confirmé une étape suspectée de longue date et révélée les enzymes impliquées. Néanmoins, l'étape métabolique réalisée par les JAO n'est pas entièrement caractérisée, en particulier sur le produit des enzymes. L'analyse préliminaire par RMN indique que JAO2 pourrait produire exclusivement l'isomère de position 11OH-JA, dont la voie de formation est encore inconnue (Miersch et al., 2008), et non pas l'isomère 12OH-JA qu'on a supposé être le produit des JAO du fait de l'abondance de cet isomère chez les plantes (Miersch et al., 2008). Si ce résultat est confirmé, il remettrait

en cause l'affirmation que le 12OH-JA peut être produit par deux voies métaboliques (Smirnova et al., 2017; Heitz et al., 2019). On pourrait distinguer deux types de catabolismes des JAs dans la plantes. Le catabolisme induit, qui résulte en la production de 12OH- et 12COOH-JA ou -JA-Ile par les CYP94 et les AH (et une enzyme encore inconnue pour le clivage du 12COOH-JA-Ile en 12COOH-JA) (Figure 1.30 et 1.31) (Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012; Widemann et al., 2013; Koo et al., 2014; Aubert et al., 2015; Zhang et al., 2016b). Le catabolisme basal, qui correspond à la métabolisation de la pro-hormone JA par l'action des JAO (Smirnova et al., 2017).

Le catabolisme a pour rôle d'atténuer la signalisation JAs. Les dérivés 12OH- et 12COOH- sont effectivement des catabolites, réduisant ou inhibant la formation du corécepteur tripartite. Les JAO produiraient plutôt comme catabolite l'isomère 11OH-JA. On peut se demander pourquoi la plante a évolué un mécanisme catabolique basal à ce point différent du catabolisme induit. Premièrement, le catabolisme par les CYP94 et les AH nécessite la signalisation JA-Ile, les JAO, dont l'expression basale est JA-Ile indépendante (Smirnova et al., 2017), sont plus propices au catabolisme basal. Ensuite, le 12OH-JA a un rôle dans la tubérisation (Yoshihara et al., 1989) et l'un de ces dérivés, le 12-O-Glc-JA, induit la nyctinastie chez *Samanea saman* (Nakamura et al., 2011). Ces deux rôles sont spécifiques à quelques plantes mais démontrent que le 12OH-JA et ses dérivés ne sont pas de simples catabolites. Il serait possible qu'à l'état basal, la synthèse de l'isomère de position 12OH-JA entraîne des réponses chez les plantes ce qui pourrait justifier biologiquement pourquoi les JAO produiraient plutôt la forme 11OH-JA qui n'a pour l'instant aucun rôle biologique connu (Miersch et al., 2008). Il faudra par la suite comprendre plus précisément les différences entre le catabolisme basal et le catabolisme induit, leurs propriétés biologiques propres, pour ajuster l'actuelle grille métabolique des JAs.

La dernière question qu'on peut se poser concerne l'origine des traces basales de JA. Une possibilité serait pour la plante que l'induction des défenses serait plus rapide, et plus efficace, avec du JA préformé plutôt qu'à la suite d'une néosynthèse après la perception d'un agresseur. Cette hypothèse a également été formulée suite à la découvertes des arabidopsides, ces conjugués d'OPDA ou de dnOPDA à des galactolipides plastidiaux (Mosblech et al., 2009). En effet, l'accumulation de JA après une infection fongique est corrélée avec une réduction de la quantité des arabidopsides (Kourtchenko et al., 2007).

7. Matériels et Méthodes

7.1. Culture des plantes et traitements

7.1.1. Matériel végétal et culture en sol

Les génotypes d'*Arabidopsis thaliana* utilisés sont de l'écotype Col0 et ont été cultivées à une photopériode de jours/nuit 12 h/12 h à 21°C/18°C sous un éclairage de type néons pour les expérimentations d'infection, de transcriptomique, de métabolomique, de GUS de la génération T3, de localisation de l'expression de *JAO2*, d'accumulation de l'enzyme étiquetée et de croissance ; à une photopériode de 16 h/8 h à 21°C/18°C sous un éclairage de type néons pour les expérimentations de greffes et de stress hydrique et de type LED pour les expérimentations de GUS de la génération T2. Les lignées d'insertion d'ADN-T ont été obtenues du Nottingham Arabidopsis Stock Center : *jao2-1* (SALK_206337C, Col0), *jao2-2* (GK_870C04, Col0), *jao3-1* (SAIL_861E01, Col0), *jao4-2* (SAIL_268_B05, Col0), *jar1-1* (SALK_034543, Col0), *act-1* (SALK_097380, Col0). Les doubles mutants *jao2-1jar1-1*, *jao2-2jar1-1* et *jao2-1act-1* ont été obtenus par croisement et génotypage PCR de la descendance en F2.

7.1.2. Culture *in vitro*

Les colorations GUS de plantules de 10 jours et les expérimentations sur les racines ont été faites sur des plantes cultivées *in vitro*. La surface des graines est stérilisée sur roue à l'éthanol 70 % pendant 30 min puis à l'éthanol 100 % pendant 5 min. Une fois sèches les graines stérilisées ont été mises à germer sur du MS-agar 0,9 % pH 5,7, complémenté de 0,05 % de MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique) et de 1 % de saccharose, à une photopériode de 16 h de jour à 21°C et de 8 h de nuit à 17°C. Pour les plantules utilisées pour l'analyse de la croissance racinaire en présence de JA, le milieu de semis MS est complémenté avec 10 µM de JA synthétisé chimiquement.

7.1.3. Mesures des graines

Pour la détermination de la masse des graines, l'intégralité des graines sont récoltées lorsque la plante est complètement sèche et ne produit plus de siliques. La masse a été déterminée sur une balance de haute précision.

La mesure de la taille des graines est effectuée sur des photos de graines au grossissement x 300 au microscope électronique mini-SEM Hitachi TM-1000. La largeur, la longueur et la surface sont déterminées avec le logiciel Image J (<https://imagej.net/Welcome>).

Tableau 4.1. Amorces utilisées dans cette étude.

qPCR			
Gène/allèle	Locus	Nom de l'amorce	Sequence (5' -> 3')
<i>EXP</i>	At4g26410	At4g26410-qPCR_F	gagctgaagtggcttcaatgac
		At4g26410-qPCR_R	gggccgacatacccatgatcc
<i>TIP4.1</i>	At4g34270	TIP41_LP	gtgaaaactgtggagagaagcaa
		TIP41_RP	tcaactggatacccttctgca
<i>JAO2</i>	At5g05600	ogd2-1_qPCR_new_for	ggctatggaagtagactaggt
		ogd2-1_qPCR_new_rev	gcttactagctctctgc
<i>JAO3</i>	At3g55970	jrg21-1_qPCR_for	agctcctcatgctttcatcgtt
		jrg21-1_qPCR_rev	cgatcactctgtgtctacgct
<i>JAO4</i>	At2g38240	(150)q2ogd1-2F	ggaatttcaaaaagcgtggaaca
		(151)q2ogd1-2R	cgggatatcacttctcgggt
<i>ORA59</i>	At1g06160	ORA59_qPCR_for_new	ttcgacgttgacatcttctcc
		ORA59_qPCR_rev_new	tcttgcgtcataacaacactctg
<i>PDF1.2</i>	At5g44420	E39-PDF1.2-L	cacccttatcttgcgtctctt
		E40-PDF1.2-R	tacactgtgtgctgggaagac
<i>PR4</i>	At3g04720	520-E43-PR4-L	gccatctcattgtgactaccaatt
		520-E44-PR4-R	atcaatggccgaaacaagca
<i>ACT</i>	At5g61160	ACT_qPCR_for	gagagccaagaaagagtcaaacgcg
		ACT_qPCR_rev	cgaacgtgactacgaacgttgaca
<i>NCED3</i>	At3g14440	NCED3_for	tcgtcgtgatagggctctg
		NCED3_rev	ttctcgtcagactcgttgaaaa
<i>RD29A</i>	At5g52310	RD29A_for	gggtagagattatgtggcggaga
		RD29A_rev	ttccttgtcgtcgtttccttc
<i>P5CS1</i>	At3g55610	P5CS1_for	acaaaaatccctgtgctaggtc
		P5CS1_rev	tgccatatccgtatcacaagc
<i>GUS</i>		GUS_qPCR_for1	agtcttacttccatgatttcttaactat
		GUS_qPCR_rev1	ggcgtgggttagagcatt
Génotypage ADN-T			
Gène/allèle		Nom de l'amorce	Sequence (5' -> 3')
		LBb1.3 (SALK)	attttccgatttcggaac
<i>act-1</i>		act-SALK-LP	ggcttaaactcaaccctaccg
		act-SALK-RP	caaagagatgccaatctcgac
Clonage JAO2			
Gène/allèle		Nom de l'amorce	Sequence (5' -> 3')
<i>pJAO2::JAO2</i> dans pDONR221		JAO2_AttB1_For1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcgatgtgacatatatgtggc
		JAO2_AttB2_rev1	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacaggagaaatagagattcaacatg
<i>pJAO2::JAO2</i> dans pDONR-Zeo		attB1_pO2_for_3137	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcctagcttctgttttattaactaacg
		OGD2_Cf-pZeo-rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttacgaggagaaatagagattc
<i>pJAO2::JAO2-stop</i> dans pDONR-Zeo		attB1_pO2_for_3137	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcctagcttctgttttattaactaacg
		attB2_AT5G05600	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttttaacgaggagaaatagagattc
<i>JAO2 ORF</i> dans pDONR-Zeo		attB1_AT5G05600	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcataacaagaacaagattgatgtt
		attB2_AT5G05600	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttttaacgaggagaaatagagattc

7.1.4. Test de résistance à *Botrytis cinerea*

Pour les expériences d'infection fongique, des plantes âgées de 5 à 6 semaines ont été utilisées. La souche B05.10 de *Botrytis cinerea* a été utilisée pour inoculer quatre à six feuilles par plante en déposant une goutte de 5 µl d'inoculum ($3,75 \cdot 10^6$ spores par ml suspendues dans du *potato dextrose broth*, PDB) de chaque côté de la nervure centrale. Les plantes inoculées, pour chaque génotype, ont été placées dans des mini serres en condition d'humidité saturante jusqu'à l'évaluation des symptômes et la récolte des feuilles infectées 2 ou 3 jours après l'inoculation. Toutes les feuilles infectées (environ 100 lésions par génotype) ont été notées pour les symptômes de la maladie, la taille des lésions a été mesurée à l'aide d'une loupe graduée. Toutes les feuilles infectées ont été collectées et regroupées en trois réplica par génotype. Les échantillons de feuilles ont été rapidement collectés et congelés dans l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C jusqu'à l'analyse.

7.1.5. Analyses foliaires âges dépendantes

Les feuilles de la rosette ont été numérotées de la plus vieille à la plus jeune en fonction des paramètres décrits par Farmer *et al.*, 2013 : la taille, la forme et la densité de trichomes (Farmer *et al.*, 2013). Les feuilles les plus vieilles sont petites, de forme arrondie et ont peu voire pas de trichomes. Les feuilles les plus jeunes sont petites, étroites et ont des trichomes. Les feuilles d'âges intermédiaires sont les plus grandes avec une forme intermédiaire entre étroite et arrondie et ont beaucoup de trichomes. Le développement des feuilles se fait en spirale, sens ou antisens selon les plantes, chaque nouvelle feuille présente un angle de 137° avec la feuille qui la précède. Ces caractéristiques guident la numérotation des feuilles. Pour un même réplica biologique, plusieurs plantes ont été regroupées en collectant alternativement les feuilles d'âge croissant et d'âge décroissant. Les feuilles coupées ont été immédiatement congelées à l'azote liquide et conservées à -80°C.

7.2. Construction des plasmides et transformation des plantes

Pour générer les lignées *jao2-1 pJAO2:JAO2-GUS*, *pJAO2:JAO2-stopGUS* et *pJAO2:JAO2-4xmyc*, les fragments *pJAO2:JAO2* ont été amplifiés par PCR à partir d'ADNg de WT Col0 avec des amorces spécifiques (Tableau 4.1) englobants la région promotrice (3,1 kb pour les fusions GUS et 1,9 kb pour la fusion 4xmyc) et l'ADNg du gène, auquel est ajouté à la fin un codon stop pour la fusion traductionnelle contrôlée JAO2-stopGUS. Ensuite les séquences ont été insérées dans le pDONR-Zeo (Thermo Fisher Scientific) pour les fusions GUS et dans le pDONR221 (Invitrogen) pour la fusion 4xmyc par la méthode de clonage Gateway. Les fusions GUS ont été recombinées dans le vecteur d'expression pGWB633 qui contient la séquence

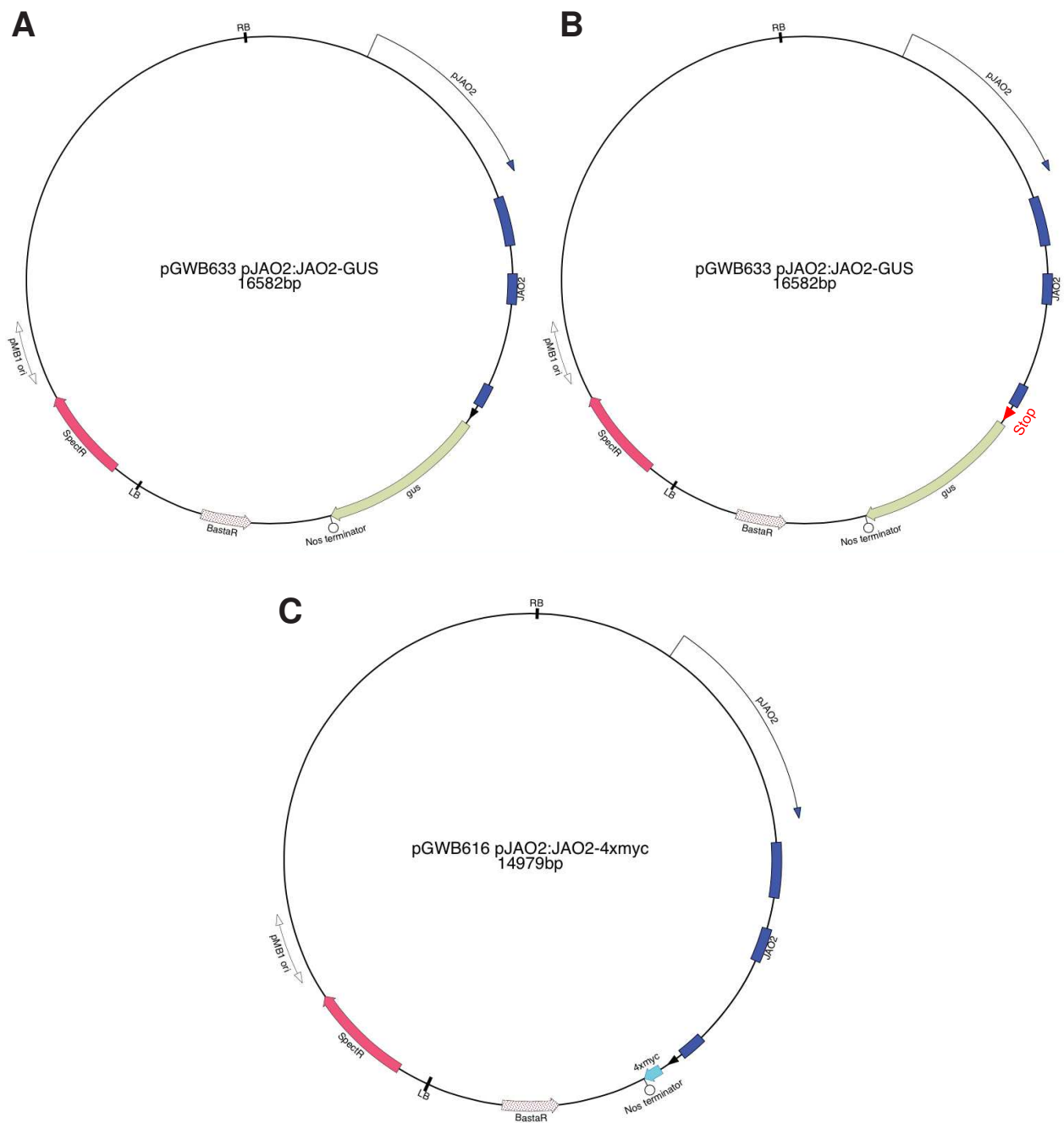


Figure 4.37. Vecteurs d'expression pour les plantes utilisés dans cette étude.

A, fragment génomique *pJAO2:JAO2* inséré dans le plasmide pGWB633, fusionnant à la séquence GUS en C terminale.

B, fragment génomique *pJAO2:JAO2-stop* inséré dans le plasmide pGWB633, fusionnant à la séquence GUS en C terminale.

C, fragment génomique *pJAO2:JAO2* inséré dans le plasmide pGWB616, fusionnant à la séquence 4xmyc en C terminale.

GUS (Figure 4.37A et 4.37B) et la fusion 4xmyc dans le vecteur d'expression pGWB616 qui contient la séquence 4xmyc (Figure 4.37C) (<https://gatewayvectors.vib.be/>). Les plasmides recombinants ont été insérés dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 par électroporation avant la transformation des plantes *jao2-1* par la méthodes de *floral dip* (Bent, 2006).

7.3. Analyse de l'expression des gènes

7.3.1. RT-qPCR

Les ARN totaux ont été extraits des feuilles de plantes ou des racines avec le réactif TRIzol (Molecular Research Center) et quantifié au Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Un microgramme d'ARN a été rétro-transcrit en utilisant le système de rétro-transcription SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific). Une PCR en temps réel a été effectuée sur 10 ng d'ADNc comme décrit dans Berr *et al.*, (2010) en utilisant un instrument LightCycler 480 II (Roche Applied Science). Les gènes de références *EXP* (At4g26410) et *TIP4.1* (At4g34270) ont été utilisés comme références internes. Les séquences spécifiques des amorces des gènes utilisées pour la qPCR sont énumérées dans le [Tableau 4.1](#).

7.3.2. Extraction et purification des ARN pour RNAseq

Les ARN totaux ont été extraits des feuilles de la rosette de plantes de cinq semaines à l'aide du protocole du kit d'extraction NucleoSpin® RNA Plant de Macherey-Nagel. 5 µg d'ARN extraits ont été prélevés et traités à la DNase I RNase free (Thermo Fisher Scientific), qsp H₂O 25 µL, 1 h à 37°C puis 2,5 µL de stop DNase (Thermo Fisher Scientific) a été ajouté aux échantillons pendant 10 min à 65°C.

Les ARN sont ensuite purifiés avec le kit NucleoSpin® RNA Clean-up de Macherey-Nagel. L'intégrité des ARN extraits a été vérifiée et confirmée au Bioanalyzer (Agilent) avant l'envoi des échantillons au prestataire BGI (<https://www.bgi.com/global/>) pour la construction et le séquençage des banques RNAseq.

7.4. Profils métaboliques

7.4.1. Analyse non-ciblée par UHP-LC-QTOF

L'extraction des métabolites des échantillons de feuilles de rosettes de cinq semaines a été adaptée du protocole décrit dans Widemann *et al.*, (2013). Environ 50 à 100 mg de matériel végétal congelé ont été extraits avec 6 volumes (6 µl par mg) de solution d'extraction froide (méthanol (**MeOH**) : eau : acide acétique, 70:29:0,5, v:v:v) contenant le standard interne D6-

ABA à 3 μ M, utilisés pour les calculs de récupérations. Le broyage a été effectué avec un homogénéisateur de tissus Precellys Evolution (Bertin Technologies, France) avec des billes de verre dans des tubes à bouchon vissé de 2 ml. Après 1 heure d'incubation à 4°C sur une roue rotative, les homogénats ont été éliminés par centrifugation avant la concentration des surnageants sous un flux de N₂ et la conservation de nuit à -20°C. Après une deuxième étape de centrifugation, les extraits ont été soumis à une analyse quantitative par UHP-LC couplée au QTOF haute résolution. L'analyse des métabolites non ciblés a été effectuée sur le système UHPLC UltiMate 3 000 (Thermo) couplé au Quadrupole Time-of-Flight (QTOF) à haute résolution ImpactII (Bruker). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Acquity UPLC® BEH C₁₈ (2,1 × 100 mm, 1,7 μ m, Waters) couplée à une pré-colonne Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 × 5 mm, 1,7 μ m, Waters). L'analyse non-ciblée a été faite comme décrit dans Villette *et al.*, (2018).

7.4.2. Analyse ciblée par UHPLC-MS/MS

Les jasmonates, l'ABA et les amides d'acide hydroxycinnamique ont été identifiés et quantifiés par UHPLC-MS/MS. L'extraction des jasmonates des échantillons de plantes a été adaptée du protocole décrit dans Widemann *et al.*, (2013). Environ 50 à 100 mg de matériel végétal congelé ont été extraits avec 10 volumes (10 μ l par mg) de solution d'extraction froide (MeOH : eau : acide acétique, 70:29:0,5, v:v:v) contenant les standards internes 9,10-dihydro-JA ; 9,10-dihydro-JA-Ile et Prostaglandine A1, utilisés pour les calculs de rendement d'extraction. Le broyage a été effectué avec un homogénéisateur de tissus Precellys Evolution (Bertin Technologies, France) avec des billes de verre dans des tubes à bouchon vissé de 2 ml. Après 30 minutes d'incubation à 4°C sur roue, les homogénats ont été clarifiés par centrifugation avant la concentration des surnageants sous un flux de N₂ et la conservation de nuit à -20°C. Après une deuxième étape de centrifugation, les extraits ont été soumis à une analyse quantitative par LC-MS/MS sur un EvoQ Elite LC-TQ (Bruker) équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) et couplé à un système UHPLC Dionex UltiMate 3 000 (Thermo Fisher Scientific). Cinq microlitres d'extrait de plante ont été injectés. La séparation chromatographique a été réalisée en utilisant une pré-colonne et une colonne Acquity UPLC HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μ m ; Waters). La phase mobile était composée (A) d'eau et (B) de MeOH, contenant tous deux 0,1 % d'acide formique. La chromatographie a commencé par 2 min de 95 % A, puis un gradient linéaire a été appliqué pour atteindre 100 % B à 10 min, suivi d'une chromatographie isocratique utilisant B pendant 3 min. Le retour aux conditions initiales a été réalisé en 1 min, avec une durée totale d'exécution de 15 min. La colonne a fonctionné à 35°C avec un débit de 0,30 ml/min. L'azote a été utilisé comme gaz de séchage et de nébulisation. Le débit du gaz de nébulisation a été réglé à 35 L/h, et le débit du gaz de désolvatation à 30 L/h. La température d'interface a été réglée à 350°C et la température de

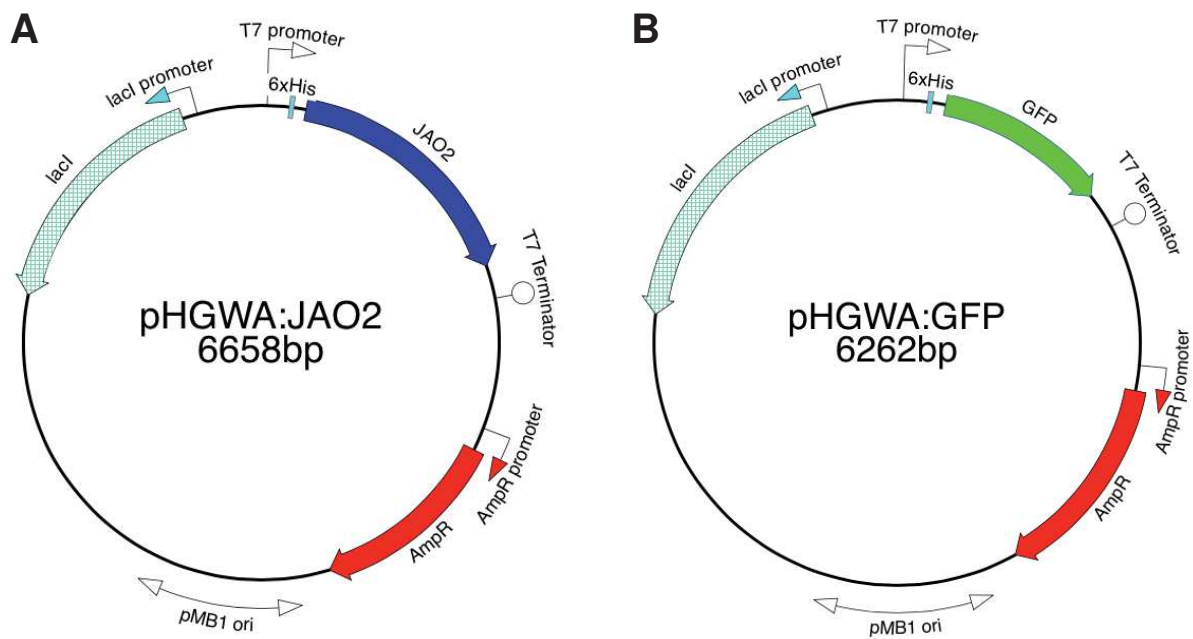


Figure 4.38. Vecteurs d'expression bactérien utilisés pour la production enzymatique du produit de JAO2.

A, ORF de *JAO2* inséré dans le plasmide inducible pHGWA, fusionnant à la séquence 6xHis en N terminale.

B, ORF de GFP inséré dans le plasmide inducible pHGWA, fusionnant à la séquence 6xHis en N terminale.

la source à 300°C. La tension capillaire a été réglée à 3,5 kV et l'ionisation était en mode positif ou négatif. La résolution à faible masse et à masse élevée était de 2 pour le premier analyseur de masse et de 2 pour le second. L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel MS Workstation 8 pour la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide a été pilotée avec le logiciel Bruker Compass Hystar 4.1 SR1. L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel MS Data Review. Des quantifications absolues ont été réalisées en comparant le signal de l'échantillon avec les courbes de dose-réponse établies avec des composés purs et la correction de la récupération basée sur les signaux des standards internes. Les transitions étaient, en mode négatif : 12COOH-JA-Ile 352,2 > 130,1 ; 12OH-JA-Ile 338,3 > 130,2 ; Prostaglandine A1 335,2 > 317,2 ; 9,10-dihydro-JA-Ile 326,3 > 128,2 ; JA-Ile 322,3 > 130,2 ; 12COOH-JA 239,2 > 59,3 ; 11 et 12OH-JA 225,2 > 59,3 ; 9,10-dihydro-JA 213,0 > 195,1 ; JA 209,3 > 59,3 ; D6-ABA 269,2 > 159,1 ; ABA 263,0 > 153,1 ; FAg 307,0 > 177,0 et *p*-CAg 277,2 > 147,2.

7.5. Production enzymatique du produit de JAO2

7.5.1. Expression et purification de la protéine recombinante JAO2

Pour l'expression hétérologue de la protéine JAO2, la séquence codante du gène a été amplifiée en utilisant la Taq Polymerase Phusion (Thermo Fisher Scientific) avec des amorces spécifiques ([Tableau 4.1](#)) avant le clonage dans le vecteur pDONR-Zeo de la souche DH5a *Escherichia coli*. L'insert avec une séquence sans erreur a été recombinaisonné dans le vecteur d'expression pHGWA ([Figure 4.38A](#)). Le plasmide pHGWA contenant l'ORF de la GFP ([Figure 4.38B](#)) était disponible à la plateforme de Production et de Purification des Protéines. Les plasmides ont ensuite été transformés dans la souche Rosetta 2 (DE3) d'*Escherichia coli* (Novagen). Des culots bactériens congelés provenant de cultures induites par l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside ont été collectés et remis en suspension dans du tampon de lyse (NaCl 300 mM, imidazole 20 mM et Tris-HCl 50 mM pH 7,5) pour atteindre 20 unités de DO/mL. Les bactéries sont lysées par sonication (VibraCell™ 75115, Bioblock Scientific) et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Le lysat de protéines clarifiées a été filtré puis purifié par chromatographie d'affinité sur un système FPLC (*fast protein liquid chromatography*) Äkta pure de type cation métallique-chélat (IMAC pour *immobilized metal affinity chromatography*). Le lysat est chargé sur une phase stationnaire HisTrap FF crude 1 mL (GE Healthcare) équilibrée avec un tampon constitué de 95 % de solution de lavage (Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM et glycérol 5 %) et 5 % de solution d'élution (Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, glycérol 5 % et imidazole 500 mM). Les protéines étiquetées His sont éluées avec la solution d'élution et récupérées dans le système Fraction collector F9-C. La pureté des protéines a été déterminée par gel SDS-PAGE coloré au Coomassie brilliant blue G-250, et la

concentration a été estimée par quantification avec le réactif de Bradford en utilisant une gamme de calibrations de BSA (*bovine serum albumine*).

7.5.2. Incubation enzymatique

Pour la production d'OH-JA par JAO2, à petite échelle de 500 µL les réactions se constituent de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, DTT 5 mM, 2-oxoglutarate 13,3 mM, ascorbate 13,3 mM et FeSO₄ 0,67 mM, avec 100 µM de substrat JA et 50 µg d'enzyme purifiée complétement à 200 µg de protéine par réaction avec du BSA. Les réactions ont été incubées à 30°C pendant une nuit et arrêtées en précipitant les protéines par l'ajout de 4 volumes d'acétones ultra pure. Après une nuit d'incubation à -20°C, les protéines ont été éliminés par centrifugation avant l'évaporation de l'acétone sous flux d'argon. Les produits de la réaction ont été extrait avec le même volume d'éthyle acétate (**EtAc**) après acidification avec 1/10 du volume d'HCL 1 N. Après avoir vortexer 1 min et centrifugé, la phase supérieur organique a été séchée sous flux d'argon avant d'être repris dans du MeOH pure pour analyse UPLC-MS/MS et RMN (résonance magnétique nucléaire). L'analyse UPLC-MS/MS a été réalisée comme décrit ci-dessus mais sur un instrument Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA), équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) et couplé à un système UPLC AcquityUPLC (Waters). La séparation chromatographique a été réalisée en utilisant une pré-colonne et une colonne Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm ; Waters) et une précolonne.

A grande échelle de 20 mL, les réactions se constituent de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, DTT 5 mM, catalase 0,1 mg/mL, des trois co-facteurs 2-oxoglutarate 13,3 mM, acide ascorbique 13,3 mM et FeSO₄ 0,67 mM titrés à pH 7, avec 200 µM de substrat JA et 1 500 µg d'enzyme purifiée complétement avec 20 000 µg de protéine par réaction avec du BSA. Les réactions ont été incubées à 28°C à 80 rpm pendant une nuit et arrêtées en précipitant les protéines par l'ajout de 4 volumes d'acétones ultra pure. Après une nuit d'incubation à -20°C, les protéines ont été éliminés par centrifugation avant l'évaporation de l'acétone au rotavapor R-200 (Büchi). Les produits de la réaction ont été extrait avec le même volume d'EtAc après acidification avec 1/10 du volume d'HCL 1 N. Après avoir vortexer 3 x 20 secondes et centrifugé 5 min à 15 000 g à 4°C, la phase supérieure organique est récupérée. L'extraction EtAc a été répété deux fois de plus et les trois phases organiques ont été regroupées, séchées au trois quart au rotavapor R-200 (Büchi) et terminée sous flux d'azote avant d'être repris dans du MeOH pure pour analyse UHPLC-MS/MS, comme décrit ci-dessus, et RMN.

7.5.3. Analyse RMN du produit de réaction

Les incubation contenant le produit d'oxydation à petite échelle de JAO2 ont été séchées et reprise dans du chloroforme deutéré avant d'être analysées à 500 MHz sur un

spectrophotomètre Bruker Advance II équipé avec une sonde $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (5 mm cryoprobe DCH $^{13}\text{C}/^1\text{H}/\text{D}$ z-grad) fonctionnant à 500,13 MHz pour ^1H et 125,758 MHz pour ^{13}C . Les déplacements chimiques ont été mesurés en parties par millions (ppm) par rapport au signal résiduel du solvant non deutéré comme référence interne et les constantes de couplages sont mesurées en Hertz. L'ordre des carbones a été confirmé par une séquence DEPT (*Distortionless Enhanced Polarization Transfer*) pour faciliter l'interprétation du spectre.

7.6. Colorations GUS

Le matériel végétal a d'abord été fixé pendant 15 à 20 minutes dans de l'acétone à 90 % refroidit avant d'être rincé deux fois avec du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,2 puis infiltré sous vide avec la solution GUS (phosphate de sodium 50 mM pH 7,2, EDTA 10 mM, triton X-100 0,01 %, ferricyanure de potassium 1 mM, ferrocyanure de potassium 1 mM et le substrat **X-Gluc** ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique à 0,4 mg/mL) 3 à 5 fois pendant 5 min en fonction du matériel végétal. Les tissus foliaires nécessitant cinq infiltrations de 5 min pour une bonne pénétration de la solution GUS, les tissus racinaires et floraux nécessitaient seulement trois infiltrations. Le matériel végétal a ensuite été incubé à 37°C jusqu'à apparition d'une coloration bleue dans les tissus. Ensuite, la solution GUS a été remplacée par un gradient d'éthanol de 70 à 100 % pour décolorer les tissus. Les images sont prises, selon le matériel biologique, à l'appareil photo numérique DMC-LX 100 (Panasonic), à la loupe binoculaire Stemi 305 (Zeiss) ou au microscope optique DMRB (Leica Leitz). Le matériel a ensuite été conservé à 4°C dans de l'éthanol 50 %.

7.7. Greffes

L'expérimentation de greffe est basée sur le protocole de Turnbull *et al.*, (2002). La surface des graines est stérilisée sur roue à l'éthanol 70 % pendant 30 min puis à l'éthanol 100 % pendant 5 min. Une fois sèches les graines stérilisées ont été mises à germer sur boîte verticale de MS-agar 0,9 % pH 5,7, complémenté de 0,05 % de MES et de 1 % de saccharose, dans une chambre de culture *Versatile environmental test chamber* (SANYO, model MLR-351H) à une photopériode de 16 h de jour à 21°C et de 8 h de nuit à 17°C. Les greffes ont été réalisées en conditions stériles sous une loupe binoculaire Stemi 305 (Zeiss) sur des plantules de cinq jours. Les plantules ont été déposées sur un filtre de nitrocellulose humide. L'un des deux cotylédons du greffon a été sectionné pour que l'hypocotyle soit à plat sur le filtre, les hypocotyles ont été sectionnés à un tiers de leur hauteur et la partie racinaire a été éliminée. Les deux cotylédons du porte-greffe ont été sectionnés pour que l'hypocotyle soit à plat sur le filtre, les hypocotyles ont été sectionnés à un tiers de leur hauteur et la partie foliaire a été éliminée. L'humidité du filtre a été ajustée pour glisser le porte-greffe jusqu'au greffons au

niveau du point de greffe. Les greffes ont été replacées dans une chambre de culture pendant cinq jours durant lesquels l'humidité est ajustée après deux jours pour éviter un dessèchement du filtre de nitrocellulose. Après cinq jours, les racines adventives qui se sont développées depuis le point de greffes ont été éliminées en condition stérile sous une loupe binoculaire Stemi 305 (Zeiss). Les greffes réussies ont été transférées pour une culture en terre à une photopériode de 16 h de jour à 21°C et de 8 h de nuit à 18°C.

7.8. Immunoblot de JAO2 étiqueté

7.8.1. Extraction protéique

Les échantillons foliaire congelé ont été broyés à sec au Precellys Evolution (Bertin Technologies, France) avant d'être complété de 150 à 300 µL, selon la quantité de matériel foliaire broyé, de tampon de dénaturation (Tris 62,5 mM pH 6,8, urée 4 M, SDS 3 %, glycérol 10 %, bleu de bromophénol et DTT 1 mM ajouté avant utilisation) préchauffé à 95°C. Les échantillons ont été homogénéisés au Precellys Evolution (Bertin Technologies, France) avant d'être centrifugé 15 min à 21 000 g et 200 µL de surnageant a été récupéré et conservé à -20°C.

7.8.2. Quantification protéique

10 µL d'extraits protéiques ont été homogénéisés avec 200 µL d'eau et 1 mL d'amidoblack (MeOH 90 %, acide acétique 10 % et amidoblack 0,05 %) avant d'être centrifugé 15 min à 21 000 g. Les culots ont été nettoyer avec une solution de rinçage (EtOH 90 % et acide acétique 10 %) avant d'être centrifugé 15 min à 21 000 g. Les culots ont été laissés à sécher 10 à 20 min à température ambiante et ensuite ils ont été repris dans 1 mL de soude à 0,2 M. 200 µL ont été prélevé pour réaliser le dosage à 630 nm au FLUOstar Omega (BMG Labtech).

7.8.3. Immunomarquage

Les extraits protéiques ont été incubés 5 min à 56°C puis 10 µg de protéines ont été chargées et fractionnées sur un gel SDS-PAGE à 12,5 % en condition classique sur un appareil Mini Protean II™ (Biorad) avant d'être transférées sur membrane PVDF Immobilon-P Transfert membrane (Millipore). Les membranes ont été saturée 1 h à 37°C dans du PBS 1x, lait 5% et tween 0,2 % avant d'être incubées toutes la nuit à 4°C dans une dilution de 5 000 fois d'anticorps primaire anti-myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology). Les membranes ont ensuite été lavées trois fois dans la solution PBS, lait, tween avant d'être incubées 2 h dans une dilution de 10 000 fois de l'anticorps secondaire GAM (*goat anti-mouse*) couplé à la peroxydase de raifort (G21040, Life technologies). Après lavages les membranes ont été misent en contact

avec le substrat de la peroxydase Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore, lot 170763) et la révélation a été faite sous UV par un Fusion Fx (Vilber Lourmat). Les membranes ont ensuite été colorées au bleu de Coomassie et l'intensité des protéines totales a été déterminée à l'aide du logiciel Image J (<https://imagej.net/Welcome>).

7.9. Stress hydrique

Le protocole de stress hydrique a été adapté de celui de Kim *et al.*, (2017). Les plantes d'*Arabidopsis* ont été repiquées sur un mélange de terre tamisée 50 %, perlite 25 % et vermiculite 25 %. Quatre plantules ont été repiquées par pot, le poids de chaque pot a au préalable été égalisé entre 40 et 41 gramme. Chaque plantule a été arrosée avec 1 mL d'eau tous les deux jours jusqu'au début du stress. L'arrosage des plantes d'*Arabidopsis* âgés de 17 jours a été suspendu pendant 14 jours sous une photopériode de 16 h de jour à 21°C et de 8 h de nuit à 17°C. A 1, 9 et 14 jours après l'arrêt d'arrosage, quatre rosettes entières par réplica ont été récoltées, regroupées et immédiatement congelé dans l'azote liquide en vue des analyses d'expression et de métabolomique. Les échantillons ont été conservés au -80°C. Les plantes ont ensuite été réarrosées le quatorzième jour et le nombre de plantes survivantes a été compté au bout de quatre jours. Le taux de survie moyen a été calculé pour trois réplica indépendantes (n = 50).

7.10. Microscopie racinaire

Les plantules ont été mises à se développer en culture *in vitro* sur boîte verticale milieu MS comme décrit ci-dessus. Les racines des plantules de 10 jours ont été blanchit par 15 min d'incubation à 57°C dans une solution de MeOH 20 % avec HCl 0,24 N puis par 15 min d'incubation dans de l'EtOH 60 % avec 7 % de soude. Les racines ont ensuite été réhydratées par des incubations successives de 5 min dans de l'EtOH à 40, 20 puis 10 % pour finir par 15 min dans de l'EtOH 5 % complété avec 25 % de glycérol. Les racines ont été montées entre lame et lamelle dans du glycérol 50 % pour observation au microscope optique Zeiss Imager Z1 à un grossissement x 200.

7.11. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel InfoStat 2015d (<https://www.infostat.com.ar/>). Les comparaisons des moyennes des échantillons ont été effectuées par une analyse variance de type ANOVA one-way ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$) suivit par le test de comparaison multiple post-hoc de Tukey ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$) et les différences significatives entre les moyennes ont été déterminées.

CHAPITRE V.

DISCUSSION GÉNÉRALE

V. Discussion générale

1. Régulation pré- et post-JA-Ile.

Mes travaux de thèse ont permis d'étoffer les connaissances sur le métabolisme des JAs, plus précisément sur le catabolisme de la pro-hormone JA et de l'hormone JA-Ile, et leurs effets sur la signalisation JAs dépendante. D'une part la caractérisation des JAO a révélé un nouveau mécanisme régulateur qui atténue la signalisation basale en amont d'un stress et de l'induction de la synthèse de JA-Ile, que je qualifierai de régulation pré-JA-Ile dans la présente section. D'autre part l'étude des mutants multiples des voies cataboliques CYP94 et AH a apporté une meilleure caractérisation, débutée de longues dates par plusieurs équipes, de la régulation des réponses JA-Ile dépendantes en aval d'un stress, que je qualifierai de régulation post-JA-Ile. Les régulations pré- et post-JA-Ile ont toutes deux la fonction d'atténuation sur la signalisation JA-Ile dépendante, mais leur impact biologique sur la plante est très différent.

Le catabolisme post-JA-Ile par l'oxydation et la déconjugaison a pour rôle d'éliminer l'hormone active à la suite de l'induction de sa synthèse par un stimulus. Le blocage génétique de ces voies résulte en un impact métabolique fort : une suraccumulation de JA-Ile, particulièrement importante chez le mutant altéré pour les deux voies cataboliques, associé à une diminution drastique de l'accumulation des catabolites (Marquis et al., 2020). Cependant, contrairement à ce qui pouvait être attendu, la suraccumulation de JA-Ile génère un gain de résistance aux pathogènes nécrotrophes et aux insectes herbivores modéré voir nul (Marquis et al., 2020). La surabondance de JA-Ile induit, de façon stimulus et génotype dépendant, la sur-induction des répresseurs JAZ, JAM et JAV qui définissent de puissantes boucles de rétroaction négatives réprimant le gain de signalisation défensive et de résistance (Marquis et al., 2020). La synthèse de ces travaux démontre que le catabolisme post-JA-Ile a un impact fort sur le métabolisme des JAs mais modéré sur la signalisation défensive et la résistance. Les différents génotypes générés, altérés dans les voies cataboliques post-JA-Ile (*2ah*, *3cyp* et *5ko*), peuvent servir d'outils pour aider à comprendre comment les boucles de rétrocontrôles négatives sont induites et limitent les réponses JAs dépendantes, en réponses à différentes situations physiologiques, en condition de suraccumulation de JA-Ile.

Le catabolisme pré-JA-Ile par les JAO, et principalement JAO2, est un mécanisme nouvellement décrit qui a pour rôle de consommer la pro-hormone à l'état basale pour la détourner du flux de formation du JA-Ile. Ce nouveau mécanisme souligne l'importance de la métabolisation de traces de JA dans les tissus non stimulés, qui a été négligée jusqu'à présent du fait que la majorité des recherches sur la régulation des JAs se concentrent sur la synthèse et la signalisation induite. Contrairement au blocage du catabolisme post-JA-Ile, l'inactivation

de JAO2 a un impact subtil sur l'abondance des JAs : il n'est pas observé une suraccumulation de son substrat JA ou de JA-Ile à l'état basal par exemple (Smirnova et al., 2017). Cependant, un impact fort est observé sur la signalisation JA-Ile qui est activée à l'état basal et résulte en un gain de résistance spectaculaire aux stress biotiques et abiotiques, [partie 3 du chapitre III](#), (Smirnova et al., 2017). Ce mécanisme d'atténuation JAO dépendant démontre que la synthèse et l'accumulation de JA à l'état basale est suffisante pour causer une signalisation JA-Ile en absence de régulation.

L'homéostasie catabolique des JAs se révèle aujourd'hui plus complexe avec des mécanismes spécifiques à l'atténuation de la signalisation JA-Ile basale (JAO) et induite (CYP94 et AH), probablement pour permettre une signalisation optimale selon les situations physiologiques. Un point commun intéressant entre les régulations pré- et post-JA-Ile est le découplage entre les niveaux d'accumulations de l'hormone et les niveaux d'expression des gènes de réponses. Par ailleurs, l'étude de Scholz *et al.*, 2015 a démontré qu'un traitement au coronalon induit l'expression de *LOX2* et *AOS* mais aucune suraccumulation de JA ou JA-Ile n'est observé (Scholz et al., 2015). Cette étude et nos résultats démontrent que l'accumulation des métabolites ne corrèle pas systématiquement avec l'expression des gènes de biosynthèses et de réponses, démontrant que l'accumulation de l'hormone ne fournit pas une représentation stricte de la signalisation.


L'activation de la signalisation est mesurée par l'augmentation de l'accumulation de l'hormone car le plus souvent l'amplitude des réponses JA-Ile dépendantes est proportionnelle à la dynamique d'accumulation de l'hormone (Heitz et al., 2019). Néanmoins l'accumulation de JA-Ile n'est détectable que lorsque la biosynthèse excède le catabolisme. Cette mesure équivaut à une estimation de la quantité synthétisée de JA-Ile et sous-estime fortement le flux hormonale. Mes travaux de thèse révèlent effectivement, dans le cas de la caractérisation de *jao2*, une signalisation activée par un flux (continu ?) plus important de JA-Ile, sans suraccumulation de l'hormone due à l'activation en parallèle du catabolisme post-JA-Ile ([Figure 4.23 et 4.24](#)) (Smirnova et al., 2017). De plus, le mutant *5ko* prouve que la suraccumulation massive de JA-Ile peut être sans impact sur le résultat défensif de la signalisation. L'élucidation de ces mécanismes inconnus de blocage serait un enjeu de recherche important. Ces résultats signifient que le flux hormonale aurait un impact biologique signalétique bien plus important que la quantité accumulé à un temps donné. Pour les futures recherches, il serait primordial de chercher à définir le flux plus que l'accumulation du JA-Ile pour estimer l'effet réel sur l'activation de la signalisation. Cependant le flux métabolique est difficile à mesurer, nous l'avons évalué indirectement par la mesure de l'accumulation des catabolites plus stables, mais ça reste une estimation. Le flux de JA-Ile est également dépendant de l'activité des enzymes qui catalysent les conversions métaboliques entre les

différents JAs. On pourrait mesurer leurs expressions et activités, néanmoins une enzyme peut-être présente et ne pas catalyser car le flux est bloqué ailleurs. En définitive, les mécanismes régulateurs du flux hormonal de JA-Ile auraient un impact sur la signalisation des réponses plus conséquent que l'hormone elle-même chez *Arabidopsis thaliana*.

Ces notions sont discutées plus exhaustivement dans une revue récemment écrite par mon directeur de thèse (Heitz et al., 2019) et reproduite ci-dessous.

La découverte et la caractérisation du mécanisme d'atténuation par les JAO a permis d'ouvrir un nouveau champ de recherche sur les JAs. D'abord identifié chez *Arabidopsis*, le mécanisme a ensuite été décrit chez *Nicotiana attenuata* dont le génome contient quatre *NaJAO*, homologues des *AtJAO* (Tang et al., 2020). Dans cette étude, la caractérisation des *NaJAO* arrive aux mêmes résultats que chez *Arabidopsis* : la déficience des quatre *NaJAO* augmente fortement les niveaux de défenses JA-Ile dépendantes et la résistance à l'insecte *Spodoptera litura*, sans altérer de manière détectable la croissance (Tang et al., 2020). Il est possible que les JAO aient des homologues dans nombres de plantes et que leur fonction soit conservée. Ensuite, une étude récente montre que la voie d'hydroxylation du JA est impliquée dans la régulation métabolique de la croissance en conditions d'évitement de l'ombre (Fernández-Milmanda et al., 2020). La perception de l'ombre par le phytochrome B résulte en une diminution de la signalisation JAs pour atténuer la répression de la croissance et du syndrome d'évitement de l'ombre (Fernández-Milmanda et al., 2020). PhyB active l'expression du gène *ST2a*, qui métabolise le 12OH-JA (Figure 1.9), le produit potentiel des JAO, corrélé à la consommation de la pro-hormone JA, atténuant la signalisation JA-Ile (Fernández-Milmanda et al., 2020). L'impact de *ST2a* sur l'évitement de l'ombre reproduit le mécanisme d'atténuation médié par *JAO2* que nous avons décrit (Smirnova et al., 2017; Fernández-Milmanda et al., 2020). Les auteurs ont également montré que *JAO2* et *JAO4* ne sont pas induits par la perception de l'ombre, amenant à la conclusion que c'est la régulation par *ST2a*, via PhyB, qui est critique pour le contrôle de la signalisation jasmonates en réponse à l'évitement de l'ombre. Cependant comme *ST2a* métabolise le produit des JAO, on pourrait supposer que *JAO3* ou *JAO1* serait également induit par PhyB, permettant la métabolisation du JA en OH-JA puis en HSO₄-JA. Cet étude appuie d'une part que les JAO pourraient avoir un impact en réponse à un stimulus et, d'autre part, que le mécanisme d'atténuation pourrait se constituer d'étapes métaboliques en plus de l'oxydation du JA.

Metabolic Control within the Jasmonate Biochemical Pathway

Thierry Heitz ^{*}, Ekaterina Smirnova, Valentin Marquis and Laure Poirier

Centre National de la Recherche Scientifique (IBMP-CNRS), Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Université de Strasbourg, 12 rue du General Zimmer, 67000 Strasbourg, France

*Corresponding author: E-mail, thierry.heitz@ibmp-cnrs.unistra.fr; Fax, +33 367 155 300.

(Received July 2, 2019; Accepted August 22, 2019)

Regulation of defense and developmental responses by jasmonates (JAs) has been intensively investigated at genetic and transcriptional levels. Plasticity in the jasmonic acid (JA) metabolic pathway as a means to control signal output has received less attention. Although the amplitude of JA responses generally follows the accumulation dynamics of the active hormone jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), emerging evidence has identified cases where this relationship is distorted and that we discuss in this review. JA-Ile is turned over in *Arabidopsis* by two inducible, intertwined catabolic pathways; one is oxidative and mediated by cytochrome P450 enzymes of the subfamily 94 (CYP94), and the other proceeds via deconjugation by amidohydrolases. Their genetic inactivation has profound effects on JAs homeostasis, including strong JA-Ile overaccumulation, but this correlates with enhanced defense and tolerance to microbial or insect attacks only in the absence of overinduction of negative signaling regulators. By contrast, the impairment of JA oxidation in the *jasmonic acid oxidase 2* (*jao2*) mutant turns on constitutive defense responses without elevating JA-Ile levels in naive leaves and enhances resistance to subsequent biotic stress. This latter and other recent cases of JA signaling are associated with JA-Ile catabolites accumulation rather than more abundant hormone, reflecting increased metabolic flux through the pathway. Therefore, manipulating upstream and downstream JA-Ile homeostatic steps reveals distinct metabolic nodes controlling defense signaling output.

Keywords: *Arabidopsis* • Hormone catabolism • JA-Ile • Negative feedback • Signaling • Tolerance.

Introduction

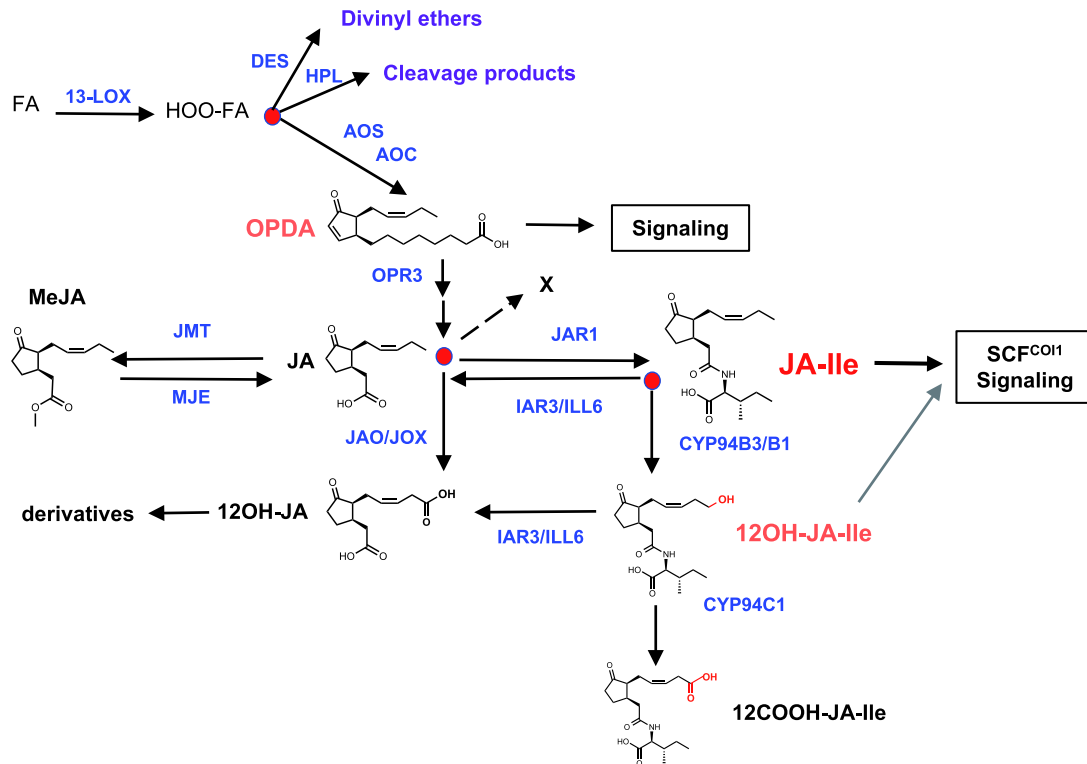
Jasmonates (JAs) regulate major sectors of immune responses and also mediate developmental processes related to growth or fertility (Yuan and Zhang 2015, Campos et al. 2016, Heitz et al. 2016, Wasternack and Song 2017). Induced stress responses constitute useful models to decipher JA metabolism and signaling because they allow to analyze tissues from an initial nonstressed, repressed state through the successive steps leading to full induction of a defended or adapted state (Widemann et al. 2016).

JAs belong to the larger family of plant oxygenated fatty acid (FA) derivatives called phytooxylipins that often display signaling

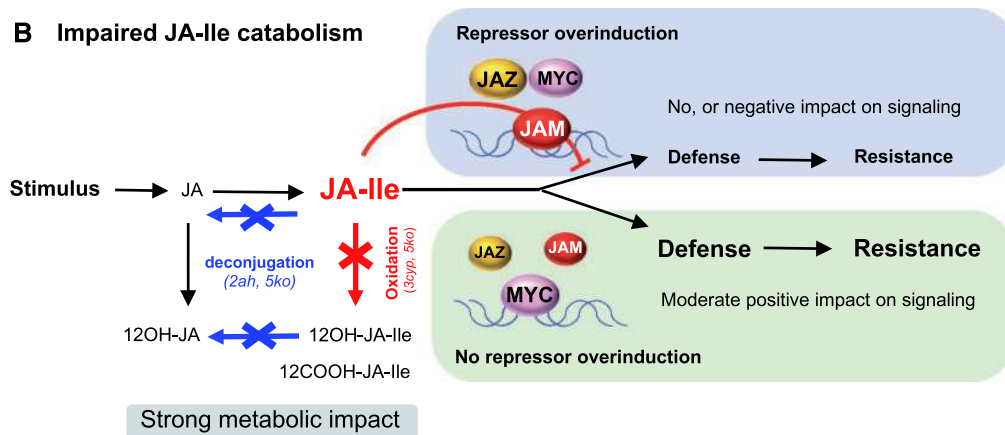
activities and/or mediate responses to environmental cues (Wasternack and Feussner 2018). The individual enzymes leading to jasmonic acid (JA) biosynthesis have been extensively and repeatedly reviewed (for recent examples, see Wasternack and Song 2017; Koo 2018; Wasternack and Strnad 2018) and will not be detailed here. JA synthesis is only one of the many possible metabolic routes arising from such lipid-derived precursors and yet JAs play tremendous roles in the adaptation of plants to their ever-changing environment. Their formation is known to be in competition with other metabolic routes branching at several steps in the oxylipin pathway (Wasternack and Feussner 2018). As new enzymatic steps are being elucidated, their functional characterization suggests coordinated and complex control of JA metabolism on hormonal signaling. The present mini-review will focus on the integration of metabolic diversion and elimination mechanisms and their differential impacts on JA signaling. Recent data indicate unexpected positive and negative regulatory loops that will be discussed.

Enzymatically generated oxylipins are classified broadly into 9- and 13-derivatives, according to the site of action of lipoxygenase (LOX) on C18 FA. The 13-hydroperoxide of linolenic acid (C18:3) is the main source leading to JA through the allene oxide synthase (AOS)—allene oxide cyclase (AOC) pathway, but this intermediate is also competitively consumed by the hydroperoxide lyase pathway (HPL), and in addition by divinyl ether synthase (DES) in some plants (Fig. 1A). HPL generates C6 or C9 mostly volatile compounds that act in plant–insect interactions (Chehab et al. 2008) and DES produces derivatives that are toxic to microorganisms (Fammartino et al. 2007). All three enzymes belong to the atypical cytochrome P450 subfamily CYP74 (Howe and Schillmiller 2002, Matsui 2006). Genetic studies in rice have shown that HPL-depleted lines overaccumulated JA at the expense of green leaf volatiles and exhibited altered defensive traits along with a lesion mimic phenotype, but the molecular basis of this latter developmental phenotype is unclear (Liu et al. 2012). 13-HOO-FA is usually generated in or within chloroplasts, which offers multiple possibilities for compartmentation and directed substrate consumption. Recent biochemical, protein–protein interactions and structural modeling uncovered the existence of a LOX2–AOS–AOC2 complex excluding concurrent HPL in *Arabidopsis* chloroplasts (Pollmann et al. 2019). This indicates a supramolecular enzyme organization that may facilitate enzyme catalysis toward the JA branch (Fig. 1A). Determining whether this results from HOO-FA substrate(s) channeling through this complex will need additional biochemical and genetic analyses.

A Metabolic nodes in the JA/JA-Ile pathway



B Impaired JA-Ile catabolism



C Impaired JA oxidation by JAO2

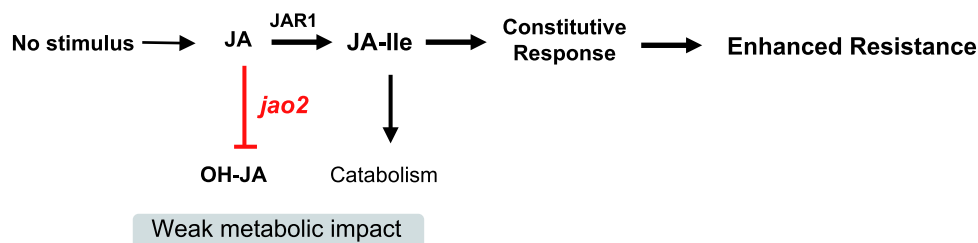


Fig. 1 Metabolic bifurcations in the JA biochemical pathway generate complexity and impact jasmonate signaling in flowering plants. (A) Jasmonate biosynthesis from C18:3 FA arises when metabolic flux follows required paths at specific branching points. Some compounds in the

Once JA is formed, it can be further metabolized through many enzymatic modifications, including hydroxylation, sulfation, glucosylation, conjugation to amino acids or decarboxylation, and for some compounds specialized biological activities were described (Heitz et al. 2016, Widemann et al. 2016, Wasternack and Song 2017, Koo 2018, Wasternack and Strnad 2018). In early studies, JA was considered as the bioactive form because of its ability to induce powerfully broad spectrum responses, hence a number of JA derivatives were considered as potential JA inactivation forms. However, rigorous evidence for loss of activity was generally lacking (Gidada et al. 2003, Miersch et al. 2008), and these notions need to be reassessed in light of recent findings. In all cases, JA being potentially metabolized by different routes, it constitutes a second important regulatory node controlling flux more downstream in the oxylipin pathway (Fig. 1A). Following initial evidence (Staswick and Tiryaki 2004), more than a decade of research has established in numerous plant species that the conjugation of JA to isoleucine by jasmonate-resistant 1 (JAR1) is the critical activation step that generates the master jasmonate signal jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) (Browse 2009). However, the precise factors that determine when and how much of a given JA pool is converted to JA-Ile are still largely unknown. Since the seminal discoveries that JA-Ile perception relies on coronatine insensitive 1 (COI1) recruitment and degradation of jasmonate-zim domain (JAZ) repressors (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007), many other protein players were identified that contribute positively or negatively to modulate target gene transcriptional de-repression (Howe et al. 2018). Among those, jasmonate-associated MYC2-like (JAM) proteins also named MYC2-targeted basic helix loop helix (MTBs) are atypical bHLH proteins that compete with MYC transcription factors and restrain gene expression in a negative feedback loop (Nakata et al. 2013; Sasaki-Sekimoto et al. 2013; Liu et al. 2019). In addition, the recent characterization of several catabolic steps in the JA metabolic pathway has provided a framework to investigate the link between hormone formation, accumulation and modification, and actual defense signaling output.

Induced vs. Basal JA Levels

The current model of JA biosynthesis regulation assumes that most JA biosynthetic enzymes are present at basal levels

(Stenzel et al. 2003; Schaller and Stintzi 2009) in nonstimulated tissues. At least in situations involving physical injury like wounding/herbivory or microbial infections, decompartmentation brings in contact cellular components that are normally separated and activates early signaling events. Complex calcium channel patterns are activated both locally and systemically. cyclic nucleotide gated channel19 (CNGC19) is a Ca^{2+} channel regulating intravascular, herbivory-induced Ca^{2+} influxes that are essential for inducing JA-Ile biosynthesis and further defense (Meena et al. 2019). Under resting conditions, JA levels are maintained low by a protein complex termed JJW and involving the negative regulator jasmonate-associated VQ motif gene 1 (JAV1), JAZ8 and WRKY51 that targets JA biosynthetic genes. Upon injury, calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1 disintegrates JJW, resulting in JA biosynthesis activation (Yan et al. 2018). Long-distance defense signaling to undamaged leaves is mediated by the translocation of mobile signals, including surface involving membrane depolarizations (Mousavi et al. 2013) and calcium waves mediated by glutamate-gated calcium channels of the glutamate-receptor-like (GLR) family (Mousavi et al. 2013). A whole set of novel highly specific reporter and sensor Arabidopsis lines were reported recently and allowed to visualize the sequence and dynamics of rapid long-distance signals, and JA-Ile action sites at cell-type resolution (Larrieu et al. 2015; Nguyen et al. 2018; Toyota et al. 2018). In addition, JAs themselves can be mobile; e.g. OPDA needs to be translocated over long distances to mediate shoot-triggered responses in Arabidopsis roots (Schulze et al. 2019). This adds on an earlier grafting study in tomato indicating that systemic leaf-to-leaf signaling requires both the biosynthesis of JA at the site of wounding and the ability to perceive a jasmonate signal in remote tissues (Schilmiller and Howe 2005). However, how these events relate to the initial lipolytic activities needed to provide the free FA precursors for JA synthesis is unknown. FA-generating enzymes are complex/multigenic and their mode(s) of activation and possible interplay are still poorly understood (Ellinger et al. 2010, Grienberger et al. 2010, Scherer et al. 2010, Wang et al. 2018). All these data conceptualize signaling cascades triggered by an external cue and that result in local and frequently systemic elevations of JAs content of tissues. Accordingly, most JA biosynthetic genes are JA-inducible (Sasaki et al. 2001), but the well-admitted concept of an amplification loop where JA induces its own synthesis was refuted by feeding experiments (Miersch and Wasternack 2000, Scholz

Fig. 1 Continued

pathway are substrates of more than one enzyme activity and, therefore, constitute nodes (red dots) through which flux can be diverted toward distinct end products. For example, JA-Ile homeostasis and accumulation is affected upstream by input into the AOS branch, then by the fate of JA, and finally by its own catabolic pathways. The dotted line leading to X refers to additional JA modification routes that are not depicted in the scheme. Enzymes are shown in blue. Compounds indicated in color possess demonstrated biological activity. (B) Biotic stimuli trigger a burst of JA-Ile accumulation that is cleared by CYP94-mediated oxidation or by amidohydrolase-mediated deconjugation. The stimulus-dependent contribution of each catabolic pathway to JA-Ile elimination has been determined using mutants impaired in either one (*3cyp*, *2ah*) or both (*5ko*) pathways. In these lines, the stress-induced JA profile is strongly modified, showing the severe metabolic impact of mutations. Enhanced defense and resistance to biotic stress is observed when deficient JA-Ile catabolism is not correlated with overinduction of *JAZ* or *JAM* genes encoding negative regulators. (C) Soluble JAO enzymes define a direct JA oxidation route to OH-JA. Impairment of JAO2 results in constitutive expression of JA-Ile dependent defense markers in leaves, and strong resistance to subsequent biotic stress. This occurs with a weak metabolic impact without prior JA-Ile elevation, but detectable JA-Ile catabolites before stress indicate increased flux through the pathway.

et al. 2015). Therefore, additional regulatory levels must exist and prevent amplified transcripts to result in increased biosynthetic output.

By contrast, under resting conditions, undamaged leaves of mature plants contain barely detectable levels of JA (Glauser et al. 2008, Koo et al. 2009, Heitz et al. 2012). This fits well with the current model assuming that JAs, particularly JA-Ile, needs to accumulate sufficiently and act as a ligand to trigger a COI1-dependent destabilization of JAZ repressors and release subsequent JA responses. We review in the following sections two main advances in our understanding of JA hormone homeostasis, and evaluate how genetic modification in post- and pre-JA-Ile metabolic steps have distinct impacts on JA signaling. Recent evidence highlights considerable control of JA-Ile signaling output in both noninduced and induced states: we emphasize that on the one hand basal JA metabolism is not always nonsignificant, and on the other hand that excessive JA-Ile bursts are powerfully counteracted, possibly to prevent runaway defense.

JA-Ile Catabolic Circuitry and Its Impact on Signaling

To a large extent, in wild-type (WT) plants, jasmonate responses are proportional to the dynamics (timing and amplitude) of JA-Ile accumulation: the higher the hormone builds-up, the more robust the response(s). This relationship has been challenged in recent years by the detailed characterization of two enzymatic JA-Ile catabolic pathways and their study in Arabidopsis leaf defense, which was initiated by the identification of oxidized forms of JA-Ile in wounded leaves (Glauser et al. 2008). The candidate genes encoding JA-Ile catabolic activities are strongly coregulated with JA biosynthetic and signaling genes, facilitating their discovery. The first pathway is defined by cytochrome P450 of the CYP94 family: CYP94B3 and B1 are JA-Ile ω -hydroxylases generating 12OH-JA-Ile, and CYP94C1 catalyzes a more complete JA-Ile oxidation to 12COOH-JA-Ile (Fig. 1A). Initial in vitro pull-down assays and feeding experiments have shown that 12OH-JA-Ile retains some co-receptor-assembling and gene-inducing activities relative to JA-Ile, and that 12COOH-JA-Ile is fully inactive in both assays (Koo et al. 2011, Koo et al. 2014, Aubert et al. 2015). Ectopic overexpression of CYP94 enzymes in different labs led to the consensus findings that JA-Ile oxidation attenuates JA transcriptional responses, weakens resistance to JA-defended insect or fungus attacks and compromises male fertility, due to increased JA-Ile turnover (Koo et al. 2011, Heitz et al. 2012, Koo et al. 2014, Aubert et al. 2015). Loss-of-function Arabidopsis *cyp94* mutants have proven more difficult to phenotype due to gene redundancy. Initial analysis readily evidenced that single or double *cyp94* mutant lines sustained more persistent JA-Ile accumulation upon wounding, along with depleted oxidation products (Kitaoka et al. 2011, Koo et al. 2011, Heitz et al. 2012). But here, only marginal and transient increase in JA-Ile-responsive gene expression was found, including enhanced expression of some JAZ repressors. A simple explanation would be that in such mutants, at peak accumulation upon wounding, excessive JA-

Ile abundance is saturating signaling capacities, and no stronger response can be delivered. However, higher-order mutants provided more complex patterns and point to the existence of hard-wired safeguards. Surprisingly, despite of blocked oxidation steps and high JA-Ile levels, double *cyp94b1b3* and triple *cyp94b1b3c1* (henceforth called *b1b3* and *b1b3c1*) mutants were reported counterintuitively to display symptoms of deficient JA-Ile signaling, including reduced wound-induced growth inhibition, reduced anthocyanin and increased susceptibility to insects, at odds with the current signaling model (Poudel et al. 2016). To add on this unexpected behavior, in another study, the *b1b3c1* line sustained less multiplication of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* than WT, despite of the normal JA-Ile accumulation (Aubert et al. 2015).

The second JA-Ile catabolic pathway acts by deconjugation through amidohydrolase (AH) activity, first described in *Nicotiana attenuata* (Woldemariam et al. 2012) and then characterized as the IAR3 and ILL6 enzymes in Arabidopsis (Widemann et al. 2013). IAR3 was known previously as cleaving auxin conjugates and acts thus as a bifunctional enzyme mediating cross-talk between JA and auxin signaling (Zhang et al. 2016). *iar3* but not *ill6* mutant displayed enhanced wound-induced JA-Ile accumulation, and both lines had higher 12OH-JA-Ile content (Widemann et al. 2013, Koo et al. 2014). This is consistent with IAR3 and ILL6 enzymes also hydrolyzing CYP94-generated 12OH-JA-Ile, defining an indirect biosynthetic route for 12OH-JA formation (Widemann et al. 2013, Zhang et al. 2016). As for CYP94, AH-overexpressing-lines generated symptoms of JA-Ile deficiency (Zhang et al. 2016), conclusively showing that the primary function of both pathways is in the attenuation of JA responses. IAR3- or ILL6-deficient lines have only partially been analyzed in these initial studies that did not investigate their behavior for induced defenses. In addition to gene redundancy within CYP94 and AH families, compensation mechanisms occur when mutant(s) defective in one pathway overinduce genes/enzymes of the other pathway (Widemann et al. 2013). These dispersed and incomplete data have hampered a global understanding of the functions and impacts of JA-Ile catabolism on downstream responses.

This problem was recently overcome in a report by Marquis et al. (2019) where higher-order mutant lines, fully deficient in either one (triple *cyp94b1b3c1*, named *3cyp* or double amidohydrolase, named *2ah*) or both (quintuple mutant, named *5ko*) JA-Ile catabolic pathways were analyzed (Fig. 1B). Striking differences of impacts were found when these lines were submitted either to mechanical wounding or to infection by *B. cinerea*. CYP94 and AH pathways were found to contribute similarly to shape JA-Ile dynamics upon wounding. In *5ko*, JA-Ile accumulated to unprecedented high levels, indicating that hormone elimination was essentially disrupted in this line. In striking contrast, in *B. cinerea* infected leaves, *3cyp* largely suppressed JA-Ile oxidation but with no change in JA-Ile levels relative to WT. This result and the highly enhanced JA-Ile levels in infected *2ah* and *5ko* leaves showed that, upon fungal attack, the AH pathway predominates to turnover JA-Ile. Yet, in both biological systems, induced defense responses and pathogen/insect resistance poorly correlated with

engineered JA-Ile levels: it was found that impaired JA-Ile catabolism results in prolonged defense and increased pest tolerance only if *JAZ* and *JAM* genes are not themselves overinduced, and this occurs in a stress- and pathway-specific manner. *JAM* constitutes an atypical subclass of bHLH factors that compete with and inhibit the action of MYC transcription factors (Nakata et al. 2013, Sasaki-Sekimoto et al. 2013, Liu et al., 2019). In most cases, exaggerated JA-Ile accumulation leads to stronger or more persistent repressor expression, particularly in *5ko*, and no ameliorated defense. Only *2ah* after wounding, and *3cyp* after infection did not display this enhanced feedback expression of *JAZ* and *JAM* repressors, and consistently, these lines are more resilient to insect feeding and fungal infection, respectively (Marquis et al. 2019). These data suggest that signaling is under strong negative feedback control in Arabidopsis and indicate that taking advantage of reduced JA-Ile catabolism requires a prior understanding of the mechanisms of this feedback, particularly what factor(s) determine the transcriptional response of the repressors. This does not exclude that other factors (timing, acclimation) might influence the level of pathway output. It is also remarkable that *2ah*, *3cyp* or *5ko* lines exhibit no constitutively elevated JA-Ile or defenses in the absence of stimulation.

It is not yet known how these conclusions can be generalized, because in *N. attenuata*, the inhibition of CYP94 or AH enzymes extends the half-life of JA-Ile as in Arabidopsis, but this results in stronger direct and indirect defense output, culminating in better performance against insect attacks (Woldemariam et al. 2012, Luo et al. 2016). Another complication of the interpretation is that 12OH-JA-Ile, the product of CYP94B enzymes, was recently shown to display significant COI-dependent signaling activity (Poudel et al. 2019). The drastically modified levels of this compound in the mutants discussed above may also alter signaling but no unified conclusion can be drawn. JA-Ile catabolism has been associated with other traits in *Poacea*, such as abiotic stress tolerance and reproduction. *OsCYP94C2* overexpression results in better survival after salt stress in rice (Kurotani et al. 2015), but an allele conferring lower expression of *OsCYP94B4* (*HAN1*), and thus reduced JA-Ile catabolism, was key to rice adaptation to temperate climate during domestication (Mao et al. 2019). Also, a sexual differentiation defect in maize flowers is due to ectopic overexpression of *ZmCYP94B1* that interrupts JA signaling in *Tasselseed5* (*Ts5*) mutant (Lunde et al. 2019). The systematic characterization of CYP94 and AH gene families in crop species is just beginning (Hazman et al. 2019) and should disclose further implications of JA-Ile catabolism in the control of JA-regulated processes.

JA Flux Diversion as a Means to Control JA-Ile Signaling

A recent breakthrough in JA metabolic biology has identified another node of regulation based on JA oxidation to HO-JA, upstream of JA-Ile formation (Fig. 1C). A new subclade of four JA-coregulated genes within the versatile 2-oxoglutarate/Fe(II) dioxygenase (2ODD) family was characterized and named

jasmonate-induced oxygenases (JOX; Caarls et al. 2017) or *jasmonic acid oxidases* (JAO; Smirnova et al. 2017). Similarly to other plant hormonal pathways (Hagel and Facchini 2018), specific 2ODDs have been recruited in JA metabolism to fulfill important functions. All four recombinant JAO/JOX proteins equally oxidize JA to HO-JA, presumably 12OH-JA, but a specific physiological function could be associated with JAO2, owing to its higher basal expression in leaves. Basal JAO2 expression occurs in leaves even in the *coi1* perception mutant, whereas JAO wound- and pathogen-induction is fully COI1-dependent. Opposite to manipulated JA-Ile catabolism, impairing JAO2 has little measurable influence on JA profiles, but turns on signaling in a way that strongly enhances biotic stress tolerance. Even with no stimulation, *jao2* mutants exhibit constitutive expression of JA-Ile-dependent defenses in leaves that translate into stronger resistance to *B. cinerea* infection, and a quadruple *jox* mutant line also displayed less damage after insect feeding (Caarls et al. 2017, Smirnova et al. 2017). The *jao2* phenotype requires JA-Ile biosynthesis and signaling, but interestingly, naive leaves do not show increased basal accumulation of the hormone. Instead, JAO2-deficient lines display signs of increased flux through the JA-Ile metabolic pathway, as indicated by an elevated content in JA-Ile catabolites (Smirnova et al. 2017). Therefore, JAO2 defines a metabolic diversion rather than an inactivation mechanism in WT plants where some basal, inactive JA pool is oxidized to 12HO-JA and this contributes to maintain JA-Ile-regulated defense responses repressed to minimal levels in unstressed leaves (Fig. 1C). This important finding reveals that basal JA catabolism does have an important impact on signaling: some JA is constantly formed at trace levels in unstimulated leaves and its JAO2-mediated oxidation is critical to prevent conjugation to JA-Ile and subsequent signaling. *JAO/JOX* genes are also stress-inducible along with most of the genes of the JA pathway, but the significance of their inducibility has yet to be determined. It will be also of interest to determine if JAO orthologs in crop species have also regulatory functions.

JA Signaling without Increase in JA-Ile

The notion that JA-Ile signaling can occur without measurable increase in JA-Ile has received wider support recently. Touch-induced changes in Arabidopsis morphology and growth retardation depend on enzymatic gibberellin breakdown (Lange and Lange 2015), but JA signaling is also clearly activated by repeated touching (Chehab et al. 2012), and was found associated with a JA profile reminiscent of active JA-Ile catabolism while JA-Ile levels remained unchanged (M. and T. Lange and T. Heitz, unpublished data). In a recent report, it was shown that short-term exposure of Arabidopsis to gaseous NO₂ triggers JA signaling and pathogen resistance, supported by the upregulation of numerous genes in JA metabolism (Mayer et al. 2018). Consistently, examination of the JA profile indicated that JA and JA-Ile levels were not affected by NO₂ fumigation, but the catabolites 12OH-JA, 12OH-JA-Ile and 12COOH-JA-Ile were accumulated upon treatment. These cases illustrate that

specific genetic lesions or mild stimuli can efficiently turn on JA signaling, with simultaneous JA-Ile biosynthesis and catabolism permitting hormone perception without a rise in its steady-state levels. JA-Ile accumulates generally in response to stronger stimuli when its biosynthesis temporarily exceeds turnover.

Future Prospects

The recent metabolic studies reviewed here have shed light on new levels of regulation in the JA/JA-Ile pathway. The whole biochemical pathway, starting from the fate of precursor FA, is highly flexible and many branching points can affect the dynamics of JA-Ile formation/accumulation. Manipulation of upstream or downstream JA-Ile homeostatic steps has revealed distinct constraints on hormonal signaling output that are as many challenges for future research. For example, it is unexplained why contrary to JAO2, CYP94 or AH deficiency does not result in constitutive JA signaling. Is 12OH-JA-Ile just a less effective receptor ligand or does it hold peculiar signaling properties? Do microbial pathogens or other aggressors manipulate further steps in the JA pathway (Gimenez-Ibanez *et al.* 2016)? Fungus-produced 12OH-JA has been proposed to inhibit JA defense signaling in rice by an unknown mechanism (Patkar *et al.* 2015), but no gene-regulating properties could yet be assigned to this compound in *Arabidopsis* (Smirnova *et al.* 2017). It is not known if the JA metabolic grid is complete, and new conversion steps may confer additional complexity. How does JA metabolism impact growth or specific developmental steps? Broader approaches are certainly needed to capture further dimensions of the regulatory network: metabolic fluxes should be better apprehended because snapshot measurements of compounds can be misleading as to the real activity of a pathway. Mass spectrometry-based imaging could also help achieve a better tissular resolution of the spatial distribution of active and inactive JAs and complement hormone transport studies which also reveal new actors and mechanisms (Li *et al.* 2017, Guan *et al.* 2019, Schulze *et al.* 2019). Finally, (sub-)cellular biology of JA compounds is far from being fully understood: e.g. is JA generated by AH activity handled like neosynthesized JA, or are there subpools with different fates? Or, how can COI1 be activated at seemingly constant (basal) JA-Ile levels in the *jao2* mutant or in other situations? The field offers many promising opportunities for development, and important novel insights are expected.

Funding

Work in the T. Heitz group described in this review was supported by basic funding of CNRS [grant ANR-12-BSV8-005] (Jasmonox) from the Agence Nationale de la Recherche to E.S., and IdEx-2014-208e Interdisciplinary grant to L.P. from Université de Strasbourg and CNRS. V.M. is a recipient of a predoctoral fellowship from the Université de Strasbourg and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Acknowledgments

We apologize to colleagues whose work could not be cited due to space limitations.

Disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F. and Heitz, T. (2015) CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to *Botrytis cinerea* infection. *J. Exp. Bot.* 66: 3879–3892.
- Browse, J. (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 183–205.
- Caarls, L., Elberse, J., Awwanah, M., Ludwig, N.R., de Vries, M., Zeilmaker, T., *et al.* (2017) *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114: 6388–6393.
- Campos, M.L., Yoshida, Y., Major, I.T., de Oliveira Ferreira, D., Weraduwage, S.M., Froehlich, J.E., *et al.* (2016) Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nat. Commun.* 7: 12570.
- Chehab, E.W., Kaspi, R., Savchenko, T., Rowe, H., Negre-Zakharov, F., Kliebenstein, D., *et al.* (2008) Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PLoS One* 3: e1904.
- Chehab, E.W., Yao, C., Henderson, Z., Kim, S. and Braam, J. (2012) *Arabidopsis* touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Curr. Biol.* 22: 701–706.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., *et al.* (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666–671.
- Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I.I., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., *et al.* (2010) DONGLE and DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiol.* 153: 114–127.
- Fammartino, A., Cardinale, F., Gobel, C., Mene-Saffrane, L., Fournier, J., Feussner, I., *et al.* (2007) Characterization of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in tobacco. *Plant Physiol.* 143: 378–388.
- Gidda, S.K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C. and Varin, L. (2003) Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 17895–17900.
- Gimenez-Ibanez, S., Chini, A. and Solano, R. (2016) How microbes twist jasmonate signaling around their little fingers. *Plants (Basel)* 5, doi: 10.3390/plants5010009
- Glaser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E.E. and Wolfender, J.L. (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J. Biol. Chem.* 283: 16400–16407.
- Grienerberger, E., Geoffroy, P., Mutterer, J., Legrand, M. and Heitz, T. (2010) The interplay of lipid acyl hydrolases in inducible plant defense. *Plant Signal. Behav.* 5: 1181–1186.
- Guan, L., Denkert, N., Eisa, A., Lehmann, M., Sjuets, I., Weiberg, A., *et al.* (2019) JASSY, a chloroplast outer membrane protein required for jasmonate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116: 10568–10575.

- Hagel, J.M. and Facchini, P.J. (2018) Expanding the roles for 2-oxoglutarate-dependent oxygenases in plant metabolism. *Nat. Prod. Rep.* 35: 721–734.
- Hazman, M., Suhnel, M., Schafer, S., Zumsteg, J., Lesot, A., Beltran, F., et al. (2019) Characterization of jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) hormonal catabolic pathways in rice upon wounding and salt stress. *Rice (N Y)* 12: 45.
- Heitz, T., Smirnova, E., Widemann, E., Aubert, Y., Pinot, F. and Menard, R. (2016) The rise and fall of jasmonate biological activities. *Subcell. Biochem.* 86: 405–426.
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Desaubry, L., et al. (2012) Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone Jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *J. Biol. Chem.* 287: 6296–6306.
- Howe, G.A., Major, I.T. and Koo, A.J. (2018) Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69: 387–415.
- Howe, G.A. and Schillmiller, A.L. (2002) Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 230–236.
- Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., et al. (2011) Arabidopsis CYP94B3 encodes jasmonoyl-L-isoleucine 12-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of jasmonate. *Plant Cell Physiol.* 52: 1757–1765.
- Koo, A.J. (2018) Metabolism of the plant hormone jasmonate: a sentinel for tissue damage and master regulator of stress response. *Phytochem. Rev.* 17: 51–80.
- Koo, A.J., Cooke, T.F. and Howe, G.A. (2011) Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 9298–9303.
- Koo, A.J., Gao, X., Jones, A.D. and Howe, G.A. (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. *Plant J.* 59: 974–986.
- Koo, A.J., Thireault, C., Zemelis, S., Poudel, A.N., Zhang, T., Kitaoka, N., et al. (2014) Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 289: 29728–29738.
- Kurotani, K., Hayashi, K., Hatanaka, S., Toda, Y., Ogawa, D., Ichikawa, H., et al. (2015) Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant Cell Physiol.* 56: 779–789.
- Lange, M.J. and Lange, T. (2015) Touch-induced changes in Arabidopsis morphology dependent on gibberellin breakdown. *Nat. Plants* 1: 14025.
- Larrieu, A., Champion, A., Legrand, J., Lavenus, J., Mast, D., Brunoud, G., et al. (2015) A fluorescent hormone biosensor reveals the dynamics of jasmonate signalling in plants. *Nat. Commun.* 6: 6043.
- Li, Q., Zheng, J., Li, S., Huang, G., Skilling, S.J., Wang, L., et al. (2017) Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-isoleucine is essential for jasmonate signaling. *Mol. Plant* 10: 695–708.
- Liu, X., Li, F., Tang, J., Wang, W., Zhang, F., Wang, G., et al. (2012) Activation of the jasmonic acid pathway by depletion of the hydroperoxide lyase OsHPL3 reveals crosstalk between the HPL and AOS branches of the oxylipin pathway in rice. *PLoS One* 7: e50089.
- Liu, Y., Du, M., Deng, L., Shen, J., Fang, M., Chen, Q., et al. (2019) MYC2 regulates the termination of jasmonate signaling via an autoregulatory negative feedback loop. *Plant Cell* 31: 106–127.
- Lunde, C., Kimberlin, A., Leiboff, S., Koo, A.J. and Hake, S. (2019) Tasseled5 overexpresses a wound-inducible enzyme, ZmCYP94B1, that affects jasmonate catabolism, sex determination, and plant architecture in maize. *Commun. Biol.* 2: 114.
- Luo, J., Wei, K., Wang, S., Zhao, W., Ma, C., Hettenhausen, C., et al. (2016) COI1-Regulated hydroxylation of jasmonoyl-L-isoleucine impairs *Nicotiana attenuata*'s resistance to the generalist herbivore *Spodoptera litura*. *J. Agric. Food Chem.* 64: 2822–2831.
- Mao, D., Xin, Y., Tan, Y., Hu, X., Bai, J., Liu, Z.Y., et al. (2019) Natural variation in the *HAN1* gene confers chilling tolerance in rice and allowed adaptation to a temperate climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116: 3494–3501.
- Marquis, V., Smirnova, E., Poirier, L., Zumsteg, J., Schweizer, F., Reymond, P., et al. (2019) Stress- and Pathway-Specific Impacts of Impaired Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile) Catabolism on Defense Signaling and Biotic Stress Resistance in Arabidopsis. <http://biorxiv.org/cgi/content/short/686709v1> (June 28, 2019, date last accessed)
- Matsui, K. (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 274–280.
- Mayer, D., Mithofer, A., Glawischnig, E., Georgii, E., Ghirardo, A., Kanawati, B., et al. (2018) Short-term exposure to nitrogen dioxide provides basal pathogen resistance. *Plant Physiol.* 178: 468–487.
- Meena, M.K., Prajapati, R., Krishna, D., Divakaran, K., Pandey, Y., Reichelt, M., et al. (2019) The Ca²⁺ channel CNGC19 regulates Arabidopsis defense against *Spodoptera* herbivory. *Plant Cell* 31: 1539–1562.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I. and Wasternack, C. (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* 177: 114–127.
- Miersch, O. and Wasternack, C. (2000) Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biol. Chem.* 381: 715–722.
- Mousavi, S.A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S. and Farmer, E.E. (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500: 422–426.
- Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A.J., Moreno, J.E., Suzuki, K., et al. (2013) A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 1641–1656.
- Nguyen, C.T., Kurenda, A., Stolz, S., Chetelat, A. and Farmer, E.E. (2018) Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: 10178–10183.
- Patkar, R.N., Benke, P.I., Qu, Z., Chen, Y.Y., Yang, F., Swarup, S., et al. (2015) A fungal monoxygenase-derived jasmonate attenuates host innate immunity. *Nat. Chem. Biol.* 11: 733–740.
- Pollmann, S., Springer, A., Rustgi, S., von Wettstein, D., Kang, C., Reinbothe, C., et al. (2019) Substrate channeling in oxylipin biosynthesis through a protein complex in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 70: 1483–1495.
- Poudel, A.N., Holtsclaw, R.E., Kimberlin, A., Sen, S., Zeng, S., Joshi, T., et al. (2019) 12-Hydroxy-jasmonoyl-L-isoleucine is an active jasmonate that signals through CORONATINE INSENSITIVE 1 and contributes to the wound response in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 60: 2152–2166.
- Poudel, A.N., Zhang, T., Kwasniewski, M., Nakabayashi, R., Saito, K. and Koo, A.J. (2016) Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 1396–1408.
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., et al. (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res.* 8: 153–161.
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., et al. (2013) Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 163: 291–304.
- Schaller, A. and Stintzi, A. (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis—structure, function, regulation. *Phytochemistry* 70: 1532–1538.
- Scherer, G.F., Ryu, S.B., Wang, X., Matos, A.R. and Heitz, T. (2010) Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends Plant Sci.* 15: 693–700.

- Schillmiller, A.L. and Howe, G.A. (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 369–377.
- Scholz, S.S., Reichelt, M., Boland, W. and Mithofer, A. (2015) Additional evidence against jasmonate-induced jasmonate induction hypothesis. *Plant Sci.* 239: 9–14.
- Schulze, A., Zimmer, M., Mielke, S., Stellmach, H., Melnyk, C.W., Hause, B., et al. (2019) Wound-induced shoot-to-root relocation of JA-Ile precursors coordinates Arabidopsis growth. *Mol. Plant* 12: 1383–1394.
- Smirnova, E., Marquis, V., Poirier, L., Aubert, Y., Zumsteg, J., Menard, R., et al. (2017) Jasmonic acid oxidase 2 hydroxylates jasmonic acid and represses basal defense and resistance responses against *Botrytis cinerea* infection. *Mol. Plant* 10: 1159–1173.
- Staswick, P.E. and Tiryaki, I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2117–2127.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., et al. (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 51: 895–911.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., et al. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661–665.
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A.J., et al. (2018) Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* 361: 1112–1115.
- Wang, K., Guo, Q., Froehlich, J.E., Hersh, H.L., Zienkiewicz, A., Howe, G.A., et al. (2018) Two abscisic acid-responsive plastid lipase genes involved in jasmonic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 30: 1006–1022.
- Wasternack, C. and Feussner, I. (2018) The oxylipin pathways: biochemistry and function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69: 363–386.
- Wasternack, C. and Song, S. (2017) Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J. Exp. Bot.* 68: 1303–1321.
- Wasternack, C. and Strnad, M. (2018) Jasmonates: news on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi: 10.3390/ijms19092539.
- Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., et al. (2013) The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in Arabidopsis leaves. *J. Biol. Chem.* 288: 31701–31714.
- Widemann, E., Smirnova, E., Aubert, Y., Miesch, L. and Heitz, T. (2016) Dynamics of jasmonate metabolism upon flowering and across leaf stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants (Basel)* 5.
- Woldemariam, M.G., Onkokesung, N., Baldwin, I.T. and Galis, I. (2012) Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *Plant J.* 72: 758–767.
- Yan, C., Fan, M., Yang, M., Zhao, J., Zhang, W., Su, Y., et al. (2018) Injury activates Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis. *Mol. Cell* 70: 136–149.e7.
- Yuan, Z. and Zhang, D. (2015) Roles of jasmonate signalling in plant inflorescence and flower development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 44–51.
- Zhang, T., Poudel, A.N., Jewell, J.B., Kitaoka, N., Staswick, P., Matsuura, H., et al. (2016) Hormone crosstalk in wound stress response: wound-inducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 67: 2107–2120.

2. Croissance ou défense, un dogme qui se craquèle

Le compromis croissance *versus* défense est défini comme la priorisation des ressources vers la croissance ou la défense en fonction des stimuli externes perçus par la plante (Huot et al., 2014). Cette balance sous-entend qu'en pleine croissance la plante déploie moins d'énergie et de ressources pour sa défense et qu'en cas d'attaque, le développement est réprimé au profit du métabolisme défensif, pouvant aboutir à une diminution de la croissance ou une baisse de la fertilité par exemple (Rohwer et Erwin, 2008; Huot et al., 2014). Il en résulte qu'une plante ne peut avoir une croissance optimale et des défenses actives constitutivement en même temps (Huot et al., 2014). La caractérisation de *jao2* et quelques découvertes récentes dans d'autres équipes montrent que dans certaines situations défense et croissance ne sont pas aussi incompatible et qu'une défense constitutive peut ne pas causer de répression du développement. En effet, le mutant quintuple *jaz* (*jazQ*) présente une défense constitutive, par absence de répression JAZ dépendante, résultant en une meilleure résistance aux nécrotrophes que le WT, mais associée à un phénotype de nanisme et une production de graine réduite (Guo et al., 2018b). L'ajout de la mutation *phyB* à *jazQ* réverte le phénotype développemental et aboutit à une plante avec une croissance presque WT (présentant une morphologie légèrement différente), mais toujours avec une défense constitutive (Campos et al., 2016). La perception de la lumière par PhyB apparaît nécessaire au mécanisme de répression de la croissance JAs dépendant et identifie un nœud de régulation pour établir un découplage entre une défense effective et un développement quasi normal.

Les deux situations décrites ci-dessus (*jao2* et *jazQ phyB*) montrent que le découplage peut se faire au niveau des acteurs de la signalisation (l'ajout de la mutation *phyB* inhibe le réseau transcriptionnel qui réprime la croissance induit par la signalisation constitutive chez *jazQ* (Campos et al., 2016) ou d'une modification du métabolisme de l'hormone (*jao2*). Biologiquement, la plante possède de nombreux mécanismes pour réprimer une défense constitutive, comme démontré avec la caractérisation des voies cataboliques du JA-Ile ([chapitre II](#)). L'addition des mutations *jao* chez *jao234* induit une perte du découplage car le triple mutant présente un impact négatif sur la croissance plus fort que le mutant simple *jao2*, probablement par une signalisation basale plus importante ou présente dans d'autres organes due à l'ajout des mutations *jao3* et *jao4*. Ces résultats signifient que le découplage entre la croissance et la défense au niveau du métabolisme hormonale est possible, mais serait dose-et, ou, organe-dépendant. Le dogme établi peut donc être contourné, ce qui ouvre un champ de recherches et de possibilités pour développer des outils pour les plantes de cultures, autant sur les JAs que sur les autres hormones régulant les défenses ou la croissance.

3. Améliorer la résistance des cultures par la régulation de la signalisation JAs

Le rôle des JAs dans la défense des plantes a suscité un intérêt pour les plantes de cultures. De très nombreuses études ont démontré que l'application exogène de JAs, le plus souvent de MeJA, induit une meilleure résistance aux agresseurs. La revue de C. Rohwer et J. Erwin, (2008) recense nombre de ces études qui montrent l'effet protecteur d'un traitement JAs contre des stress biotiques sur une diversité de plantes de cultures telle la tomate, la vigne, les épinards, l'épicéa, le melon, le soja, le concombre, le poivre, le céleri... (Rohwer et Erwin, 2008). L'application de JAs permet d'induire aussi une résistance à des stress abiotique comme la tolérance à la déshydratation chez la fraise, le pois et l'orge (Rohwer et Erwin, 2008). Les ravageurs sont l'une des causes majeures des pertes dans les cultures, avec les conditions climatiques. Les traitements aux JAs apparaissent comme une solution pour protéger les cultures et permette un meilleur rendement, notamment pour les cultures les plus étendues comme le blé, le riz ou encore le maïs (He et al., 2017; Singh et al., 2019; Varsani et al., 2019). Cependant, le gain de résistance s'accompagne d'une répression du développement, comme par exemple une diminution du nombre de grains de pollen ou de graines produites, de la masse des fruits ou encore la répression de la croissance racinaire et foliaire pour de nombreuses plantes cultivées (Rohwer et Erwin, 2008). Ces effets secondaires négatifs causent une baisse de rendement non-négligeable que ne peuvent se permettre les agriculteurs. Les effets d'inhibition de croissance, incluant une répression de la photosynthèse, et l'induction de senescence, ont en effet empêché l'utilisation massive de MeJA pour protéger les plantes en agriculture (Zhang et Xing, 2008; Jimenez-Aleman et al., 2017b). Les JAs induisent une répression du développement en partie par une réallocation des ressources au métabolisme défensif et par un réseau transcriptionnel qui atténue la croissance (Wasternack et Hause, 2013; Huot et al., 2014; Campos et al., 2016; Wang et al., 2018; Guo et al., 2018a, 2018b).

Quelques études montrent que le catabolisme post-JA-Ile influence la résistance à divers stress. Par exemple chez le riz, le stress salin induit l'expression des orthologues *OsCYP94* (Hazman et al., 2019) et la surexpression de *OsCYP94C2* favorise la tolérance au stress (Kurotani et al., 2015). À l'inverse, les allèles peu exprimés du *quantitative trait locus* HAN1 chez le riz, dont *OsCYP94B4* qui catabolise le JA-Ile, favorisent la tolérance au froid. Ces deux études démontrent que le JA-Ile favorise la résistance au froid et réprime la résistance au sel, via le catabolisme post-JA-Ile. Ces données et la caractérisation des voies cataboliques du JA-Ile en [chapitre II](#) montrent qu'apporter des JAs aux cultures n'a qu'un intérêt limité pour le rendement. Un traitement ponctuel pourrait favoriser la résistance à divers stress sans causer

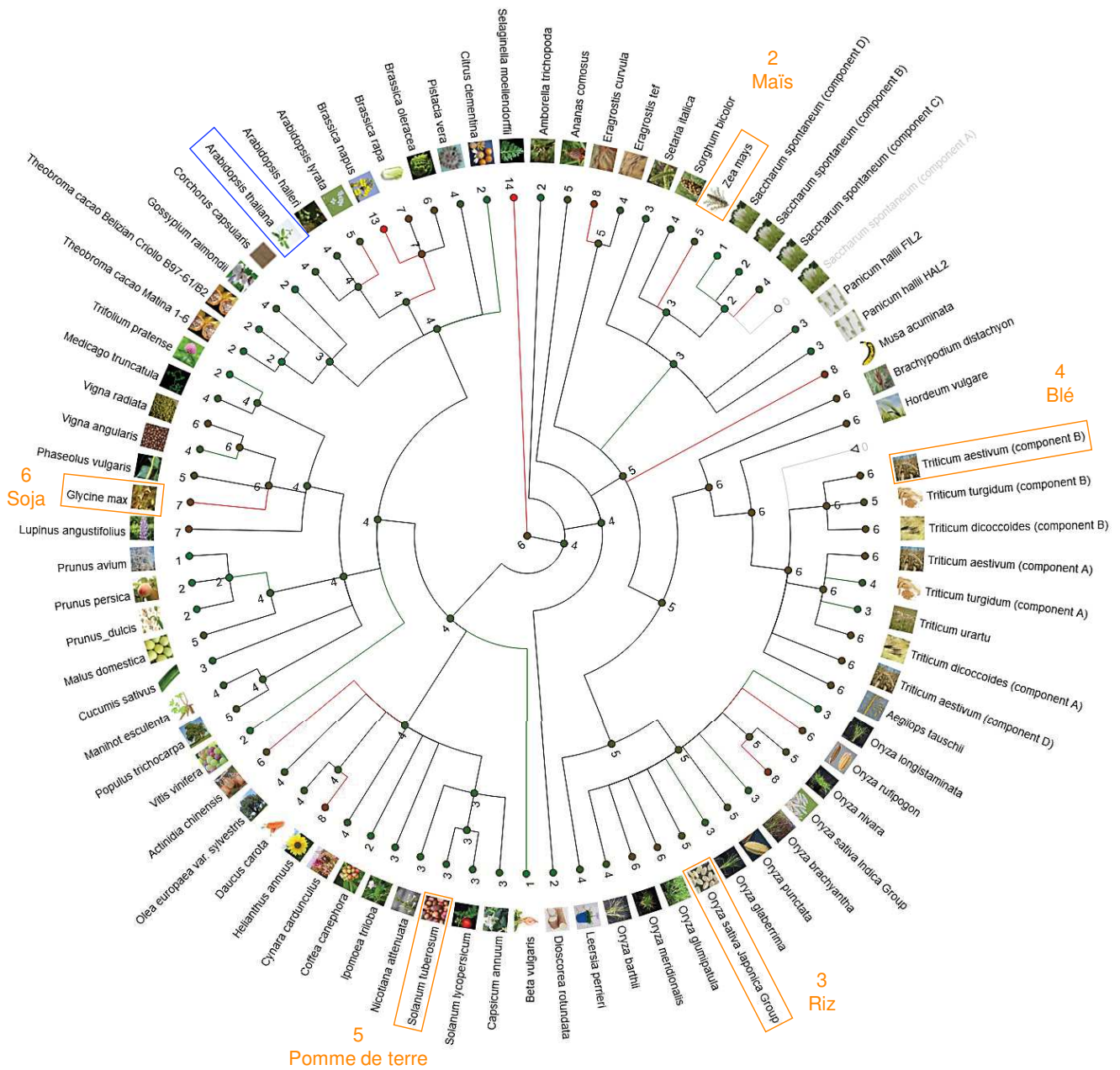


Figure 5.1. Orthologues de *AtJAO2* chez les plantes.

L'identification des orthologues de *JAO2* d'*Arabidopsis thaliana* (encadrée en bleu) chez d'autres espèces et la construction de l'arbre phylogénétique ont été réalisés à partir de la séquence génomique de *JAO2*, sur la base de données publiques EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>). Les chiffres notés aux nœuds représentent le nombre d'orthologues identifiés, les traits rouges correspondent à une expansion et les traits verts à une contraction du nombre d'orthologues au cours de l'évolution. Les cadres oranges marquent cinq des six cultures avec la plus importante productivité mondiale (en tonnes) en 2018 d'après l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>)

un impact trop négatif sur la croissance, mais ça nécessite un traitement au bon moment, donc d'avoir des connaissances des cycles biologiques des ravageurs potentiels et un bon suivi météorologique. Développer des outils qui influent sur la signalisation ou la régulation des JAs pour améliorer la résistance sans réprimer la croissance auraient une plus grande praticité et efficacité d'utilisation.

En effet, des agonistes comme le NOPh ou les JA-Ile lactones, développées récemment dans le cadre de la chimie biologique sur les JAs, activent une signalisation défensive JA-Ile spécifique, contre les nécrotrophes et les herbivores respectivement, sans effet inhibiteur de croissance (Jimenez-Aleman et al., 2017b; Takaoka et al., 2018; Ueda et al., 2020). Ces molécules synthétiques prouvent que l'action sélective sur la signalisation aurait un impact appliqué plus bénéfique qu'un traitement avec des JAs. La mutation *jao2*, qui influe la signalisation et non l'accumulation du JA-Ile, possède cet impact bénéfique. La synthèse des résultats indiquent que *jao2* est plus résistante aux pathogènes nécrotrophes, aux insectes herbivores et à la déshydratation avec un effet très modéré sur le développement (Caarls et al., 2017; Smirnova et al., 2017). Autrement dit, *jao2* résiste au ravageur sans perte de rendement et pourrait avoir une meilleure vigueur dans le contexte actuel de réchauffement climatique et de surpopulations. Nos résultats ont été étendus chez *Nicotiana attenuata* avec l'homologue NaJAO2 dont la mutation montre également une défense basale active corrélée à une meilleure résistance sans impact négatif détectable sur la croissance (Tang et al., 2020). La fonction biologique de l'enzyme semble donc conservée et comme JAO2 présente des orthologues dans de nombreuses plantes de cultures (Figure 5.1), on peut espérer développer un outil de régulation de JAO2 pour améliorer les résistances des plantes cultivées.

Néanmoins, une expertise en champs serait nécessaire pour mesurer le véritable impact sur le développement de l'inhibition de JAO2. Les résistances mesurées chez le mutant l'ont été dans des conditions de cultures optimales, en réponse à un seul stress à la fois. En plein champs les plantes doivent résister à plusieurs stress simultanés, souvent associés à des carences, notamment en nitrate et en phosphate. Il est possible que la dérégulation de la signalisation basale chez des plantes où JAO2 est inhibée induit un impact sur la croissance plus important que celui observé en laboratoire. Par ailleurs, en conditions optimales, *jao2* présente un léger impact négatif sur le développement, notamment sur la taille des graines qui sont plus petites (Figure 4.31B). Un impact négatif sur les graines, que ce soit quantitatif ou qualitatif, n'est pas souhaitable pour les espèces où les graines constituent la partie consommée et pour le renouvellement des cultures. L'altération de JAO2 implique de créer un OGM dont la législation européenne interdit l'utilisation. Des plantes transgéniques JAO2 ne seront cultivables qu'aux Amériques ou en Asie. Un inhibiteur de JAO2 serait légal d'utilisation en Europe, mais il pourrait inhiber d'autres 2-ODD (qui est la deuxième plus large famille

d'enzyme des plantes après les CYP (Kawai et al., 2014) et être une source de pollution. Après avoir identifié et caractérisé la, ou les, JAO qui pourraient avoir un rôle régulateur similaire à *AtJAO2* (Figure 5.1) (Smirnova et al., 2017), il serait intéressant d'effectuer de la sélection variétale pour développer une meilleure résistance de type *jao2*, sans impacter négativement la croissance, et en aval le rendement. Au laboratoire, le doctorant Simon Ndecky est actuellement en train de caractériser les orthologues de *AtJAO2* identifiés chez *Oryza sativa*. Réussir à installer la résistance *jao2* dans les cultures pourrait permettre de diminuer de façon significative l'utilisation des produits phytosanitaires, en particuliers les biocides, qui sont une des sources de pollution majeure issue de l'agriculture.

CHAPITRE VI.

ANNEXES

VI. Annexes

Annexe 1, analyse de l'intégrité des ARN pour RNAseq par la plateforme d'analyse d'expression génique

L'intégrité des ARN est mesurée par le *RNA Integrity Number* (**RIN**), il est issu d'un algorithme qui attribue une valeur d'intégrité à l'ARN en fonction de caractéristiques mesurées lors d'une électrophorèse capillaire sur gel (Imbeaud et al., 2005). Les ARN sont marqués avec un colorant spécifique dont l'intensité est détectée par laser à la sortie du capillaire ce qui fournit un chromatogramme. Les pics les plus grands correspondent aux ARN ribosomiques, étant les ARN les plus abondants ils fournissent l'intensité la plus forte (Mueller et al., 2004). Le chromatogramme issu de cette analyse reflète le niveau de dégradation des ARN, en effet s'il y a de la dégradation les pics correspondants au ARN ribosomique présente une aire plus faible et de nombreux produits de dégradation qui sortent plus tôt du capillaire sont détectés, représentant la fragmentation des ARN ribosomiques (Mueller et al., 2004; Babu C. V. et Gassmann, 2016). L'intensité des pics issus de la dégradation et le chromatogramme sont comparés à des profils types d'ARN, intègres ou dégradés, de plantes, ce qui sert dans l'algorithme pour définir le RIN de l'échantillon (Babu C. V. et Gassmann, 2016).

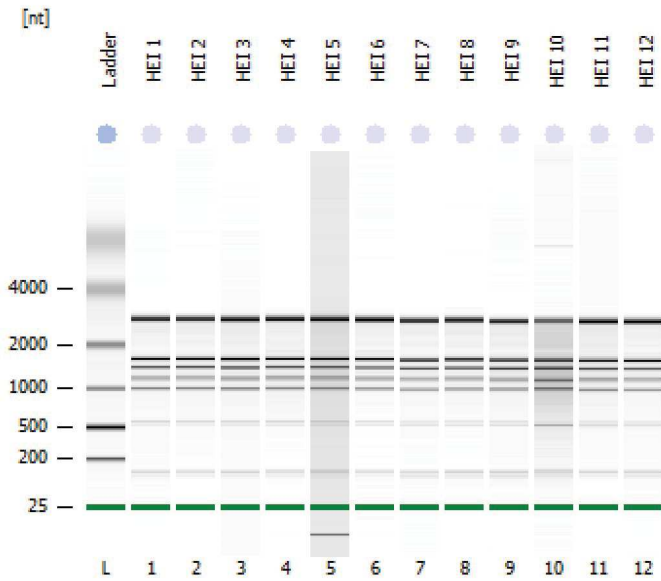
L'analyse RNAseq conduite par BGI demande un RIN minimum de 6,5 afin que l'intégrité des ARN soit suffisante pour l'analyse. Les résultats obtenus pour nos échantillons sont suffisants ou très légèrement inférieurs à 6,5. Seul l'échantillon 10, qui donne un RIN de 5,6, présente une intégrité des ARN inférieure à ce qui est demandé cependant le chromatogramme révèle peu de produits de dégradation d'ARN. Un échange avec BGI nous a permis de savoir que c'est tout de même possible de faire l'analyse avec ce RIN, les douze échantillons ont été envoyés à BGI.

Les échantillons 1 à 6 sont issus des plantes non stimulés, les numéros 1, 2 et 3 représentent le triplicat biologique WT et les 4, 5 et 6 le triplicat *jao2*. Les six autres échantillons correspondent aux plantes infectées 48 h avec *Botrytis*, les 7, 8 et 9 définissant le triplicat WT et les 10, 11 et 12 le triplicat *jao2*.

Assay Class: Plant RNA Nano
Data Path: C:\...lant RNA Nano_DE13806839_2018-06-26_03-58-07_corrected2.xad

Created: 26/06/2018 03:58:07
Modified: 29/06/2018 03:53:25

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: platform
Serial#: DE13806839
Firmware: C.01.069
Type: G2939A

Assay Information:

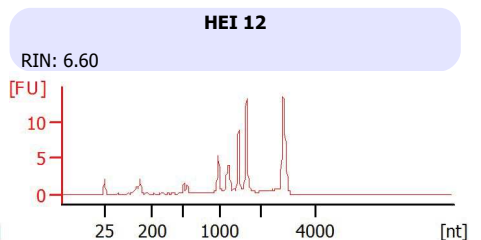
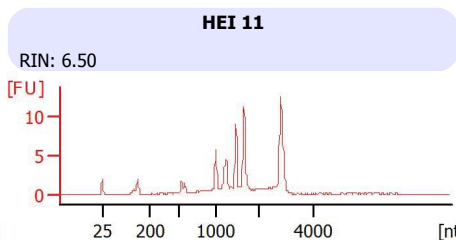
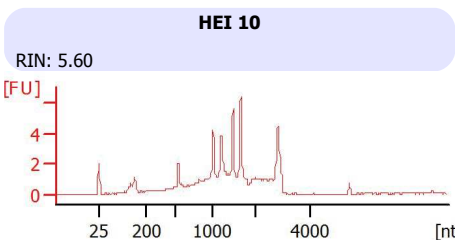
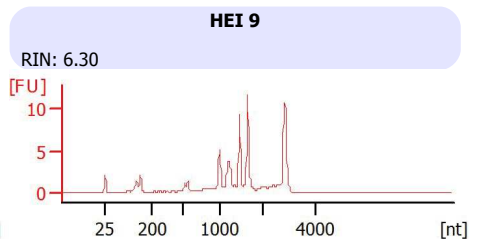
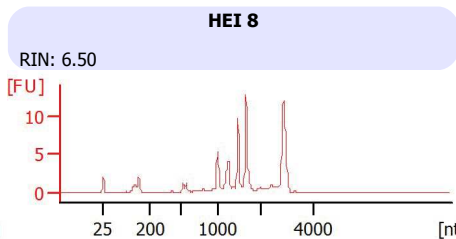
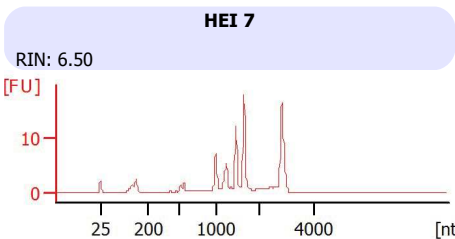
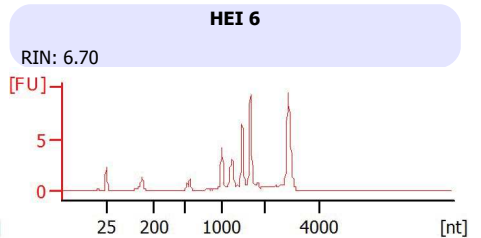
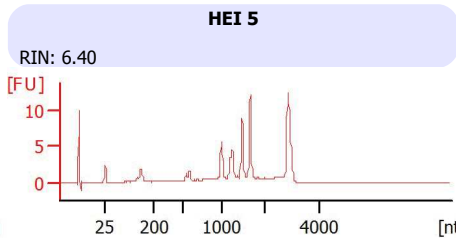
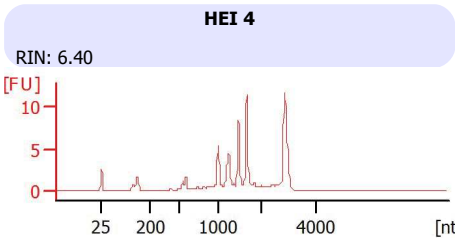
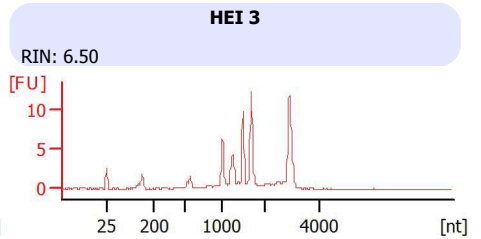
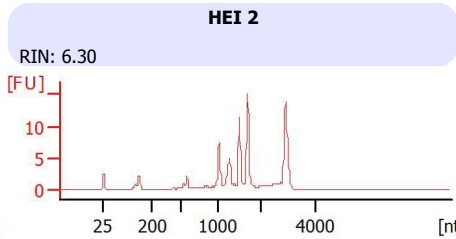
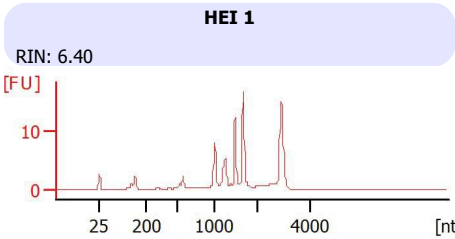
Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Plant RNA Nano.xsy

Assay Class: Plant RNA Nano
Version: 1.3
Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Plant)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:



Annexe 2, listes des DEG des banques d'expression générées par RNAseq

Le séquençage est réalisé en *paired end* 2*100 paires de bases, les ingénieurs d'études Stéphanie Graindorge et Valérie Cognat de la plateforme de bioinformatique de l'institut ont analysé la qualité des données brutes avec FastQC 0.11.5. Les séquences sont toutes de bonnes qualités sans séquences résiduelles d'adaptateurs. Il n'y a donc pas eu lieu de filtrer les données avant de réaliser le *mapping* sur les génomes d'*Arabidopsis thaliana* TAIR10 (Col-0. Araport 11) et de *Botrytis cinerea* (B05.10) avec le programme hisat2 2.1.0 pour, à partir des *reads*, identifier les gènes d'*Arabidopsis* et exclure les séquences issues des gènes du pathogène.

Parmi l'ensemble des gènes d'*Arabidopsis* nous avons défini trois critères pour sortir les deux listes de DEG. Premièrement la moyenne d'expression entre le triplicat WT et le triplicat *jao2* doit avoir une différence significative avec une valeur *p* ajusté $< 0,05$; deuxièmement la moyenne d'expression des *read* des trois échantillons WT et des trois échantillons *jao2* de la comparaison soit d'un minimum de 10 (colonnes moyenne) ; et troisièmement le \log_2 de *fold change* doit être supérieur à 1 pour les gènes sur-exprimés et inférieur à -1 pour ceux sous-exprimés.

Annexe 2A

Listes des DEG issus de la comparaison des banques d'expression foliaire entre le triplicat biologique WT et le triplicat biologique *jao2* après 48 h d'infection par le pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea*.

Annexe 2B

Listes des DEG issus de la comparaison des banques d'expression foliaire entre le triplicat biologique WT et le triplicat biologique *jao2* en absence de stimulus.

Annexe 2A

Accession	Moy reads WT-inf	Moy reads <i>jao2</i> -inf	Moyenne	log2FoldChange	valeur p ajustée	Description
1 AT5G35935	7,25	314,00	160,62	5,44	2,24E-05	
2 AT3G60170	0,98	36,86	18,92	5,14	1,42E-03	
3 AT2G16367	65,58	676,12	370,85	3,37	3,37E-48	
4 AT1G52040	787,25	7945,89	4366,57	3,32	7,59E-56	Myrosinase-binding protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SAV0]
5 AT3G05955	2,95	21,97	12,46	2,91	3,24E-03	
6 AT3G28220	1037,43	5326,00	3181,71	2,34	7,63E-14	AT3g28220/T19D11_3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LHA6]
7 AT2G26010	14940,40	65477,83	40209,11	2,13	1,15E-10	PDF1.3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VSS6]
8 AT1G24070	217,00	727,81	472,40	1,75	7,23E-12	Probable mannan synthase 10 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LR87]
9 AT3G29644	43,18	140,11	91,64	1,69	9,58E-05	other RNA [Source:TAIR;Acc:AT3G29644]
10 AT3G61250	13,50	42,74	28,12	1,66	9,19E-03	Transcription factor MYB41 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9M2D9]
11 AT1G52000	3997,00	12428,26	8212,63	1,63	5,95E-30	Jacalin-related lectin 5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZU23]
12 AT1G18710	129,21	382,71	255,96	1,55	2,36E-08	MYB transcription factor [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9M9U2]
13 AT1G52400	12431,46	34829,96	23630,71	1,51	5,32E-06	Beta-D-glucopyranosyl abscisate beta-glucosidase [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SE50]
14 AT1G14250	578,43	1432,54	1005,49	1,30	5,32E-06	Probable apyrase 5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6NQA8]
15 AT1G52410	2496,32	5302,70	3899,51	1,11	6,22E-03	TSK-associating protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:F4ICX9]
16 AT5G05590	389,56	822,70	606,13	1,06	1,86E-04	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase 2, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q42527]
17 AT1G02390	266,12	120,79	193,46	-1,23	6,23E-03	Probable glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FZ22]
18 AT1G09240	414,90	164,07	289,48	-1,30	2,61E-02	Nicotianamine synthase 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O80483]
19 AT5G10140	33,09	4,96	19,03	-2,58	4,10E-02	At5g10140 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q5Q911]
20 AT2G06995	27,16	2,45	14,81	-3,49	1,58E-04	
21 AT5G05600	9547,42	528,97	5038,20	-4,16	6,70E-99	Probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase At5g05600 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FFF6]

Annexe 2B

	Accession	Moy reads WT	Moy reads jao2	Moyenne	log2FoldChange	valeur p ajustée	Description
1	AT1G72260	0,00	135,14	67,57	9,178	3,73E-10	Thionin-2.1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q42596]
2	AT1G06160	0,37	73,58	36,98	7,553	1,68E-07	ORAS9 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178WAR0]
3	AT3G28290	0,74	145,95	73,34	7,431	3,77E-09	UPF0496 protein At3g28290 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P0D178]
4	AT1G54020	0,74	117,83	59,28	7,300	4,36E-09	GDSL esterase/lipase At1g54020 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9C5N8]
5	AT5G44420	42,75	4753,53	2398,14	6,797	2,58E-101	PDF1.2a Defensin-like protein 16 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9F123]
6	AT2G26020	7,59	828,94	418,27	6,775	1,27E-40	PDF1.2b [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VQC3]
7	AT2G26010	12,27	1285,25	648,76	6,710	9,73E-68	PDF1.3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VSS6]
8	AT1G52040	327,72	27451,66	13889,69	6,355	2,10E-203	Myrosinase-binding protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SAV0]
9	AT5G44430	31,34	2224,84	1128,09	6,149	7,86E-41	PDF1.2c [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178UR42]
10	AT1G52400	4324,75	131025,62	67675,18	4,845	5,97E-76	Beta-D-glucopyranosyl absicinate beta-glucosidase [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SE50]
11	AT3G48360	16,27	491,58	253,92	4,793	2,35E-31	BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q94BNO]
12	AT3G28220	1125,76	29915,48	15520,62	4,678	4,00E-61	AT3g28220/T19D11_3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LHA6]
13	AT1G52030	80,55	2215,36	1147,96	4,675	5,86E-19	Myrosinase-binding protein 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SAV1]
14	AT2G16367	399,51	10329,80	5364,65	4,667	3,37E-116	
15	AT4G16590	283,78	6708,20	3495,99	4,594	4,20E-13	cellulose synthase-like A01 [Source:TAIR;Acc:AT4G16590]
16	AT3G04720	117,90	2750,40	1434,15	4,546	5,48E-89	Hevein-like preproprotein [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P43082]
17	AT5G42800	4,01	88,23	46,12	4,429	2,97E-08	Dihydroflavonol reductase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B1GV15]
18	AT1G24070	136,92	2881,73	1509,32	4,352	3,48E-80	Probable mannan synthase 10 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LR87]
19	AT2G39030	37,65	585,53	311,59	3,956	4,69E-40	L-ornithine N5-acetyltransferase NATA1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZV05]
20	AT1G15125	7,09	102,12	54,60	3,854	1,44E-09	F9L1.6 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9XI57]
21	AT2G34600	7,18	102,38	54,78	3,798	1,40E-21	Protein TIFY 5B [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O64687]
22	AT3G45130	4,29	59,03	31,66	3,764	2,05E-08	Terpene cyclase/mutase family member [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A19LLE4]
23	AT4G16260	24,54	298,95	161,75	3,599	1,26E-25	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase At4g16260 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8VZ12]
24	AT1G52410	753,93	8863,11	4808,52	3,493	2,73E-40	TSK-associating protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:F41CX9]
25	AT3G23550	6,54	72,84	39,69	3,489	6,73E-08	Protein DETOXIFICATION 18 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LUH3]
26	AT5G35935	29,13	321,53	175,33	3,460	3,46E-03	
27	AT5G47220	64,10	596,50	330,30	3,215	1,50E-94	ERF2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178UCP3]
28	AT5G64190	3,61	34,47	19,04	3,209	2,28E-05	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT2G40390.1)
29	AT3G15500	2,09	18,25	10,17	3,128	2,60E-03	NAC3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VLD3]
30	AT5G24780	118,94	1201,39	660,16	3,010	9,07E-03	Vegetative storage protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O49195]
31	AT1G52000	4524,24	36644,88	20584,56	3,003	4,17E-106	Jacalin-related lectin 5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZU23]
32	ATCG01230	15,96	122,73	69,34	2,961	4,79E-02	ribosomal protein S12B [Source:TAIR;Acc:ATCG01230]
33	AT1G21100	2,85	21,88	12,37	2,954	2,03E-05	Indole glucosinolate O-methyltransferase 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LPJ5]
34	AT4G08040	8,09	58,66	33,38	2,953	5,47E-05	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 11 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9S9U6]
35	AT5G61440	10,66	77,04	43,85	2,951	9,72E-10	Thioredoxin-like 1-2, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9XF11]
36	AT1G14250	367,03	2891,82	1629,43	2,948	4,11E-37	Probable apyrase 5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6NQA8]
37	AT3G49110	3,89	33,14	18,51	2,891	6,96E-03	Peroxidase 33 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P24101]

38	AT3G16530	471,59	3341,12	1906,35	2,833	9,10E-29	Lectin-like protein At3g16530 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LK72]
39	AT3G15630	22,52	150,05	86,28	2,790	4,66E-19	AT3g15630/MSI11_3 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LW16]
40	AT1G80440	642,46	3774,91	2208,68	2,769	1,89E-09	F-box/kelch-repeat protein At1g80440 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9M8L2]
41	AT5G48850	83,10	578,88	330,99	2,743	1,22E-19	ATSDI1 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178UKA2]
42	AT2G25735	9,27	60,83	35,05	2,743	1,47E-09	Expressed protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8RU11]
43	AT5G22920	116,25	778,95	447,60	2,675	1,61E-16	E3 ubiquitin-protein ligase RZFP34 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FFB6]
44	AT4G22880	12,78	72,97	42,88	2,666	2,22E-03	AT4G22880 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q0WWDD6]
45	AT2G42870	8,48	56,11	32,30	2,664	1,18E-03	Transcription factor PAR1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SJJH0]
46	AT2G15890	31,04	203,73	117,39	2,654	8,16E-23	CCG-binding protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9XIM0]
47	AT1G02610	28,32	183,60	105,96	2,637	1,50E-11	RING/FYVE/PHD zinc finger-containing protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4HXX4]
48	AT5G19120	911,54	4472,14	2691,84	2,624	1,29E-07	AT5g19120/T24G5_20 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q93VG3]
49	AT5G19100	5,42	34,64	20,03	2,597	2,71E-02	Eukaryotic aspartyl protease family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q3E9C8]
50	AT1G18710	275,49	1738,56	1007,03	2,596	3,97E-29	MYB transcription factor [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9M9U2]
51	AT3G15356	376,69	2289,17	1332,93	2,589	4,90E-25	Lectin-like protein LEC [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LJR2]
52	AT1G28480	3,91	23,18	13,54	2,583	1,14E-04	Glutaredoxin-C9 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q95GP6]
53	AT2G36050	53,59	316,26	184,92	2,583	7,17E-17	OFFP15 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178V5X7]
54	AT5G57560	137,00	885,51	511,25	2,545	1,90E-19	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178UQU4]
55	AT3G25760	831,08	4949,27	2890,18	2,533	3,55E-24	At3g25760 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q2HIV2]
56	AT4G35770	32,79	199,06	115,93	2,510	1,48E-05	SEN1 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178UYD5]
57	AT4G17500	93,88	528,66	311,27	2,494	2,05E-31	Ethylene-responsive transcription factor 1A [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q80337]
58	AT1G73325	230,60	1297,76	764,18	2,491	1,30E-20	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FX28]
59	AT2G39330	417,43	2440,68	1429,05	2,486	4,36E-06	jacalin-related lectin 23 [Source:TAIR;Acc:AT2G39330]
60	AT1G06620	25,68	142,34	84,01	2,469	2,18E-15	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q84MB3]
61	AT1G50040	37,61	197,60	117,60	2,466	3,82E-04	F2J10.8 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LPM5]
62	AT5G54060	13,84	61,25	37,55	2,462	1,51E-02	Glycosyltransferase (Fragment) [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:W8Q6A1]
63	AT1G77640	6,07	33,62	19,85	2,454	1,83E-05	Ethylene-responsive transcription factor ERF013 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CAP4]
64	AT1G19670	3537,69	18947,09	11242,39	2,422	5,23E-34	Chlorophyllase-1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q22527]
65	AT3G49620	18,35	98,20	58,27	2,419	4,88E-10	Probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase DIN11 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8H113]
66	AT5G14360	6,07	32,28	19,17	2,418	1,87E-05	At5g14360 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LY93]
67	AT5G44260	55,56	316,61	186,08	2,403	3,23E-04	Zinc finger CCCH domain-containing protein 61 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FKW2]
68	AT5G56550	177,00	843,98	510,49	2,403	2,75E-15	Emb [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LVB9]
69	AT3G16470	1404,85	7485,95	4445,40	2,312	5,53E-07	Jacalin-related lectin 35 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O04309]
70	AT3G49570	42,29	210,42	126,36	2,311	2,34E-10	Protein RESPONSE TO LOW SULFUR 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SCK2]
71	AT4G16780	524,62	2672,30	1598,46	2,308	9,65E-23	Homeobox-leucine zipper protein HAT4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q05466]
72	AT1G25400	26,17	120,98	73,58	2,301	7,89E-10	At1g25400 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9C6L0]
73	AT4G13410	99,33	485,28	292,30	2,301	9,27E-05	Probable mannan synthase 15 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9T0L2]
74	AT3G07350	527,79	2381,27	1454,53	2,300	4,51E-04	F2I03.6 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SRT1]
75	AT2G34810	685,50	3374,12	2029,81	2,293	1,55E-14	Berberine bridge enzyme-like 16 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q64745]
76	AT3G10020	193,57	883,04	538,30	2,267	1,24E-33	AT3g10020/T22K18_16 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SR67]
77	AT4G27860	75,29	366,55	220,92	2,264	1,73E-23	vacuolar iron transporter (VIT) family protein [Source:TAIR;Acc:AT4G27860]

78	AT5G61590	283,75	1326,06	804,91	2,245	1,59E-13 Ethylene-responsive transcription factor ERF107 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FKG2]
79	AT3G16690	12,17	57,53	34,85	2,233	4,82E-09 Bidirectional sugar transporter SWEET [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A119LQ05]
80	AT3G49580	45,90	221,72	133,81	2,232	3,87E-09 LSU1 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VF66]
81	AT4G27450	239,92	1147,85	693,89	2,230	2,93E-10 AT4g27450/F27G19_50 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q93V62]
82	AT3G15450	404,67	1807,18	1105,93	2,220	3,18E-23 Aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LE80]
83	AT1G74930	84,04	318,58	201,31	2,214	4,84E-11 Ethylene-responsive transcription factor ERF018 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9S7L5]
84	AT5G25190	113,99	554,18	334,09	2,208	2,79E-17 Ethylene-responsive transcription factor ERF003 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q94AW5]
85	AT3G25770	1970,63	9105,09	5537,86	2,193	1,53E-38 AOC2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VKE4]
86	AT4G32480	223,75	1001,94	612,85	2,190	4,75E-12 AT4g32480/F8B4_180 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SUU4]
87	AT5G61160	12,36	56,84	34,60	2,189	1,54E-03 Agmatine coumaroyltransferase [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FNP9]
88	AT5G35777	112,36	507,39	309,87	2,160	3,04E-15
89	AT5G20250	205,83	915,72	560,78	2,105	4,04E-11 Raffinose synthase family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4K470]
90	AT1G35140	43,81	205,36	124,59	2,094	9,44E-03 Protein EXORDIUM-like 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9C6E4]
91	AT3G15950	15,36	64,74	40,05	2,081	1,11E-09 TSA1-like protein [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LSB4]
92	AT1G44350	282,00	1219,09	750,54	2,075	9,95E-13 IAA-amino acid hydrolase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q0WNN8]
93	AT1G02340	38,10	158,82	98,46	2,073	1,33E-03 Transcription factor HFR1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FE22]
94	AT2G22770	14,89	65,18	40,04	2,071	3,08E-05 NAI1 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VWP9]
95	AT4G36850	157,51	687,64	422,58	2,063	3,68E-11 PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q94AH7]
96	AT3G45140	24113,95	100244,33	62179,14	2,050	3,82E-45 Lipoxigenase 2, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P38418]
97	AT4G37610	435,78	1399,72	917,75	1,992	2,40E-05 BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6EJ98]
98	AT4G23600	4275,40	17033,23	10654,32	1,984	3,04E-40 Cystine lyase COR13 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SUR6]
99	AT2G33830	21,25	98,41	59,83	1,978	9,85E-05 DRM2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VR62]
100	AT5G47230	36,45	131,87	84,16	1,976	2,37E-08 ERF5 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178UKK9]
101	AT2G43530	578,19	2411,96	1495,07	1,972	1,03E-10 Defensin-like protein 194 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q22867]
102	AT2G23010	40,38	157,66	99,02	1,962	8,40E-09 SCPL9 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178W1Q9]
103	AT5G49450	43,38	167,64	105,51	1,961	3,66E-11 Basic leucine zipper 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FGX2]
104	AT4G37770	6,79	26,56	16,67	1,948	1,07E-03 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q56Y32]
105	AT5G50450	27,32	95,54	61,43	1,946	1,31E-05 F-box protein At5g50450 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FK27]
106	AT1G67810	6,17	23,19	14,68	1,919	4,18E-04 Sufe-like protein 2, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FXE3]
107	AT1G69890	14,04	53,01	33,52	1,910	2,49E-03 Actin cross-linking protein [DUF569] [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9CAS2]
108	AT1G75490	17,52	68,85	43,19	1,910	9,63E-06 Dehydration-responsive element-binding protein 2D [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LQ22]
109	AT5G10300	59,74	228,23	143,98	1,910	1,95E-09 Alpha-hydroxynitrile lyase [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LFT6]
110	AT5G05590	79,31	299,32	189,32	1,909	8,10E-15 N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase 2, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q42527]
111	AT1G54010	12,71	47,31	30,01	1,908	2,44E-02 Inactive GDSL esterase/lipase-like protein 23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8W4H8]
112	AT5G57550	18,52	72,89	45,70	1,886	9,09E-06 Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 25 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q38907]
113	AT1G72450	1696,70	6422,81	4059,75	1,882	1,01E-19 TIFY11B [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178W2J3]
114	AT3G09870	13,94	48,18	31,06	1,879	1,59E-03 F8A24.8 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SF89]
115	AT4G37260	192,36	752,91	472,64	1,877	3,45E-20 MYB73 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178V4E7]
116	AT2G32210	5,04	18,41	11,72	1,861	8,86E-03 Cysteine-rich/transmembrane domain A-like protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SKX9]
117	AT4G17490	16,50	61,02	38,76	1,842	3,83E-03 Ethylene-responsive transcription factor 6 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8VZ91]

118	AT1G32170	39,00	142,86	90,93	1,838	1,22E-07 Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q38908]
119	AT3G26200	7,99	28,23	18,11	1,828	1,64E-04 Cytochrome P450 71B22 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LTM1]
120	AT1G17147	13,92	47,34	30,63	1,820	2,30E-04 VQ motif-containing protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q1G3U8]
121	AT5G03355	9,73	35,28	22,50	1,819	3,20E-03 Cysteine/histidine-rich C1 domain protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LZF4]
122	AT5G24420	520,56	1841,90	1181,23	1,815	3,22E-07 Probable 6-phosphogluconolactonase 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8LEV7]
123	AT4G29700	180,28	638,62	409,45	1,814	6,60E-12 Alkaline-phosphatase-like family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SU81]
124	AT2G20670	2145,74	7228,07	4686,90	1,812	1,07E-15 Expressed protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SIU5]
125	AT5G01740	19,23	66,99	43,11	1,791	2,78E-04 AT5g01740/T20L15_10 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LZX2]
126	AT2G43510	28,29	96,81	62,55	1,782	2,18E-03 T11 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VRC4]
127	AT3G45970	32,94	113,54	73,24	1,782	1,75E-03 Expansin-like A1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LZT4]
128	AT5G61600	100,58	343,01	221,80	1,776	8,42E-17 Ethylene-responsive transcription factor ERF104 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FKG1]
129	AT4G28720	12,80	44,58	28,69	1,775	4,35E-02 Flavin-containing monooxygenase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178V2K9]
130	AT1G57990	79,24	268,75	173,99	1,765	8,72E-17 PUP18 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178WC51]
131	AT5G17490	30,74	108,90	69,82	1,747	6,95E-06 DELLA protein RGL3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LF53]
132	AT5G49360	1111,88	4000,32	2556,10	1,745	5,20E-10 Beta-D-xylosidase 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FGY1]
133	AT5G21940	1871,65	5370,95	3621,30	1,735	2,96E-09 At5g21940 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9CS93]
134	AT4G36670	23,22	76,36	49,79	1,732	3,48E-10 At4g36670 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A4VCM1]
135	AT5G57220	16,34	54,41	35,38	1,729	1,03E-02 Cytochrome P450 81F2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LVD6]
136	AT1G75450	62,51	215,35	138,93	1,722	1,81E-06 Cytokinin dehydrogenase 5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q67YU0]
137	AT5G67480	58,57	196,45	127,51	1,714	9,20E-11 BTB and TAZ domain protein 4 [Source:TAIR;Acc:AT5G67480]
138	AT4G37240	35,68	116,94	76,31	1,710	4,55E-08 HTH-type transcriptional regulator [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8LE56]
139	AT1G20310	5,06	15,74	10,40	1,709	1,77E-02 Syringolide-induced protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8L956]
140	AT1G23390	2847,85	8918,05	5882,95	1,706	1,20E-13 F-box/Kelch repeat-containing F-box family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:C4PVQ8]
141	AT5G26220	16,15	54,28	35,22	1,702	1,83E-05 Gamma-glutamylcyclotransferase 2-1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8GY54]
142	AT1G30730	4,97	15,79	10,38	1,696	2,16E-02 Berberine bridge enzyme-like 11 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SA88]
143	AT3G16460	42,06	137,90	89,98	1,692	7,55E-07 Jacalin-related lectin 34 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O04310]
144	AT2G28120	32,47	107,29	69,88	1,684	1,12E-06 At2g28120/F24D13.9 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9ZUV4]
145	AT2G15090	24,06	82,40	53,23	1,682	1,32E-03 3-ketoacyl-CoA synthase 8 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q4V3C9]
146	AT1G70690	49,35	158,00	103,67	1,673	2,47E-17 PDLP5 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178WPB2]
147	AT2G24550	878,05	2734,37	1806,21	1,666	5,72E-33 At2g24550/F25P17.15 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q945P6]
148	AT5G17220	44,30	133,48	88,89	1,663	2,70E-02 Glutathione S-transferase F12 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FE46]
149	AT4G13395	8,15	24,79	16,47	1,662	2,86E-03 DVL10 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q6IM91]
150	AT4G04840	934,90	2940,95	1937,93	1,662	8,82E-26 MSRB6 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178V4R5]
151	AT5G06865	36,48	116,04	76,26	1,661	9,58E-13 other RNA [Source:TAIR;Acc:AT5G06865]
152	AT5G51390	13,44	44,48	28,96	1,657	4,14E-03 unknown protein. [Source:TAIR;Acc:AT5G51390]
153	AT5G25240	56,55	178,46	117,50	1,655	3,08E-04 Stress induced protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8GYN8]
154	AT5G54490	16,69	53,46	35,08	1,651	2,90E-04 PBP1 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178URF6]
155	AT2G18700	744,69	2388,63	1566,66	1,647	6,89E-23 Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 11 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZV48]
156	AT4G15990	6,46	20,62	13,54	1,629	3,53E-02 Uncharacterized protein AT4g15990 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q23448]
157	AT3G09020	23,40	72,74	48,07	1,627	1,32E-07 Alpha 1,4-glycosyltransferase family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9S790]

158	AT5G65207	90,89	281,16	186,03	1,625	1,79E-15 Uncharacterized protein At5g65207 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8RXW8]
159	AT1G33760	10,12	31,14	20,63	1,624	1,04E-03 Ethylene-responsive transcription factor ERF022 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LQ28]
160	AT3G55970	11,85	36,63	24,24	1,623	1,64E-03 JRG21 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178V764]
161	AT5G47240	53,44	168,03	110,74	1,614	1,62E-06 nudix hydrolase homolog 8 [Source:TAIR;Acc:AT5G47240]
162	AT4G15440	774,98	2372,85	1573,92	1,610	1,31E-36 Probable inactive linolenate hydroperoxide lyase [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:B3LF83]
163	AT1G70700	4228,29	13025,15	8626,72	1,604	9,31E-23 TIFY domain/Divergent CCT motif family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A1P8AP17]
164	AT4G38540	10,35	31,60	20,98	1,599	3,46E-04 Monooxygenase 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O81816]
165	AT2G16660	113,43	334,06	223,75	1,571	3,56E-02 At2g16660/T24121.7 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SLF1]
166	AT2G26710	113,18	335,82	224,50	1,571	1,74E-11 CYP734A1 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VRF1]
167	AT4G23680	8,95	26,86	17,90	1,569	6,81E-03 AT4g23680/F9D16_150 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SUQ9]
168	AT1G77210	41,86	128,51	85,19	1,566	1,34E-06 Sugar transport protein 14 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8GW61]
169	AT2G23290	99,54	301,31	200,43	1,557	3,20E-07 At2g23280 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:O22179]
170	AT3G19680	1020,76	2726,25	1873,50	1,553	2,51E-02 Uncharacterized protein At3g19680 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LJM6]
171	AT1G15010	8,13	22,76	15,45	1,549	3,73E-02 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8LCU9]
172	AT1G21910	107,23	323,22	215,22	1,547	3,95E-13 DREB26 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178W3Q9]
173	AT1G13260	370,92	1026,76	698,84	1,544	1,22E-14 AP2/ERF and B3 domain-containing transcription factor RAV1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZWM9]
174	AT5G05440	33,14	96,28	64,71	1,541	9,19E-07 Abscisic acid receptor PYL5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FLB1]
175	AT1G70920	11,06	31,89	21,48	1,540	9,09E-03 Homeobox-leucine zipper protein ATHB-X [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8QXM7]
176	AT3G49790	161,59	478,18	319,88	1,539	7,22E-15 At3g49790 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9M2X9]
177	AT2G25200	311,66	893,16	602,41	1,534	2,47E-16 At2g25200 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SIS2]
178	AT1G73500	288,51	838,25	563,38	1,528	2,50E-22 Mitogen-activated protein kinase kinase 9 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FX43]
179	AT1G17380	91,68	267,33	179,50	1,525	6,03E-05 Protein TIFY 11A [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LDU5]
180	AT1G25560	380,35	1103,50	741,93	1,501	8,94E-16 AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor TEM1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9C6M5]
181	AT2G30930	158,09	462,44	310,27	1,497	1,05E-06 Expressed protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:O80858]
182	AT1G49700	14,40	40,28	27,34	1,491	3,84E-03 Plant protein 1589 of unknown function [Source:TAIR;Acc:AT1G49700]
183	AT4G16000	88,72	253,65	171,19	1,489	3,04E-06 Uncharacterized protein At4g16000 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q0WWC4]
184	AT1G21830	74,56	209,03	141,79	1,487	2,04E-15 At1g21820 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8VY47]
185	AT4G08950	150,48	426,78	288,63	1,485	1,15E-05 Protein EXORDIUM [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZPE7]
186	AT3G16420	165,10	462,29	313,69	1,483	1,87E-08 PYK10-binding protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O04314]
187	AT3G62950	168,52	470,56	319,54	1,472	4,07E-13 Glutaredoxin-C11 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LYC6]
188	AT4G15760	357,03	988,33	672,68	1,467	2,30E-12 monooxygenase 1 [Source:TAIR;Acc:AT4G15760]
189	AT1G52270	12,56	34,60	23,58	1,460	9,10E-04 Uncharacterized protein F19K6.11 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9C819]
190	AT2G01300	14,73	40,99	27,86	1,455	3,51E-03 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9ZU37]
191	AT1G70290	2327,25	6427,79	4377,52	1,452	4,33E-39 Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 8 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q0WU19]
192	AT5G41080	6,81	18,46	12,64	1,449	4,89E-02 Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDDP2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FLM1]
193	AT2G43590	88,32	241,64	164,98	1,448	4,70E-02 Endochitinase At2g43590 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O24658]
194	AT1G53830	10,63	28,86	19,74	1,447	1,70E-02 Pectinesterase 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q42534]
195	AT5G25210	7,42	20,22	13,82	1,438	3,87E-02 unknown protein. [Source:TAIR;Acc:AT5G25210]
196	AT2G25900	1858,99	4920,67	3389,83	1,435	7,87E-24 Zinc finger CCH domain-containing protein 23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O82307]
197	AT1G64200	422,20	1136,50	779,35	1,433	3,29E-10 vacuolar H+-ATPase subunit E isoform 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G64200]

198	AT4G18340	83,78	227,47	155,63	1,418	4,18E-14	Beta-1,3-glucanase-like protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8L837]
199	AT1G66400	30,10	80,17	55,14	1,411	1,43E-05	Probable calcium-binding protein CML23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9C8Y1]
200	AT4G22950	91,47	236,49	163,98	1,396	8,09E-05	Agamous-like MADS-box protein AGL19 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O82743]
201	AT5G45340	80,25	214,32	147,29	1,393	8,05E-05	Abscisic acid 8'-hydroxylase 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FH76]
202	AT5G40460	9,67	24,73	17,20	1,391	1,80E-02	Cyclin-dependent protein kinase inhibitor SMR6 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q29Q81]
203	AT1G24090	8,32	21,53	14,92	1,382	2,45E-02	RNase H domain-containing protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4I7R5]
204	AT1G15670	22,41	57,88	40,14	1,380	1,41E-03	F-box/kelch-repeat protein At1g15670 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LMR5]
205	AT1G76600	48,44	123,24	85,84	1,374	1,23E-07	Poly polymerase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9C9J8]
206	AT1G56650	206,98	534,57	370,78	1,370	3,49E-08	Transcription factor MYB75 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FE25]
207	AT5G66580	213,16	549,22	381,19	1,367	6,77E-05	Uncharacterized protein At5g66580 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FYJ2]
208	AT4G32280	56,55	149,62	103,08	1,366	2,66E-02	Auxin-responsive protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q2VVA0]
209	AT4G17460	384,20	994,53	689,36	1,356	1,20E-06	Homeobox-leucine zipper protein HAT1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P46600]
210	AT3G26500	7,52	19,19	13,36	1,350	1,59E-02	Plant intracellular Ras-group-related LRR protein 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LRV8]
211	AT3G58000	13,20	34,32	23,76	1,345	3,34E-02	VQ motif-containing protein 25 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9M2P8]
212	AT3G10930	16,09	37,89	26,99	1,343	6,46E-03	Uncharacterized protein At3g10930 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q84TK4]
213	AT1G80920	1248,54	3113,14	2180,84	1,343	2,00E-08	Chaperone protein dnaJ 8, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SAG8]
214	AT1G21130	229,82	576,46	403,14	1,335	6,93E-14	Indole glucosinolate O-methyltransferase 4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LPJ8]
215	AT5G42200	88,13	223,79	155,96	1,333	3,88E-11	E3 ubiquitin-protein ligase ATL23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8L9W3]
216	AT5G11070	574,48	1437,17	1005,83	1,331	4,34E-15	Uncharacterized protein At5g11070 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FY58]
217	AT4G19420	600,91	1555,38	1078,15	1,331	1,08E-08	Pectinacetyltransferase family protein [Source:TAIR;Acc:AT4G19420]
218	AT3G58120	77,44	194,51	135,98	1,330	6,63E-04	BZIP61 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:AOA178VLL5]
219	AT2G02950	276,86	694,70	485,78	1,328	3,64E-08	Protein PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SW11]
220	AT2G22810	13,41	33,86	23,63	1,325	3,82E-02	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q43309]
221	AT2G36080	14,92	37,73	26,33	1,324	3,05E-03	B3 domain-containing protein At2g36080 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8GYJ2]
222	AT2G17230	217,82	526,10	371,96	1,322	1,30E-03	Protein EXORDIUM-like 5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SII5]
223	AT2G38760	76,01	189,76	132,89	1,318	8,04E-09	Annexin [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:AOA178W040]
224	AT5G19230	31,01	77,13	54,07	1,315	2,76E-03	Uncharacterized GPI-anchored protein At5g19230 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8GUL8]
225	AT3G62550	133,95	373,26	253,60	1,314	5,99E-05	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q93W91]
226	AT3G62070	371,38	920,35	645,87	1,310	2,88E-05	At3g62070 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9M1R7]
227	AT2G27830	496,64	1222,60	859,62	1,307	6,17E-17	Expressed protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9ZUY4]
228	AT4G08870	8125,54	20186,91	14156,23	1,306	1,28E-15	ARGAH2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:AOA178V1K8]
229	AT3G51450	229,99	581,13	405,56	1,303	3,02E-06	Protein STRICTOSIDINE SYNTHASE-LIKE 7 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SD04]
230	AT1G19020	31,01	75,79	53,40	1,299	1,76E-03	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8VYY6]
231	AT4G21510	47,01	115,99	81,50	1,294	1,68E-06	F-box protein SKIP27 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O65416]
232	AT4G27410	609,39	1504,12	1056,75	1,289	2,12E-10	NAC domain transcriptional regulator superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4JIU9]
233	AT4G11280	747,64	1779,73	1263,69	1,289	2,65E-09	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SAR0]
234	AT2G17450	226,52	547,48	387,00	1,274	4,19E-15	Probable E3 ubiquitin-protein ligase ATL44 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O22755]
235	AT1G72416	16,05	38,76	27,40	1,269	3,45E-02	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B3H5X6]
236	AT1G02660	69,71	170,64	120,17	1,258	4,58E-04	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4HXL0]
237	AT2G36770	12,59	31,07	21,83	1,257	4,30E-02	Glycosyltransferase (Fragment) [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:W8QNU5]

238	AT1G02920	124,41	295,61	210,01	1,252	6,61E-04	Glutathione S-transferase F7 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q95RY5]
239	AT2G24240	38,95	97,81	68,38	1,248	5,50E-04	BTB/POZ domain-containing protein At2g24240 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZUH1]
240	AT2G13550	44,07	103,57	73,82	1,242	1,54E-02	unknown protein. [Source:TAIR;Acc:AT2G13550]
241	AT1G69370	225,65	542,08	383,87	1,242	3,69E-12	Chorismate mutase 3, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9C544]
242	AT3G02800	13,25	30,27	21,76	1,237	3,46E-02	Tyrosine-protein phosphatase DSP3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q681Z2]
243	AT5G52120	43,01	102,33	72,67	1,233	1,84E-05	F-box protein PP2-A14 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FJ80]
244	AT4G30270	431,48	1016,38	723,93	1,230	3,14E-16	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 24 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P24806]
245	AT4G34970	16,61	39,24	27,92	1,230	3,56E-02	Actin-depolymerizing factor 9 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q49606]
246	AT5G46710	27,54	61,05	44,30	1,227	2,69E-03	At5g46710 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FIQ4]
247	ATMG00040	20,40	48,12	34,26	1,227	2,49E-03	Uncharacterized ATP synthase C chain-like protein [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P93278]
248	AT3G28270	11043,20	25853,47	18448,33	1,225	3,46E-14	UPF0496 protein At3g28270 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LHD9]
249	AT2G27310	80,74	187,33	134,03	1,222	2,24E-05	F-box protein At2g27310 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9XIN8]
250	AT4G18440	4347,85	10150,17	7249,01	1,219	1,14E-06	Adenylosuccinate lyase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8RY94]
251	AT1G67910	97,58	228,00	162,79	1,217	1,70E-06	AT1G67910 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9C9V7]
252	AT4G24570	265,78	571,72	418,75	1,216	1,58E-02	DIC2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:AA178URN9]
253	AT1G50460	604,89	1405,78	1005,34	1,213	1,69E-24	Hexokinase-3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LPS1]
254	AT2G29670	1114,94	2595,65	1855,29	1,210	6,05E-16	At2g29670/T2A16.23 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:O82388]
255	AT1G32920	138,50	314,59	226,54	1,203	5,95E-04	At1g32920/F9L11_25 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q93W11]
256	AT5G57630	140,57	332,25	236,41	1,201	1,99E-06	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 21 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q94CG0]
257	AT3G61060	178,86	413,31	296,09	1,200	1,36E-05	Phloem protein 2-A13 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4JD33]
258	AT5G02090	22,62	51,38	37,00	1,200	2,07E-02	Uncharacterized protein At5g02090 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LZM2]
259	AT1G78000	30,14	70,84	50,49	1,195	3,95E-02	Sulfate transporter 1.2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9MAX3]
260	AT5G16370	359,27	820,27	589,77	1,194	3,57E-12	Probable acyl-activating enzyme 5, peroxisomal [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FFE6]
261	AT4G36040	2252,01	4971,69	3611,85	1,192	5,03E-05	At4g36040 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q1H544]
262	AT1G28330	70,52	165,77	118,14	1,190	4,23E-04	Dormancy-associated protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:B9DGG8]
263	AT2G32487	51,64	117,35	84,49	1,185	2,77E-04	unknown protein, [Source:TAIR;Acc:AT2G32487]
264	AT1G66160	44,92	100,56	72,74	1,183	1,38E-04	U-box domain-containing protein 20 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9C8D1]
265	AT3G50740	424,67	969,81	697,24	1,183	1,74E-12	UDP-glycosyltransferase 72E1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q94A84]
266	AT5G23820	501,37	1147,84	824,61	1,181	2,27E-05	MD-2-related lipid-recognition protein 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FF98]
267	AT5G63480	102,38	234,47	168,43	1,180	2,21E-06	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 30 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FMV4]
268	AT3G47160	16,53	38,38	27,45	1,179	1,34E-02	RING/U-box superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4JAD0]
269	AT1G62660	1576,64	3571,74	2574,19	1,179	2,24E-08	Acid beta-fructofuranosidase 3, vacuolar [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q43348]
270	AT3G50060	364,19	868,89	616,54	1,176	1,99E-05	Transcription factor MYB77 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SN12]
271	AT1G35210	18,80	43,31	31,06	1,175	2,18E-02	Uncharacterized protein T32G9.25 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9C6F2]
272	AT1G78460	334,44	759,13	546,78	1,174	2,08E-08	AT1G78460 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SYN5]
273	AT3G03265	78,11	176,80	127,45	1,173	1,02E-04	
274	AT3G04640	61,80	135,56	98,68	1,171	1,10E-05	At3g04640 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SR10]
275	AT4G04830	888,52	2030,29	1459,40	1,171	1,06E-22	Peptide methionine sulfoxide reductase B5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z591]
276	AT4G25810	15,15	34,91	25,03	1,167	2,18E-02	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q38910]
277	AT1G27290	680,94	1530,17	1105,55	1,162	1,36E-14	Transmembrane protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q94F23]

278	AT3G50800	21,58	51,21	36,39	1,155	5,07E-03	Uncharacterized protein At3g50800 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q95VL8]
279	AT2G18300	1575,47	3549,85	2562,66	1,154	9,14E-05	Basic helix-loop-helix (BHLH) DNA-binding superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4IQH8]
280	AT3G06070	781,58	1742,76	1262,17	1,149	8,85E-07	At3g06070 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8LED7]
281	AT1G49500	3255,42	7314,29	5284,85	1,145	4,87E-10	At1g49500/F13F21_6 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9XIB7]
282	AT5G65660	461,28	1020,78	741,03	1,144	1,22E-07	Uncharacterized protein At5g65660 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LSK9]
283	AT1G08920	142,59	325,15	233,87	1,143	7,37E-04	ERD (early response to dehydration) six-like 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G08920]
284	AT1G11175	137,75	305,52	221,63	1,142	4,65E-03	other RNA [Source:TAIR;Acc:AT1G11175]
285	AT2G28210	16,27	35,87	26,07	1,141	1,80E-02	ATACA2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VW72]
286	AT3G12500	18,46	40,53	29,50	1,141	7,84E-03	Basic endochitinase B [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P19171]
287	AT5G40230	11,56	25,48	18,52	1,138	4,30E-02	WAT1-related protein At5g40230 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:F4KHA8]
288	AT1G13700	31,51	69,65	50,58	1,133	1,98E-03	Probable 6-phosphogluconolactonase 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LMX8]
289	AT4G03510	67,69	148,66	108,18	1,131	2,34E-04	E3 ubiquitin-protein ligase RMA1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O64425]
290	AT3G57450	240,81	522,52	381,67	1,126	3,63E-02	At3g57450 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9SCM7]
291	AT1G68840	879,82	1929,64	1404,73	1,125	3,91E-22	TEM2 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178WNP0]
292	AT1G09575	33,27	72,32	52,79	1,121	9,14E-04	Calcium uniporter protein 6, mitochondrial [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:F41111]
293	AT3G59080	82,48	180,40	131,44	1,119	9,24E-05	AT3g59080/F17116_130 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LYS8]
294	AT5G14120	3169,73	7018,02	5093,87	1,118	2,69E-15	Major facilitator superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FMT8]
295	AT5G16410	56,44	122,18	89,31	1,115	5,50E-05	HXXXD-type acyl-transferase family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FFE4]
296	AT3G52400	140,90	313,69	227,30	1,113	2,94E-05	Syntaxin-122 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SVC2]
297	AT2G38750	765,72	1656,47	1211,09	1,107	4,34E-04	Annexin D4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZVJ6]
298	AT2G39400	145,74	335,24	240,49	1,105	2,48E-04	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:O80627]
299	AT1G33475	36,17	74,59	55,38	1,086	8,83E-03	Phytolongin Phy1.2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q84WF5]
300	AT2G46970	81,74	172,23	126,99	1,086	3,88E-05	Transcription factor PIL1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8L5W8]
301	AT3G49320	15,79	33,57	24,68	1,086	7,65E-03	Metal-dependent protein hydrolase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q95G17]
302	AT5G02940	3089,38	6546,44	4817,91	1,081	7,26E-25	Protein of unknown function (DUF1012) [Source:TAIR;Acc:AT5G02940]
303	AT1G18570	116,48	248,34	182,41	1,079	7,23E-05	Transcription factor MYB51 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q49782]
304	AT2G32100	681,07	1431,70	1056,39	1,077	1,12E-02	Transcription repressor OFP16 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q95KY9]
305	AT5G27420	55,64	117,68	86,66	1,074	7,97E-04	E3 ubiquitin-protein ligase ATL31 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8LGAS]
306	AT2G26530	178,88	364,55	271,72	1,072	1,83E-03	AR781 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VPT1]
307	AT1G74940	419,65	870,55	645,10	1,070	7,79E-05	Cyclin-dependent kinase, putative (DUF581) [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8GRN0]
308	AT1G06283	20,55	43,78	32,17	1,069	2,37E-02	
309	AT4G34930	24,97	52,29	38,63	1,067	1,06E-02	At4g34930 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q95W42]
310	AT2G35930	51,29	98,51	74,90	1,067	1,59E-02	E3 ubiquitin-protein ligase PUB23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q84TG3]
311	AT2G43820	490,92	1025,63	758,28	1,065	1,25E-03	Glycosyltransferase [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178VQS4]
312	AT4G23870	96,25	202,51	149,38	1,059	2,37E-03	Uncharacterized protein AT4g23870 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9T0A2]
313	AT1G02850	51,88	109,83	80,86	1,057	1,14E-02	Beta-glucosidase 11 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:B3H5Q1]
314	AT5G60680	1159,99	2342,22	1751,11	1,057	3,86E-09	Emb [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FF51]
315	AT1G04360	37,23	75,97	56,60	1,055	3,19E-03	RING-H2 finger protein ATL1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P93823]
316	AT4G15765	104,92	218,20	161,56	1,053	1,36E-05	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4JK86]
317	AT1G31760	18,04	37,45	27,75	1,053	4,87E-02	At1g31760 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9C504]

318	AT2G40000	2028,32	3929,98	2979,15	1,049	6,58E-09	Nematode resistance protein-like HSPRO2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O04203]
319	AT1G31550	372,68	768,95	570,82	1,045	1,43E-08	GDSL esterase/lipase At1g31550 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9C857]
320	AT5G57340	243,25	495,34	369,30	1,039	3,10E-11	Ras guanine nucleotide exchange factor Q-like protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LVCA]
321	AT5G66590	514,33	1058,72	786,53	1,035	6,88E-04	CAP superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FJY1]
322	AT4G23810	120,83	237,90	179,37	1,034	1,10E-02	Probable WRKY transcription factor 53 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SUP6]
323	AT5G42650	10609,47	21954,16	16281,81	1,033	5,94E-09	Allene oxide synthase, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q96242]
324	AT4G25835	36,14	73,65	54,89	1,027	1,67E-03	AAA-ATPase At4g25835 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8RY66]
325	AT3G18560	144,12	293,29	218,70	1,022	1,75E-13	AT3g18560/K24M9_5 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LIJ3]
326	AT5G59360	26,60	54,02	40,31	1,021	1,25E-02	Cyclin-dependent protein kinase inhibitor SMR14 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LTJ2]
327	AT1G19180	173,71	356,54	265,12	1,020	3,76E-04	TIFY10A [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178W7G1]
328	AT2G29300	706,47	1428,50	1067,48	1,017	2,74E-07	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4IKL5]
329	AT3G55840	28,42	59,81	44,11	1,013	4,53E-02	Nematode resistance protein-like HSPRO1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LY61]
330	AT3G50700	24,54	50,78	37,66	1,013	1,13E-02	Protein indeterminate-domain 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SCQ6]
331	AT2G24762	626,72	1264,39	945,56	1,013	1,36E-04	Protein GLUTAMINE DUMPER 4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8S8A0]
332	AT5G63880	41,28	83,25	62,26	1,012	1,15E-02	SNF7 family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F4KC57]
333	AT2G43535	39,28	78,79	59,04	1,010	2,23E-02	Defensin-like protein 196 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8RYE7]
334	AT1G03220	817,86	1636,88	1227,37	1,009	9,26E-04	Eukaryotic aspartyl protease family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9ZV54]
335	AT1G23870	266,28	542,32	404,30	1,007	1,02E-11	Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 9 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LRA7]
336	AT3G18773	464,81	878,95	671,88	1,006	6,36E-05	RING-H2 finger protein ATL77 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LS99]
337	AT3G28910	104,00	206,93	155,46	1,001	1,80E-05	Transcription factor MYB30 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SCU7]
338	AT4G01490	281,19	139,05	210,12	-1,006	1,08E-02	
339	AT2G32680	328,51	164,19	246,35	-1,019	1,96E-04	Receptor like protein 23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O48849]
340	AT4G23310	35,23	17,51	26,37	-1,022	4,02E-02	Putative cysteine-rich receptor-like protein kinase 23 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O65482]
341	AT2G20750	853,22	418,40	635,81	-1,026	8,85E-04	Expansin-B1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SKU2]
342	AT2G26150	459,76	229,12	344,44	-1,029	6,27E-08	Heat stress transcription factor A-2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O80982]
343	AT1G01520	1036,08	506,40	771,24	-1,029	9,09E-09	ASG4 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178W835]
344	ATCG00180	192,05	93,79	142,92	-1,030	6,10E-03	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P56763]
345	AT5G62210	192,67	98,22	145,45	-1,030	4,43E-02	Embryo-specific protein 3, (ATS3) [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LV85]
346	ATCG01050	38,38	18,79	28,58	-1,034	3,73E-02	NADH-Ubiquinone/plastoquinone (complex I) protein [Source:TAIR;Acc:ATCG01050]
347	AT2G01290	2075,31	1019,28	1547,30	-1,035	4,11E-20	Probable ribose-5-phosphate isomerase 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZU38]
348	AT4G39340	57,11	27,51	42,31	-1,041	4,01E-02	Egg cell-secreted protein 1.4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9T039]
349	AT1G24470	264,94	128,52	196,73	-1,045	9,72E-07	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase-like protein At1g24470 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9FYL6]
350	AT3G12970	93,05	45,95	69,50	-1,058	1,50E-02	At3g12970 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LD39]
351	AT1G14880	410,63	197,89	304,26	-1,071	9,19E-07	Protein PLANT CADMIUM RESISTANCE 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LQU2]
352	AT1G16515	82,52	38,97	60,75	-1,074	1,15E-02	unknown protein. [Source:TAIR;Acc:AT1G16515]
353	AT3G11010	676,85	320,11	498,48	-1,080	1,59E-08	Receptor-like protein 34 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9SRL2]
354	AT2G46790	1579,79	759,18	1169,48	-1,083	1,21E-08	Two-component response regulator-like APRR9 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8L500]
355	AT3G05650	462,99	219,55	341,27	-1,086	4,95E-07	Receptor-like protein 32 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9M9X0]
356	AT4G26950	93,26	45,48	69,37	-1,086	1,37E-03	At4g26950 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9S234]
357	AT4G04490	72,41	33,78	53,10	-1,094	7,20E-03	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 36 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9XEC6]

358	AT5G63130	50,30	23,83	37,06	-1,095	3,56E-02	At5g63130 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FML0]
359	AT4G03450	171,85	80,14	125,99	-1,098	1,90E-03	Ankyrin repeat family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9ZT73]
360	AT3G14200	722,67	343,33	533,00	-1,103	3,61E-08	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LJG5]
361	AT1G07607	85,60	41,46	63,53	-1,104	5,39E-03	
362	AT5G10760	850,82	396,46	623,64	-1,106	8,72E-07	Aspartyl protease AED1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LEW3]
363	AT4G27652	97,25	45,84	71,54	-1,109	2,10E-02	At4g27652 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8L9W9]
364	AT5G58160	854,67	396,11	625,39	-1,113	2,05E-17	Formin-like protein 13 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LVN1]
365	AT4G03500	113,05	52,72	82,88	-1,118	1,97E-03	Ankyrin repeat family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9ZT78]
366	AT4G15248	667,56	306,37	486,97	-1,120	9,88E-10	B-box domain protein 30 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q1G3I2]
367	AT1G51090	99,60	45,61	72,61	-1,125	2,24E-04	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9C684]
368	AT2G44940	636,03	284,49	460,26	-1,144	9,91E-12	Ethylene-responsive transcription factor ERF034 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8LBQ7]
369	AT1G68795	42,98	19,75	31,36	-1,149	2,51E-02	CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 12 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q29PU4]
370	AT4G10500	66,92	30,20	48,56	-1,153	1,26E-02	Protein DMR6-LIKE OXYGENASE 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z5A8]
371	AT1G15100	649,88	289,93	469,90	-1,160	1,05E-14	E3 ubiquitin-protein ligase RHA2A [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ZT50]
372	AT3G30720	114,13	51,00	82,57	-1,166	9,19E-03	Protein QQS [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q3E7K4]
373	AT3G28945	55,46	24,80	40,13	-1,171	6,99E-03	
374	AT2G39710	428,14	189,21	308,67	-1,178	2,91E-05	Eukaryotic aspartyl protease family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q22282]
375	AT3G25010	260,28	113,03	186,65	-1,194	1,32E-07	Receptor like protein 41 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A19LTP5]
376	AT5G34790	169,60	72,19	120,90	-1,199	1,62E-02	
377	AT5G11590	398,55	170,87	284,71	-1,199	6,18E-06	Dehydration-responsive element-binding protein 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LYD3]
378	AT3G18950	1752,99	760,69	1256,84	-1,210	1,87E-06	En/Spm-like transposon protein-like [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LJ71]
379	AT4G23200	128,42	55,24	91,83	-1,217	5,41E-04	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 12 [Source:TAIR;Acc:AT4G23200]
380	AT4G16857	40,99	17,48	29,24	-1,221	3,17E-02	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A1P8B877]
381	AT3G21150	673,45	285,97	479,71	-1,234	5,40E-05	B-box zinc finger protein 32 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LJB7]
382	AT1G35710	4506,05	1869,10	3187,58	-1,263	3,18E-23	Probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LP24]
383	AT1G48100	815,02	328,06	571,54	-1,319	1,12E-06	Polygalacturonase At1g48100 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q949Z1]
384	AT4G00700	52,22	20,81	36,51	-1,327	7,25E-04	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8RXU9]
385	AT1G74770	34,36	13,79	24,08	-1,329	3,93E-02	Zinc finger protein BRUTUS-like At1g74770 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:F4HVS0]
386	AT3G14280	55,14	21,52	38,33	-1,355	1,51E-02	At3g14280 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LUL9]
387	AT1G07900	45,66	17,77	31,72	-1,375	4,56E-03	LBD1 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A178WM56]
388	AT1G04570	76,68	28,82	52,75	-1,417	1,69E-03	Probable folate-biopterin transporter 8, chloroplastic [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:F4I5Q2]
389	AT3G23120	431,20	160,05	295,63	-1,425	2,00E-12	Receptor-like protein 38 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LS79]
390	AT1G20390	118,98	46,79	82,88	-1,437	6,21E-05	
391	AT5G34800	132,11	46,01	89,06	-1,462	3,31E-04	
392	AT3G05660	107,56	38,97	73,27	-1,467	1,41E-10	Receptor-like protein 33 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:F4J8G2]
393	AT3G15310	748,60	269,44	509,02	-1,471	4,34E-18	
394	AT4G08115	58,19	20,09	39,14	-1,484	7,65E-03	
395	AT2G05995	112,79	39,49	76,14	-1,507	1,37E-04	other RNA [Source:TAIR;Acc:AT2G05995]
396	AT5G47330	140,88	48,94	94,91	-1,521	5,66E-05	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9LV56]
397	AT5G34795	95,24	31,86	63,55	-1,530	2,64E-04	

398	AT3G23110	440,09	152,46	296,27	-1,533	6,85E-14 Receptor-like protein 37 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9LS80]
399	AT1G04220	667,34	229,94	448,64	-1,536	1,19E-06 3-ketoacyl-CoA synthase 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q5XEP9]
400	AT3G21890	368,21	125,59	246,90	-1,541	6,61E-19 BBX31 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:AOA178VEW7]
401	AT3G63060	33,07	11,05	22,06	-1,563	4,23E-02 EID1-like F-box protein 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q93ZT5]
402	AT3G09450	842,58	297,92	570,25	-1,588	8,15E-15 F3L24.34 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9S710]
403	AT1G53490	29,56	9,06	19,31	-1,612	4,83E-03 E3 ubiquitin-protein ligase CCNB1IP1 homolog [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:F4HR12]
404	AT5G15950	16758,84	5305,77	11032,31	-1,647	1,08E-30 S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q957T9]
405	AT4G33790	412,90	129,20	271,05	-1,687	1,69E-12 Fatty acyl-CoA reductase 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q93ZB9]
406	AT3G13277	74,11	19,79	46,95	-1,953	3,93E-06 other RNA [Source:TAIR;Acc:AT3G13277]
407	AT5G03210	163,32	40,55	101,93	-2,004	1,30E-06 Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MOK16 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9FYM8]
408	AT5G37300	1395,44	346,64	871,04	-2,017	9,37E-26 O-acyltransferase (WSD1-like) family protein [Source:TAIR;Acc:AT5G37300]
409	AT5G50530	63,05	10,45	36,75	-2,226	2,88E-02 CBS domain-containing protein CBSCB5PB4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q0WLC7]
410	AT2G30300	71,50	13,40	42,45	-2,458	2,69E-07 Major facilitator superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:O22926]
411	AT1G04247	69,19	12,34	40,76	-2,557	1,32E-05
412	AT2G06995	46,89	4,71	25,80	-3,363	2,58E-07

Annexe 3, listes des facteurs de transcriptions surexprimés chez le mutant *jao2*

Plus le \log_2 de fold change est élevé (en rouge) et plus le gène est surexprimé chez le mutant *jao2* par rapport au WT.

Accession	log2FoldChange	Famille	Nom	Réponse physiologique
1	9,178	ERF	ORA59	Antimicrobial defense (PDF1.2, PR4, ACT...)
2	3,215	ERF	ERF2	Antimicrobial defense, ET signaling
3	3,128	NAC	ANAC055	Stomatal opening, proline synthesis
4	2,596	MYB	MYB47	Upregulated by salt, drought and JA
5	2,494	ERF	ERF1	Induced upon necrotrophic attack, ET signaling, antimicrobial defense (PDF1.2, PR4...)
6	2,454	ERF	DREB subfamily A-5	ABA, drought and stress response
7	2,403	C3H	TZF5	ABA, drought and stress response
8	2,308	HD-ZIP	HB2	Plant hemoglobin synthesis, involved in cell expansion and cell proliferation
9	2,245	ERF	ERF107	Detoxification, Plant immunity
10	2,214	ERF	ERF18	Plant immunity
11	2,208	ERF	ERF3	Antimicrobial and plant systemic defense
12	2,073	bHLH	HFR1	Phytochrome A signaling
13	2,071	bHLH	NAI1	Regulates ER body formation, involved in herbivore resistance
14	1,976	ERF	ERF5	Defense against necrotrophs
15	1,961	bZIP	bZIP1	N ans sugar nutrient signaling
16	1,910	ERF	DREB subfamily A-2	ABA, drought and stress response
17	1,877	MYB	MYB73	Represses SOS response to salinity, regulates auxin responses in lateral root development
18	1,842	ERF	ERF6	Defense against necrotrophs
19	1,776	ERF	ERF104	Plant immunity
20	1,747	GRAS	RGL3	GA signal transduction
21	1,624	ERF	ERF22	Plant immunity
22	1,557	MYB	MYB70	Represses SOS response to salinity
23	1,547	ERF	DREB26	Responsive to salt, heat and drought
24	1,544	RAV	RAV1	Upregulated in response to low temperature
25	1,540	HD-ZIP	HB18	Expressed in stamens
26	1,501	RAV	TEM1	Regulation of flowering under long days
27	1,435	C3H	TZF1	Involved in RNA turnover
28	1,396	MIKC_MADS	AGL9	Flower development
29	1,370	MYB	MYB75, PAP1	Anthocyanin biosynthesis
30	1,356	HD-ZIP	HAT1	Regulates meristematic activity in different tissues, and correct gynoecium formation

31	AT3G58120	1,330	bZIP	BZIP61	Pollent formation
32	AT2G36080	1,324	B3	ABS2	Transcription repressor activity, flower petal and shoot development
33	AT4G27410	1,289	NAC	RD26	Induced by dessication, activates ABA responses
34	AT3G50060	1,176	MYB	MYB77	Induced by potassium deprivation and auxin, involved in lateral root development
35	AT2G18300	1,154	bHLH	HB11	Cell elongation, BR, GA, temperature responses
36	AT1G68840	1,125	RAV	RAV2, TEM2	Negative regul of drought and salt responses, touch-regulated
37	AT2G46970	1,086	bHLH	PIL1	Shade avoidance, photomorphogenesis
38	AT1G18570	1,079	MYB	MYB51	Insect defense, regulates indole glucosinolate biosynthesis
39	AT4G23810	1,034	WRKY	WRKY53	Senescence, bacterial defense
40	AT3G50700	1,013	C2H2	IDD2	Interacts with GA pathway
41	AT3G28910	1,001	MYB	MYB30	Regulates immune responses

- Biotics stress responses
- Abiotics stress responses
- Whose hydric stress responses
- Developpmental process

Annexe 4, listes des molécules d'extraits méthanoliques différentiellement accumulées entre WT et *jao2*

Parmi l'ensemble des métabolites d'*Arabidopsis* détectés et identifiés putativement issus des octoplicat WT et *jao2*, trois critères sont définis pour déterminer ceux qui sont sur ou sous accumulés chez le mutant. Premièrement la différence d'accumulation entre l'octoplicat WT et l'octoplicat *jao2* doit avoir une différence significative avec une valeur $p < 0,05$ (colonne *p-Value*) ; deuxièmement les composés doivent être détectés au minimum dans six des réplicats (colonnes *Count*) ; et troisièmement le *fold change* doit être inférieur à -1 (deux fois moins abondants) pour les métabolites suraccumulés et supérieur à 1 (deux fois plus abondants) pour ceux sous-accumulés chez le mutant *jao2* par rapport au WT (colonne *Fold Change*).

La liste présente les métabolites qui sont sous-accumulés chez WT (*fold change* de -1 et moins) signifiant qu'ils sont au minimum deux fois plus abondants chez *jao2* et suraccumulés chez WT (*fold change* de 1 et plus) signifiant qu'ils sont au minimum deux fois moins abondants chez *jao2*.

	Bucket	p-Value	Fold Change WT/jao2	Count WT	Count jao2
1	N1-trans-Feruloylagmatine	0,000008	-43,725	7	8
2	N1-trans-Feruloylagmatine	0,000002	-17,529	6	8
3	cis-p-Coumaroylagmatine	0,000001	-15,227	8	8
4	cis-p-Coumaroylagmatine	0,000001	-12,719	8	8
5	Quinoline	0,000801	-9,181	8	8
6	ascorbigen	0,000009	-6,535	8	8
7	4a,5-Dihydromonacolin L	0,003929	-6,098	6	8
8	RD 01A7	0,000034	-5,001	8	8
9	Quinoline	0,000008	-4,606	8	8
10	(indol-3-yl)acetaldehyde	0,001788	-3,788	8	8
11	(+)-Sattabacin	0,034302	-3,48	8	8
12	Arabidopside B	0,000004	-3,436	8	8
13	Arvelexin	0,003617	-3,273	8	8
14	9-(Methylthio)nonanenitrile	0,000103	-3,22	8	8
15	(R)-8-Methylsulfinyloctyl isothiocyanate	0,000127	-3,205	8	8
16	Quinoline	0,000119	-3,151	8	8
17	4-ethyl-5-methyl-2-propylthiazole	0,000036	-3,127	8	8
18	Cilistol u	0,000021	-3,087	8	8
19	Acetyldihydrolycopodine	0,000003	-3,063	7	8
20	Betaenone A	0,000048	-3,017	8	8
21	RD 01A7	0,004371	-2,937	8	8
22	(R)-7-Methylsulfinyl heptyl isothiocyanate	0,000191	-2,893	8	8
23	Inophylloic acid	0,000057	-2,782	8	8
24	4-O-(indol-3-ylacetyl)-beta-D-glucose	0,000018	-2,666	8	8
25	Luvungin A	0,000072	-2,635	8	8
26	Moluccensin E	0,000003	-2,628	8	8
27	Trilocularoside A	0,000001	-2,622	8	8
28	(indole-3-yl)acetonitrile	0,000332	-2,557	8	8
29	5-O-(indol-3-ylacetyl-myo-inositol) D-galactoside	0,000008	-2,533	8	8
30	Taxawallin A	0,001598	-2,512	8	8
31	Vernoguinoside	0,000028	-2,396	7	8
32	Rapalexin A	0,000269	-2,282	8	8
33	sn-glycero-3-phosphocholine	0,000025	-2,276	8	8
34	Arabidopside A	0,000032	-2,155	7	8
35	Quinoline	0,000056	-2,093	8	8
36	5-Methylsulfinylpentyl nitrile	0,000073	-2,083	8	8
37	Actein	0,000005	-2,061	8	8
38	Arabidopside A	0,0000	-2,04	8	8
39	Anibine	0,000066	-2,004	8	8
40	4-Methoxyglucobrassicin	0,000226	-1,991	8	8
41	Apo-13-zeaxanthinone	0,000181	-1,978	8	8
42	Iseluxine	0,000161	-1,91	8	7
43	3-(Methylthio)propanal	0,003063	-1,901	8	8
44	11-Epifusidic acid	0,000032	-1,884	8	8
45	4-Methylsulfinylbutyl isothiocyanate	0,00164	-1,875	8	8
46	[3R-(3R*,5S*,6E,9S*)]-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene-:	0,000118	-1,838	8	8
47	Iberin	0,003273	-1,83	8	8
48	Cimiracemoside M	0,000388	-1,828	8	8
49	Thiiranepropanenitrile	0,002817	-1,826	8	8
50	Arabidopside A	0,00004	-1,812	6	8
51	2'-Amino-2'-deoxyadenosine	0,000059	-1,81	8	8
52	3,5-Nonadiyne	0,000092	-1,795	8	8
53	Apo-13-zeaxanthinone	0,000316	-1,782	8	8

54	(-)-Sclareolide	0,003	-1,773	8	8
55	9,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,11,16-triol	0,045514	-1,751	8	8
56	xi-2-Methyl-1,3-oxathiane	0,001649	-1,75	8	8
57	Oblonganoside A	0,000329	-1,731	8	8
58	Montiporyne F	0,000018	-1,72	8	8
59	(E)-N-hydroxy-9-(methylsulfanyl)nonimidothioate	0,000003	-1,717	8	8
60	Uvarisesquiterpene B	0,00012	-1,717	8	8
61	Cladospolide D	0,000012	-1,716	8	8
62	2,3-Dihydro-5-methylthiophene	0,003818	-1,716	8	7
63	5alpha-Androst-1-ene-3beta,17beta-diol	0,024232	-1,715	8	8
64	Methyl 15-cyanopentadecanoate	0,001583	-1,703	8	8
65	3-Indolylmethylthiohydroximate	0,0000	-1,696	8	8
66	Glucobrassicin	0,0000	-1,671	8	8
67	3-Phenylpropanol	0,00041	-1,66	8	8
68	Pulicanadiene C	0,002783	-1,653	8	8
69	germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-al	0,000555	-1,644	8	8
70	Hericenone G	0,002389	-1,644	8	8
71	oryzalide A	0,007511	-1,634	8	8
72	Nor-ent-labdan-7-en-aldehyde	0,001542	-1,62	8	8
73	beta-Damascenone	0,001737	-1,613	8	8
74	(+)-3-longipinen-5-one	0,005736	-1,613	8	8
75	3,4-Dimethyl heptane	0,000473	-1,606	8	8
76	4-Amino-4-deoxychorismic acid	0,000074	-1,598	8	7
77	6-Oxo-7(9)-dehydro-6,7-dihydrogeranyl acetate	0,000486	-1,596	8	8
78	5,7a-Dihydro-1,4,4,7a-tetramethyl-4H-indene	0,001383	-1,588	8	8
79	3-(1-Carboxyvinylloxy)-benzoic acid	0,000017	-1,586	8	8
80	Lanyuamide I	0,000448	-1,579	8	8
81	chavicol	0,002628	-1,577	8	8
82	Isolinderanolide B	0,00501	-1,577	8	8
83	Methyl pheophorbide b	0,000381	-1,575	8	8
84	Boschnialactone	0,000014	-1,574	8	8
85	Fucoserratene	0,000088	-1,573	8	8
86	1-(9S,13S-12-oxo-11,15Z-phytydienoyl)-2-(7Z,10Z,13Z-hexadienyl)-1,3-dioxane	0,005675	-1,559	8	8
87	alpha-Licanic acid	0,013168	-1,545	8	8
88	beta-Damascenone	0,0000	-1,544	8	8
89	coniferyl alcohol 9-methyl ester	0,000183	-1,544	8	8
90	9Z-octadecenamide	0,000019	-1,538	8	8
91	25-Methoxyporicoic acid A	0,000091	-1,536	8	8
92	Callyspongenol A	0,003566	-1,535	7	8
93	5,7a-Dihydro-1,4,4,7a-tetramethyl-4H-indene	0,000879	-1,528	8	8
94	Pseudoconhydrine	0,004094	-1,525	8	8
95	Apo-9-zeaxanthinone	0,00024	-1,507	8	8
96	Chaulmoogric acid	0,001212	-1,504	8	8
97	N-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-ethanolamine	0,011426	-1,503	8	8
98	(E)-N-hydroxy-6-(methylsulfanyl)heximidothioate	0,000705	-1,501	8	8
99	delta1,3-Hydroxybakuchiol	0,00034	-1,5	8	8
100	beta-ionone	0,004339	-1,498	8	8
101	(6E)-8-oxogeranial	0,00125	-1,496	8	8
102	(2E,8E)-N-(2-methylpropyl)dodeca-2,8-dienamide	0,000053	-1,491	8	8
103	Callyspongenol B	0,003257	-1,488	8	7
104	3beta-hydroxy-9beta-pimara-7,15-diene-19,6beta-olide	0,000028	-1,487	8	8
105	Montiporyne F	0,000024	-1,486	8	8
106	Cladospolide B	0,001522	-1,486	8	8
107	(2E,8E)-N-(2-methylpropyl)dodeca-2,8-dienamide	0,003195	-1,485	8	8

108	desulfoglucobrassicin	0,000001	-1,482	8	8
109	Apo-14'-zeaxanthinal	0,003187	-1,48	8	8
110	Verruculogen	0,001324	-1,479	8	8
111	butyl benzoate	0,00139	-1,479	8	8
112	Santolinic acid methyl ester	0,002369	-1,476	8	8
113	Apo-13-zeaxanthinone	0,000044	-1,475	8	8
114	chavicol	0,000775	-1,471	8	8
115	2-Carboxyarabinitol 1-phosphate	0,014853	-1,463	8	8
116	Hericine C	0,000273	-1,459	8	8
117	22-Deoxyvariabilin	0,000654	-1,458	8	8
118	Lepadiformine B	0,015211	-1,456	8	8
119	8-(methylsulfanyl)octyl-desulfoglucosinolate	0,000028	-1,453	8	8
120	Apo-9-zeaxanthinone	0,001533	-1,45	8	8
121	4-Methoxyglucobrassicin	0,000009	-1,449	8	8
122	18-Hydroxy-9-octadecenoic acid	0,001001	-1,448	8	8
123	Farnesyl acetone	0,001279	-1,447	8	8
124	9,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,11,16-triol	0,004954	-1,441	8	8
125	Octadecanamide	0,00407	-1,432	8	8
126	(+)-costunolide	0,001932	-1,429	8	8
127	9,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,11,16-triol	0,000209	-1,42	8	8
128	Hyalodendroside A	0,000519	-1,418	8	8
129	olivetol	0,00019	-1,409	8	8
130	Neoazedarachin B	0,004726	-1,405	8	8
131	(+)-Sattabacin	0,001334	-1,395	8	8
132	3,5-Nonadiyne	0,002421	-1,388	8	8
133	L-Glutathione	0,005766	-1,388	8	8
134	Tashiromine	0,005718	-1,383	8	8
135	Siwanine C	0,0059	-1,383	8	8
136	(4S)-limonene	0,001272	-1,379	8	8
137	N-Isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide	0,013304	-1,371	8	8
138	nitrobenzene	0,029321	-1,37	8	8
139	Kobifuranone A	0,001828	-1,367	8	8
140	Ganoderic acid N	0,00932	-1,367	8	8
141	olivetol	0,000174	-1,363	8	8
142	(3S,5R,6R)-3,5-dihydroxy-6,7-didehydro-5,6-dihydro-12'-apo-	0,000044	-1,362	8	8
143	Farnesyl acetone	0,015039	-1,359	8	8
144	Tetrahydrobungeanool	0,003293	-1,354	8	8
145	Lamoxirene	0,001653	-1,345	8	8
146	(+)-Lepadin D	0,009398	-1,342	8	8
147	primary fluorescent chlorophyll catabolite	0,034775	-1,339	8	8
148	(E)-phenylacetaldehyde oxime	0,000851	-1,337	8	8
149	Tridecanamide	0,034265	-1,337	8	8
150	Hexadecanoylpyrrolidine	0,014691	-1,333	8	8
151	Farnesylacetone epoxide	0,009896	-1,33	8	8
152	(+)-Physoperuvine	0,004195	-1,329	8	8
153	Apo-14'-zeaxanthinal	0,008747	-1,328	8	8
154	3,4,7,11-Tetramethyl-6E,10Z-tridecadienal	0,021324	-1,327	8	8
155	(+)-Physoperuvine	0,010381	-1,326	8	8
156	Santene	0,001205	-1,324	8	8
157	Caprolactam	0,002585	-1,324	8	8
158	Apo-13-zeaxanthinone	0,006917	-1,319	8	8
159	3'-AMP	0,005228	-1,318	8	8
160	8-Methylthio-octyl glucosinolate	0,000066	-1,314	8	8
161	2-Hydroxyjuglone	0,002139	-1,313	8	8

162	Farnesyl acetone	0,007215	-1,313	8	8
163	2'-deoxyadenosine	0,000666	-1,31	8	8
164	Guavanoic acid	0,021452	-1,304	8	8
165	(8S,9S,10S)-8,10-dimethyl-1-octalin	0,016999	-1,3	8	8
166	1-Isopropyl-3-methylbenzene	0,008372	-1,296	8	8
167	Incarvilline	0,009514	-1,296	8	8
168	Farnesyl acetone	0,011323	-1,293	8	8
169	Fucoserratene	0,014078	-1,289	8	8
170	(2E)-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)but-2-enedioic acid	0,004075	-1,285	8	8
171	Capsiamide	0,038711	-1,285	8	8
172	Sargachromanol P	0,003627	-1,272	8	8
173	(3E)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene	0,046011	-1,272	8	8
174	Deoxyeritadenine	0,00389	-1,267	8	8
175	Siccanochromene B	0,026819	-1,267	8	8
176	6-Ethyl-4-methyl-3E,5E,7E-decatriene	0,03636	-1,267	8	8
177	o-Coumaric acid	0,022464	-1,265	8	8
178	Dracunculifoside L	0,012337	-1,264	8	8
179	23-Demycinosyltylosin	0,010531	-1,26	8	8
180	Pogostol O-methyl ether	0,021139	-1,26	8	8
181	15,16-Dinor-8(17),11E-labdadien-13-one	0,008924	-1,257	8	8
182	Hexadecanamide	0,036784	-1,255	8	8
183	Caprolactam	0,026608	-1,253	8	8
184	Calyxamine B	0,03425	-1,25	8	8
185	Incarvilline	0,01376	-1,247	8	8
186	L-dehydro-ascorbate	0,000056	-1,243	8	8
187	methylchavicol	0,01792	-1,242	8	8
188	(3E,7E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene	0,024946	-1,24	8	8
189	Dracunculifoside L	0,011416	-1,234	8	8
190	Indole-3-carboxylic acid	0,039475	-1,234	8	8
191	Halaminol B	0,038307	-1,227	8	8
192	Pregeijerene	0,041361	-1,227	8	8
193	Dovyalicine B	0,032348	-1,226	8	8
194	dehydroascorbate (bicyclic form)	0,047172	-1,221	8	8
195	glutarate	0,000324	-1,22	8	8
196	1-alpha-linolenoyl-2-alpha-linolenoyl-phosphatidylcholine	0,028913	-1,217	8	8
197	2-Acetonyl-3,5-dihydroxy-7-methoxy-1,4-naphthoquinone	0,045334	-1,217	8	8
198	7-(methylsulfanyl)heptyl-desulfoglucosinolate	0,032559	-1,212	8	8
199	Indole-3-acrylic acid	0,002419	-1,21	8	8
200	Ethyl plakortide Z	0,04502	-1,203	8	8
201	Succinic anhydride	0,001616	-1,201	8	8
202	Ximaolide G	0,022917	-1,199	8	8
203	(indol-3-yl)acetaldehyde	0,012986	-1,19	8	8
204	(2R,3S,4S)-leucodelphinidin	0,000269	-1,187	8	8
205	Lepadine B	0,036957	-1,184	8	8
206	Glucoraphanin	0,005522	-1,174	8	8
207	(E)-7-(methylsulfanyl)heptanal oxime	0,027614	-1,162	8	8
208	3,4-Dimethyl heptane	0,022229	-1,161	8	8
209	Hydroxymethylphosphonic acid	0,022214	-1,159	8	8
210	8-Methylsulfinyloctyl glucosinolate	0,009464	-1,155	8	8
211	scoparone	0,014825	-1,143	8	8
212	herniarin	0,001688	-1,129	4	8
213	Sulfopyruvic acid	0,001168	-1,122	7	8
214	L-leucine	0,024774	-1,098	8	8
215	Piceatannol	0,024697	-1,096	8	8

216	benzyl alcohol	0,015423	-1,093	8	8
217	herniarin	0,03397	-1,082	8	8
218	Piceatannol	0,002911	-1,072	7	8
219	Caprolactam	0,046162	-1,071	8	8
220	1-O-(E)-Caffeoyl-3,4-di-O-galloyl-beta-D-glucopyranose	0,033621	1,061	8	8
221	a reduced flavodoxin	0,028584	1,136	8	8
222	Lucidumoside B	0,029282	1,146	8	8
223	Pyroglutamic acid	0,046543	1,156	8	8
224	4-O- beta -D-glucosyl-daphnetin	0,00017	1,175	8	8
225	Floridimine	0,022873	1,175	8	8
226	L-cysteinyl-glycine	0,011356	1,176	8	8
227	Sanguisorbin E	0,009101	1,194	8	8
228	phloroglucinol	0,000698	1,202	8	8
229	alpha,4-Dimethylstyrene	0,005579	1,211	8	8
230	(+)-Sattabacin	0,041574	1,217	8	8
231	L-Glutathione	0,001918	1,229	8	8
232	Citroside A	0,000165	1,231	8	8
233	Citroside A	0,01144	1,235	8	8
234	hexane-1,5-diol	0,015491	1,251	8	8
235	Apo-9-zeaxanthinone	0,003311	1,252	8	8
236	5,6-epoxy-3-hydroxy-9-apo-beta-caroten-9-one	0,022056	1,269	8	8
237	scoparone	0,001053	1,273	8	8
238	(6E,10E)-geranylinalool	0,012167	1,276	8	8
239	Valencic acid	0,002731	1,289	8	8
240	4-Hydroxysphinganine	0,016059	1,303	8	8
241	(-)-Waal A	0,000033	1,325	8	8
242	coniferaldehyde glucoside	0,003527	1,325	8	8
243	Plumbagic acid	0,000108	1,336	8	8
244	Hexane-1,5-diol 1-O-beta-D-glucopyranoside	0,003489	1,336	8	8
245	juglone	0,00016	1,342	8	8
246	luteolinidin 5-O-glucoside	0,001784	1,347	8	8
247	2,6,10,14-Tetramethyl-6,10,15-hexadecatriene-2,3,8,14-tetr	0,000976	1,357	8	8
248	3-Hydroxyirisquinone	0,00004	1,358	8	8
249	Dearabinosyl pneumonanthoside	0,000817	1,369	8	8
250	pelargonidin 3,7-di-O-beta-D-glucoside	0,001347	1,385	8	8
251	sucrose	0,000196	1,387	8	8
252	juglone	0,000497	1,401	8	8
253	scoparone	0,000023	1,402	8	8
254	Cuscutic acid C	0,002898	1,416	8	8
255	octa-2,4,6-triyn-1-ol	0,000293	1,42	8	8
256	Arabidopside A	0,00007	1,422	8	8
257	(+)-Prosopinine	0,021759	1,427	8	8
258	(+)-Ascorbic acid	0,010886	1,435	8	8
259	scoparone	0,000027	1,438	8	8
260	2'-epi-Guianin	0,000348	1,462	8	8
261	Cnidioside A	0,000971	1,465	8	8
262	Nephelioside III	0,001211	1,469	8	8
263	Sterebin L	0,009828	1,483	8	8
264	7-hydroxy-8-methoxycoumarin	0,004286	1,485	8	8
265	1-(6Z,9Z,12Z-octadecatrienoyl)-glycero-3-phosphoethanolam	0,002732	1,508	8	8
266	(+)-sesamolinal	0,00011	1,525	8	8
267	Mochiquinone	0,002101	1,539	8	8
268	Cnidioside A	0,000022	1,551	8	8
269	1-O-sinapoyl-beta-D-glucose	0,000172	1,561	8	8

270	Plumbagic acid	0,000008	1,588	8	8
271	Wybutoxine	0,000839	1,611	8	8
272	cyanidin 3-O-sophoroside	0,00441	1,619	8	8
273	1-O-sinapoyl-beta-D-glucose	0,000936	1,638	8	8
274	Sterebin L	0,039844	1,659	8	8
275	2-hydroxycaffeate	0,000512	1,682	8	8
276	Mochiquinone	0,013943	1,706	8	8
277	2-Deacetoxytaxinine B	0,030671	1,755	8	7
278	Westiellamide	0,029685	1,867	8	8
279	Belizeanic acid	0,000323	3,802	8	8

CHAPITRE VII.

BIBLIOGRAPHIE

VII. Bibliographie

- Acosta, I.F., Gasperini, D., Chetelat, A., Stolz, S., Santuari, L., et Farmer, E.E.** (2013). Role of NINJA in root jasmonate signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 15473-15478.
- Acosta, I.F., Laparra, H., Romero, S.P., Schmelz, E., Hamberg, M., Mottinger, J.P., Moreno, M.A., et Dellaporta, L.S.** (2009). tasselseed1 Is a Lipoxygenase Affecting Jasmonic Acid Signaling in Sex Determination of Maize. *Science (80-.)*. **323**: 262-265.
- Adie, B.A.T., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M.M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J.J., Schmelz, E.A., et Solano, R.** (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1665-1681.
- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Reddy, M.K., et Sopory, S.K.** (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* **25**: 1263-1274.
- Ajjawi, I., Lu, Y., Savage, L.J., Bell, S.M., et Last, R.L.** (2010). Large-scale reverse genetics in Arabidopsis: case studies from the Chloroplast 2010 Project. *Plant Physiol.* **152**: 529-540.
- Aldridge, D.C., Galt, S., Giles, D., et Turner, W.B.** (1971). Metabolites of Lasiodiplodia theobromae. *J. Chem. Soc. C Org.:* 1623-1627.
- Ali, M.R.M., Uemura, T., Ramadan, A., Adachi, K., Nemoto, K., Nozawa, A., Hoshino, R., Abe, H., Sawasaki, T., et Arimura, G.-I.** (2019). The ring-type E3 ubiquitin ligase JUL1 targets the VQ-motif protein JAV1 to coordinate jasmonate signaling. *Plant Physiol.* **179**: 1273-1284.
- Amo, L., Jansen, J.J., Van Dam, N.M., Dicke, M., et Visser, M.E.** (2013). Birds exploit herbivore-induced plant volatiles to locate herbivorous prey. *Ecol. Lett.* **16**: 1348-1355.
- An, C., Li, L., Zhai, Q., You, Y., Deng, L., Wu, F., Chen, R., Jiang, H., Wang, H., Chen, Q., et Li, C.** (2017). Mediator subunit MED25 links the jasmonate receptor to transcriptionally active chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: E8930-E8939.
- Anderson, J.P., Badruzsafari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., et Kazan, K.** (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 3460-3479.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnström, Å., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Göbel, C., Feussner, I., et Ellerström, M.** (2006). Oxylipin profiling of the hypersensitive response in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* **281**: 31528-31537.
- Andreou, A., Brodhun, F., et Feussner, I.** (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* **48**: 148-170.
- Arnold, M.D., Gruber, C., Flokova, K., Miersch, O., Strnad, M., Novak, O., Wasternack, C., et Hause, B.** (2016). The recently identified isoleucine conjugate of cis-12-oxo-phytodienoic acid is partially active in cis-12-Oxo-Phytodienoic acid-specific gene expression of Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **11**: e0162829.
- Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F., et Heitz, T.** (2015). CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to Botrytis cinerea infection. *J. Exp. Bot.* **66**: 3879-3892.
- Babu C. V., S. et Gassmann, M.** (2016). Assessing integrity of plant RNA with the Agilent 2100 Bioanalyzer System. *Agil. Appl. Note* **5990-8850E**.
- Baldwin, I.T.** (1998). Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 8113-8118.
- Baldwin, I.T., Schmelz, E.A., et Ohnmeiss, T.E.** (1994). Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* spegazzini and comes. *J. Chem. Ecol.* **20**: 2139-2157.
- Banerjee, S. et Bose, I.** (2011). Transient pulse formation in jasmonate signaling pathway. *J. Theor. Biol.* **273**: 188-196.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M., et Castresana, C.** (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of Arabidopsis thaliana. *Lipids* **44**: 85-95.
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., et Pereira, A.** (2016). Plant adaptation to drought stress.

- Bell, E., Creelman, R.A., et Mullet, J.E.** (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 8675-8679.
- Bent, A.** (2006). Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. *Methods Mol. Biol.* **343**: 87-103.
- Berr, A., McCallum, E.J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T., et Shen, W.H.** (2010). Arabidopsis histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol.* **154**: 1403-1414.
- Birkett, M.A. et al.** (2000). New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 9329-9334.
- Blée, E.** (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* **7**: 315-322.
- Bonaventure, G., Gfeller, A., Proebsting, W.M., Hörtensteiner, S., Chételat, A., Martinoia, E., et Farmer, E.E.** (2007). A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in Arabidopsis. *Plant J.* **49**: 889-898.
- Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U., et Benfey, P.N.** (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* (80-.). **318**: 801-806.
- Brash, A.** (2009). Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* **70**: 1522-1531.
- Breithaupt, C., Kurzbauer, R., Lilie, H., Schaller, A., Strassner, J., Huber, R., Macheroux, P., et Clausen, T.** (2006). Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: Self-inhibition by dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 14337-14342.
- Bricchi, I., Leitner, M., Foti, M., Mithöfer, A., Boland, W., et Maffei, M.E.** (2010). Robotic mechanical wounding (MecWorm) versus herbivore-induced responses: early signaling and volatile emission in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Planta* **232**: 719-729.
- Browse, J.** (2009a). Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 183-205.
- Browse, J.** (2009b). The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochemistry* **70**: 1539-1546.
- Browse, J. et Howe, G.A.** (2008). New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol.* **146**: 832-838.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Chamberlain, K., Woodcock, C.M., Mohib, A., Webster, B., Smart, L.E., Birkett, M.A., Pickett, J.A., et Napier, J.A.** (2008). cis-Jasmone induces Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 4553-4558.
- Bruckhoff, V., Haroth, S., Feussner, K., König, S., Brodhun, F., et Feussner, I.** (2016). Functional Characterization of CYP94-Genes and Identification of a Novel Jasmonate Catabolite in Flowers. *PLoS One* **11**: e0159875.
- Bu, Q., Jiang, H., Li, C.B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q., et Li, C.** (2008). Role of the Arabidopsis thaliana NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res.* **18**: 756-767.
- Caarls, L., Elberse, J., Awwanah, M., Ludwig, N.R., De Vries, M., Zeilmaker, T., Van Wees, S.C.M., Schuurink, R.C., et Van den Ackerveken, G.** (2017). Arabidopsis JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 6388-6393.
- Cai, X.-T., Xu, P., Zhao, P.-X., Liu, R., Yu, L.-H., et Xiang, C.-B.** (2014). Arabidopsis ERF109 mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation. *Nat. Commun.* **5**: 5833.
- Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E.E., et Dong, X.** (2011). Arabidopsis lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Mol. Biol.* **75**: 25-33.
- Campos, M.L., Kang, J.H., et Howe, G.A.** (2014). Jasmonate-triggered plant immunity. *J. Chem. Ecol.* **40**: 657-675.
- Campos, M.L., Yoshida, Y., Major, I.T., De Oliveira Ferreira, D., Weraduwage, S.M., Froehlich, J.E., Johnson, B.F., Kramer, D.M., Jander, G., Sharkey, T.D., et Howe, G.A.** (2016). Rewiring of

jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nat. Commun.* **7**: 1-10.

- Capella, A., Menossi, M., Arruda, P., et Benedetti, C.** (2001). COI1 affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis*. *Planta* **213**: 691-699.
- Chauvin, A., Caldelari, D., Wolfender, J., et Farmer, E.E.** (2013). Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: A role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytol.* **197**: 566-575.
- Chehab, E.W., Kaspi, R., Savchenko, T., Rowe, H., Negre-Zakharov, F., Kliebenstein, D., et Dehesh, K.** (2008). Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PLoS One* **3**: e1904.
- Chen, Q.-F., Dai, L.-Y., Xiao, S., Wang, Y.-S., Liu, X.-L., et Wang, G.-L.** (2007). The *COI1* and *DFR* Genes are Essential for Regulation of Jasmonate-Induced Anthocyanin Accumulation in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **49**: 1370-1377.
- Chen, Q. et al.** (2011). The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 3335-52.
- Chen, R., Jiang, H., Li, L., Zhai, Q., Qi, L., Zhou, W., Liu, X., Li, H., Zheng, W., Sun, J., et Li, C.** (2012). The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *Plant Cell* **24**: 2898-2916.
- Chen, X., Wang, D.-D., Fang, X., Chen, X.-Y., et Mao, Y.-B.** (2019). Plant specialized metabolism regulated by jasmonate signaling. *Plant Cell Physiol.* **0**: 1-10.
- Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H.M., Cheng, Z., Xie, D., et Peng, J.** (2009a). Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **5**: e1000440.
- Cheng, W.H., Chiang, M.H., Hwang, S.G., et Lin, P.C.** (2009b). Antagonism between abscisic acid and ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Mol. Biol.* **71**: 61-80.
- Chico, J.M., Lechner, E., Fernandez-Barbero, G., Canibano, E., García-Casado, G., Franco-Zorrilla, J.M., Hammann, P., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M., Rubio, V., Genschik, P., et Solano, R.** (2020). CUL3BPM E3 ubiquitin ligases regulate MYC2, MYC3, and MYC4 stability and JA responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**: 6205-6215.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J.M., Fernández-Calvo, P., et Solano, R.** (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. *Plant J.* **59**: 77-87.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., et Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671.
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., et Solano, R.** (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **33**: 147-156.
- Chini, A., Monte, I., Zamarreño, A.M., Hamberg, M., Lassueur, S., Reymond, P., Weiss, S., Stintzi, A., Schaller, A., Porzel, A., García-Mina, J.M., et Solano, R.** (2018). An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nat. Chem. Biol.* **14**: 171-178.
- Christeller, J.T. et Galis, I.** (2014). α -Linolenic acid concentration and not wounding per se is the keyregulator of octadecanoid (oxylipin) pathway activity in rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **83**: 117-125.
- Chung, H.S., Cooke, T.F., Depew, C.L., Patel, L.C., Ogawa, N., Kobayashi, Y., et Howe, G.A.** (2010). Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *Plant J.* **63**: 613-622.
- Chung, H.S. et Howe, G.A.** (2009). A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 131-145.
- Chung, H.S., Koo, A.J.K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D., et Howe, G.A.** (2008).

Regulation and function of arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* **146**: 952-964.

- Collado-González, J., Durand, T., Ferreres, F., Medina, S., Torrecillas, A., et Gil-Izquierdo, Á.** (2015). Phytoprostanes. *Lipid Technol.* **27**: 127-130.
- Cui, M., Du, J., et Yao, X.** (2018). The binding mechanism between inositol phosphate (InsP) and the jasmonate receptor complex: A computational study. *Front. Plant Sci.* **9**: 963.
- Dabrowska, P. et Boland, W.** (2007). iso-OPDA: An early precursor of cis-jasmone in plants? *ChemBioChem* **8**: 2281-2285.
- Dai, L., Xu, L., Huang, D., Li, X., Luo, K., et Guan, C.** (2002). ASK1 physically interacts with COI1 and is required for male fertility in Arabidopsis. *Sci. China, Ser. C Life Sci.* **45**: 631-636.
- Dathe, W., Rönsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., et Schreiber, K.** (1981). Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* **153**: 530-535.
- Dave, A., Hernández, M.L., He, Z., Andriotis, V.M.E., Vaistij, F.E., Larson, T.R., et Graham, I.A.** (2011). 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 583-599.
- Dave, A., Vaistij, F.E., Gilday, A.D., Penfield, S.D., et Graham, I.A.** (2016). Regulation of Arabidopsis thaliana seed dormancy and germination by 12-oxo-phytodienoic acid. *J. Exp. Bot.* **67**: 2277-2284.
- Davies, R.T., Goetz, D.H., Lasswell, J., Anderson, M.N., et Bartel, B.** (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *Plant Cell* **11**: 365-376.
- Demole, E., Lederer, E., et Mercier, D.** (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* **45**: 675-685.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H., Chilcott, C., Zhu, T., et Turner, J.G.** (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol. Biol.* **58**: 497-513.
- Devoto, A., Nieto-rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., et Turner, J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *plant jour* **32**: 457-466.
- Dobritzsch, M., Lübken, T., Eschen-Lippold, L., Gorzolka, K., Blum, E., Matern, A., Marillonnet, S., Böttcher, C., Dräger, B., et Rosahl, S.** (2015). MATE transporter-dependent export of hydroxycinnamic acid amides. *Plant Cell* **28**: 583-596.
- Dodd, A.N., Kudla, J., et Sanders, D.** (2010). The Language of Calcium Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 593-620.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., et Kazan, K.** (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2225-2245.
- De Domenico, S., Bonsegna, S., Horres, R., Pastor, V., Taurino, M., Poltronieri, P., Imtiaz, M., Kahl, G., Flors, V., Winter, P., et Santino, A.** (2012). Transcriptomic analysis of oxylipin biosynthesis genes and chemical profiling reveal an early induction of jasmonates in chickpea roots under drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* **61**: 115-122.
- Dong, T., Park, Y., et Hwang, I.** (2015). Abscisic acid: biosynthesis, inactivation, homeostasis and signalling. *Essays Biochem.* **58**: 29-48.
- Durand, T., Bultel-Poncé, V., Guy, A., Berger, S., Mueller, M.J., et Galano, J.M.** (2009). New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes. *Lipids* **44**: 875-888.
- Durand, T., Bultel-Poncé, V., Guy, A., El Fangour, S., Rossi, J.C., et Galano, J.M.** (2011). Isoprostanes and phytoprostanes: Bioactive lipids. *Biochimie* **93**: 52-60.
- Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I.I., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., Berger, S., Schuenemann, D., et Mueller, M.J.** (2010). DONGLE and DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiol.* **153**: 114-127.
- Erb, M., Meldau, S., et Howe, G.A.** (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions.

- Etl, F., Berger, A., Weber, A., Schönenberger, J., et Dötterl, S.** (2016). Nocturnal plant bugs use cis-Jasmone to locate inflorescences of an Araceae as feeding and mating site. *J. Chem. Ecol.* **42**: 300-304.
- Falk, K.L., Kästner, J., Bodenhausen, N., Schramm, K., Paetz, C., Vassão, D.G., Reichelt, M., Von Knorre, D., Bergelson, J., Erb, M., Gershenzon, J., et Meldau, S.** (2014). The role of glucosinolates and the jasmonic acid pathway in resistance of *Arabidopsis thaliana* against molluscan herbivores. *Mol. Ecol.* **23**: 1188-1203.
- Farmaki, T., Sanmartín, M., Jiménez, P., Paneque, M., Sanz, C., Vancanneyt, G., León, J., et Sánchez-Serrano, J.J.** (2007). Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *J. Exp. Bot.* **58**: 555-568.
- Farmer, E., Mousavi, S., et Lenglet, A.** (2013). Leaf numbering for experiments on long distance signalling in *Arabidopsis*. *Protoc. Exch.*
- Farmer, E.E. et Dubugnon, L.** (2009). Detritivorous crustaceans become herbivores on jasmonate-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 935-940.
- Farmer, E.E., Gasperini, D., et Acosta, I.F.** (2014). The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytol.* **204**: 282-288.
- Farmer, E.E. et Ryan, C.A.** (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 7713-7716.
- Farrow, S.C. et Facchini, P.J.** (2014). Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Front. Plant Sci.* **5**: 1-15.
- Fernández-Milmanda, G.L. et al.** (2020). A light-dependent molecular link between competition cues and defence responses in plants. *Nat. Plants* **6**: 223-230.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., et Dewdney, J.** (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiol.* **144**: 367-379.
- Feussner, I. et Wasternack, C.** (2002). The Lipoxygenase Pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 275-297.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., et Turner, J.G.** (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759.
- Floková, K., Feussner, K., Herrfurth, C., Miersch, O., Mik, V., Tarkowská, D., Strnad, M., Feussner, I., Wasternack, C., et Novák, O.** (2016). A previously undescribed jasmonate compound in flowering *Arabidopsis thaliana* - The identification of cis-(+)-OPDA-Ile. *Phytochemistry* **122**: 230-237.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., et Solano, R.** (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 344-350.
- Fonseca, S., Fernández-Calvo, P., Fernández, G.M., Díez-Díaz, M., Gimenez-Ibanez, S., López-Vidriero, I., Godoy, M., Fernández-Barbero, G., Van Leene, J., De Jaeger, G., Franco-Zorrilla, J.M., et Solano, R.** (2014). bHLH003, bHLH013 and bHLH017 are new targets of JAZ repressors negatively regulating JA responses. *PLoS One* **9**: e86182.
- Footitt, S., Slocombe, S.P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A., et Holdsworth, M.** (2002). Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP. *EMBO J.* **21**: 2912-2922.
- Fu, Y., Ma, H., Chen, S., Gu, T., et Gong, J.** (2018). Control of proline accumulation under drought via a novel pathway comprising the histone methylase CAU1 and the transcription factor ANAC055. *J. Exp. Bot.* **69**: 579-588.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L.S.P., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K.** (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J.* **39**: 863-876.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., et Bak, S.** (2013). Plant defense against insect herbivores. *Int.*

J. Mol. Sci. **14**: 10242-10297.

- Gabbs, M., Leng, S., Devassy, J.G., Monirujjaman, M., et Aukema, H.M.** (2015). Advances in our understanding of oxylipins derived from dietary PUFAs. *Adv. Nutr.* **6**: 513-540.
- Galliard, T. et Phillips, D.R.** (1972). The enzymic conversion of linoleic acid into 9-(nona-1',3'-dienoxy)non-8-enoic acid, a novel unsaturated ether derivative isolated from homogenates of *Solanum tuberosum* tubers. *Biochem. J.* **129**: 743-753.
- Galliard, T., Phillips, D.R., et Frost, D.J.** (1973). Novel divinyl ether fatty acids in extracts of *Solanum tuberosum*. *Chem. Phys. Lipids* **11**: 173-180.
- Gan, Y., Li, H., Xie, Y., Wu, W., Li, M., Wang, X., et Huang, J.** (2014). THF1 mutations lead to increased basal and wound-induced levels of oxylipins that stimulate anthocyanin biosynthesis via COI1 signaling in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **56**: 916-927.
- Gao, Q.-M., Venugopal, S., Navarre, D., et Kachroo, A.** (2011). Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. *Plant Physiol.* **155**: 464-476.
- Gargallo-Garriga, A., Sardans, J., Pérez-Trujillo, M., Rivas-Ubach, A., Oravec, M., Vecerova, K., Urban, O., Jentsch, A., Kreyling, J., Beierkuhnlein, C., Parella, T., et Peñuelas, J.** (2014). Opposite metabolic responses of shoots and roots to drought. *Sci. Rep.* **4**: 1-7.
- Gasperini, D., Chauvin, A., Acosta, I.F., Kurenda, A., Stolz, S., Chételat, A., Wolfender, J.-L., et Farmer, E.E.** (2015a). Axial and radial oxylipin transport. *Plant Physiol.* **169**: 2244-2254.
- Gasperini, D., Chételat, A., Acosta, I.F., Goossens, J., Pauwels, L., Goossens, A., Dreos, R., Alfonso, E., et Farmer, E.E.** (2015b). Multilayered organization of jasmonate signalling in the regulation of root growth. *PLoS Genet.* **11**: 1-27.
- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M.G., et Mackey, D.** (2014). The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta* **240**: 1149-1165.
- Genva, M., Obounou Akong, F., Andersson, M.X., Deleu, M., Lins, L., et Fauconnier, M.L.** (2019). New insights into the biosynthesis of esterified oxylipins and their involvement in plant defense and developmental mechanisms. *Phytochem. Rev.* **18**: 343-358.
- Gfeller, A., Baerenfaller, K., Loscos, J., Chételat, A., Baginsky, S., et Farmer, E.E.** (2011). Jasmonate controls polypeptide patterning in undamaged tissue in wounded *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **156**: 1797-1807.
- Gidda, S.K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., et Varin, L.** (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**: 17895-17900.
- Giri, A.P., Wünsche, H., Mitra, S., Zavala, J.A., Muck, A., Svatos, A., et Baldwin, I.T.** (2006). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome. *Plant Physiol.* **142**: 1621-1641.
- Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavi, S.A.R., Rudaz, S., Wolfender, J.L., et Farmer, E.E.** (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **284**: 34506-34513.
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E.E., et Wolfender, J.L.** (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J. Biol. Chem.* **283**: 16400-16407.
- Goetz, S., Hellwege, A., Stenzel, I., Kutter, C., Hauptmann, V., Forner, S., McCaig, B., Hause, G., Miersch, O., Wasternack, C., et Hause, B.** (2012). Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiol.* **158**: 1715-1727.
- Gollack, D., Li, C., Mohan, H., et Probst, N.** (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front. Plant Sci.* **5**.
- Goodspeed, D., Chehab, E.W., Min-Venditti, A., Braam, J., et Covington, M.F.** (2012). *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 4674-4677.
- Goossens, J., Mertens, J., et Goossens, A.** (2017). Role and functioning of bHLH transcription factors

in jasmonate signalling. *J. Exp. Bot.* **68**: 1333-1347.

- Gorina, S.S., Toporkova, Y.Y., Mukhtarova, L.S., Chechetkin, I.R., Khairutdinov, B.I., Gogolev, Y. V., et Grechkin, A.N.** (2014). Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: Identification of *Ranunculus acris* leaf divinyl ether synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**: 1227-1233.
- Grechkin, A.N., Fazliev, F.N., et Mukhtarova, L.S.** (1995). The lipoxygenase pathway in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: detection of the novel divinyl ether oxylipins. *FEBS Lett.* **371**: 159-162.
- Grechkin, A.N. et Hamberg, M.** (2000). Formation of cyclopentenones from all-(E) hydroperoxides of linoleic acid via allene oxides. New insight into the mechanism of cyclization. *FEBS Lett.* **466**: 63-66.
- Guan, L., Denkert, N., Eisa, A., Lehmann, M., Sjuts, I., Weiberg, A., Soll, J., Meinecke, M., et Schwenkert, S.** (2019). JASSY, a chloroplast outer membrane protein required for jasmonate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**: 10568-10575.
- Guo, Q., Major, I.T., et Howe, G.A.** (2018a). Resolution of growth–defense conflict: mechanistic insights from jasmonate signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **44**: 72-81.
- Guo, Q., Yoshida, Y., Major, I.T., Wang, K., Sugimoto, K., Kapali, G., Havko, N.E., Benning, C., et Howe, G.A.** (2018b). JAZ repressors of metabolic defense promote growth and reproductive fitness in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**: E10768-E10777.
- Guranowski, A., Miersch, O., Staswick, P.E., Suza, W., et Wasternack, C.** (2007). Substrate specificity and products of side-reactions catalyzed by jasmonate:amino acid synthetase (JAR1). *FEBS Lett.* **581**: 815-820.
- Gutierrez, L., Mongelard, G., Floková, K., Pacurar, D.I., Novák, O., Staswick, P., Kowalczyk, M., Pacurar, M., Demailly, H., Geiss, G., et Bellini, C.** (2012). Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *Plant Cell* **24**: 2515-2527.
- Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., et Bellini, C.** (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* **12**: 294-300.
- Hagel, J.M. et Facchini, P.J.** (2018). Expanding the roles for 2-oxoglutarate-dependent oxygenases in plant metabolism. *Nat. Prod. Rep.* **35**: 721-734.
- Hamberg, M.** (1999). An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: Biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. *Lipids* **34**: 1131-1142.
- Hamberg, M.** (1995). Hydroperoxide isomerases. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **12**: 283-292.
- Hamberg, M.** (2000). New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato. *Lipids* **35**: 353-363.
- Hamberg, M., Sanz, A., et Castresana, C.** (1999). α -oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an α -dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J. Biol. Chem.* **274**: 24503-24513.
- Hamberg, M., Sanz, A., et Castresana, C.** (2002). α -Dioxygenase, a new enzyme in fatty acid metabolism. *Int. Congr. Ser.* **1233**: 307-317.
- Haroth, S., Feussner, K., Kelly, A.A., Zienkiewicz, K., Shaikhqasem, A., Herrfurth, C., et Feussner, I.** (2019). The glycosyltransferase UGT76E1 significantly contributes to 12-O-glucosylpyranosyl-jasmonic acid formation in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves. *J. Biol. Chem.* **294**: 9858-9872.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J., et Wasternack, C.** (2000). Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: Allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J.* **24**: 113-126.
- Hazman, M., Sühnel, M., Schäfer, S., Zumsteg, J., Lesot, A., Beltran, F., Marquis, V., Herrgott, L., Miesch, L., Riemann, M., et Heitz, T.** (2019). Characterization of Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile) Hormonal Catabolic Pathways in Rice upon Wounding and Salt Stress. *Rice* **12**: 1-14.
- He, G., Liu, P., Zhao, H., et Sun, J.** (2020). The HD-ZIP II transcription factors regulate plant architecture through the auxin pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **21**.
- He, Y., Zhang, H., Sun, Z., Li, J., Hong, G., Zhu, Q., Zhou, X., MacFarlane, S., Yan, F., et Chen, J.** (2017). Jasmonic acid-mediated defense suppresses brassinosteroid-mediated susceptibility to Rice black streaked dwarf virus infection in rice. *New Phytol.* **214**: 388-399.
- Hedden, P. et Thomas, S.G.** (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* **444**: 11-25.

- Heitz, T., Smirnova, E., Marquis, V., et Poirier, L.** (2019). Metabolic Control within the Jasmonate Biochemical Pathway. *Plant Cell Physiol.* **60**: 2621-2628.
- Heitz, T., Smirnova, E., Widemann, E., Aubert, Y., Pinot, F., et Ménard, R.** (2016). The rise and fall of jasmonate biological activities. *Subcell. Biochem.* **86**: 405-426.
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., Werck-Reichhart, D., et Pinot, F.** (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *J. Biol. Chem.* **287**: 6296-6306.
- Hickman, R. et al.** (2017). Architecture and Dynamics of the Jasmonic Acid Gene Regulatory Network. *Plant Cell* **29**: 2086-2105.
- Hisamatsu, Y., Goto, N., Hasegawa, K., et Shigemori, H.** (2003). Arabidopsides A and B, two new oxylipins from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Lett.* **44**: 5553-5556.
- Hisamatsu, Y., Goto, N., Sekiguchi, M., Hasegawa, K., et Shigemori, H.** (2005). Oxylipins arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. *J. Nat. Prod.* **68**: 600-603.
- Hözl, G. et Dörmann, P.** (2019). Chloroplast lipids and their biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **70**: 51-81.
- Howe, G.A. et Jander, G.** (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 41-66.
- Howe, G.A. et Schillmiller, A.L.** (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 230-236.
- Hu, J., Baker, A., Bartel, B., Linka, N., Mullen, R.T., Reumann, S., et Zolman, B.K.** (2012). Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell* **24**: 2279-2303.
- Hu, P., Zhou, W., Cheng, Z., Fan, M., Wang, L., et Xie, D.** (2013a). JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense. *Mol. Cell* **50**: 504-515.
- Hu, Y., Jiang, L., Wang, F., et Yu, D.** (2013b). Jasmonate regulates the INDUCER OF CBF expression-C-repeat binding factor/dre binding factor1 Cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 2907-2924.
- Huang, H., Liu, B., Liu, L., et Song, S.** (2017). Jasmonate action in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* **68**: 1349-1359.
- Huffaker, A., Pearce, G., Veyrat, N., Erb, M., Turlings, T.C.J., Sartor, R., Shen, Z., Briggs, S.P., Vaughan, M.M., Alborn, H.T., Teal, P.E.A., et Schmelz, E.A.** (2013). Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 5707-5712.
- Van Hulten, M., Pelser, M., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., et Ton, J.** (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 5602-5607.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L., et He, S.Y.** (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Mol. Plant* **7**: 1267-1287.
- Husar, S. et al.** (2011). Overexpression of the UGT73C6 alters brassinosteroid glucoside formation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **11**: 51.
- Hutton, J.J., Tappel, A.L., et Udenfriend, S.** (1967). Cofactor and substrate requirements of collagen proline hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **118**: 231-240.
- Hyun, Y. et al.** (2008). Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev. Cell* **14**: 183-192.
- Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., Mueller, O., Schroeder, A., et Auffray, C.** (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* **33**: 1-12.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., et Okada, K.** (2001). The DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2191-2209.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K.** (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **27**: 325-333.

- Jacobsen, J. V., Barrero, J.M., Hughes, T., Julkowska, M., Taylor, J.M., Xu, Q., et Gubler, F.** (2013). Roles for blue light, jasmonate and nitric oxide in the regulation of dormancy and germination in wheat grain (*Triticum aestivum* L.). *Planta* **238**: 121-138.
- Jimenez-Aleman, G.H., Almeida-Trapp, M., Fernández-Barbero, G., Gimenez-Ibanez, S., Reichelt, M., Vadassery, J., Mithöfer, A., Caballero, J., Boland, W., et Solano, R.** (2019). Omega hydroxylated JA-Ile is an endogenous bioactive jasmonate that signals through the canonical jasmonate signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1864**: 158520.
- Jimenez-Aleman, G.H., Machado, R.A.R., Baldwin, I.T., et Boland, W.** (2017a). JA-Ile-macrolactones uncouple growth and defense in wild tobacco. *Org. Biomol. Chem.* **15**: 3391-3395.
- Jimenez-Aleman, G.H., Machado, R.A.R., Baldwin, I.T., et Boland, W.** (2017b). JA-Ile-macrolactones uncouple growth and defense in wild tobacco. *Org. Biomol. Chem.* **15**: 3391-3395.
- Jimenez-Aleman, G.H., Machado, R.A.R., Görls, H., Baldwin, I.T., et Boland, W.** (2015). Synthesis, structural characterization and biological activity of two diastereomeric JA-Ile macrolactones. *Org. Biomol. Chem.* **13**: 5885-5893.
- Jones, J. et Dangl, J.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Jung, C., Zhao, P., Seo, J.S., Mitsuda, N., Deng, S., et Chua, N.H.** (2015). PLANT U-BOX PROTEIN10 regulates MYC2 stability in arabidopsis. *Plant Cell* **27**: 2016-2031.
- Kagale, S., Links, M.G., et Rozwasowski, K.** (2010). Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **152**: 1109-1134.
- Kandel, S., Sauveplane, V., Compagnon, V., Franke, R., Millet, Y., Schreiber, L., Werck-Reichhart, D., et Pinot, F.** (2007). Characterization of a methyl jasmonate and wounding-responsive cytochrome P450 of Arabidopsis thaliana catalyzing dicarboxylic fatty acid formation in vitro. *FEBS J.* **274**: 5116-5127.
- Kandzia, R., Stumpe, M., Berndt, E., Szalata, M., Matsui, K., et Feussner, I. v. o.** (2003). On the specificity of lipid hydroperoxide fragmentation by fatty acid hydroperoxide lyase from Arabidopsis thaliana. *J. Plant Physiol.* **160**: 803-809.
- Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., et Howe, G.A.** (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 7100-7105.
- Kawai, Y., Ono, E., et Mizutani, M.** (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant J.* **78**: 328-343.
- Kazan, K. et Manners, J.M.** (2013). MYC2: The master in action. *Mol. Plant* **6**: 686-703.
- Kazan, K. et Manners, J.M.** (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *J. Exp. Bot.* **62**: 4087-4100.
- Khan, M.S.** (2011). The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **25**: 2433-2442.
- Kienow, L., Schneider, K., Bartsch, M., Stuible, H.P., Weng, H., Miersch, O., Wasternack, C., et Kombrink, E.** (2008). Jasmonates meet fatty acids: Functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* **59**: 403-419.
- Kim, H.K. et Verpoorte, R.** (2010). Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem. Anal.* **21**: 4-13.
- Kim, J.M. et al.** (2017). Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nat. Plants* **3**: 4-10.
- Kim, Y.B., Li, X., Kim, S.J., Kim, H.H., Lee, J., Kim, H., et Park, S.U.** (2013). MYB transcription factors regulate glucosinolate biosynthesis in different organs of chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Molecules* **18**: 8682-8695.
- Kitaoka, N., Kawaide, H., Amano, N., Matsubara, T., Nabeta, K., Takahashi, K., et Matsuura, H.** (2014). CYP94B3 activity against jasmonic acid amino acid conjugates and the elucidation of 12-O- β -glucopyranosyl-jasmonoyl-l-isoleucine as an additional metabolite. *Phytochemistry* **99**: 6-13.
- Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., Matsui, H., Nabeta, K., et Matsuura, H.** (2011). Arabidopsis CYP94B3 encodes jasmonoyl-l-isoleucine 12-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of jasmonate. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1757-1765.

- Koch, T., Bandemer, K., et Boland, W.** (1997). Biosynthesis of cis-Jasmone: A pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helv. Chim. Acta* **80**: 838-850.
- Kombrink, E.** (2012). Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* **236**: 1351-1366.
- Koo, A.J.** (2017). Metabolism of the plant hormone jasmonate: a sentinel for tissue damage and master regulator of stress response. *Phytochem. Rev.* **17**: 51-80.
- Koo, A.J., Thireault, C., Zemelis, S., Poudel, A.N., Zhang, T., Kitaoka, N., Brandizzi, F., Matsuura, H., et Howe, G.A.** (2014). Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **289**: 29728-29738.
- Koo, A.J.K., Cooke, T.F., et Howe, G.A.** (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 9298-9303.
- Koo, A.J.K., Gao, X., Daniel Jones, A., et Howe, G.A.** (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. *Plant J.* **59**: 974-986.
- Koo, A.J.K., Hoo, S.C., Kobayashi, Y., et Howe, G.A.** (2006). Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **281**: 33511-33520.
- Kourtchenko, O., Andersson, M.X., Hamberg, M., Brunnstrom, A., Gobel, C., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Feussner, I., et Ellerstrom, M.** (2007). Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signaling dependence. *Plant Physiol.* **145**: 1658-1669.
- Ku, K.M., Jeffery, E.H., et Juvik, J.A.** (2014). Exogenous methyl jasmonate treatment increases glucosinolate biosynthesis and quinone reductase activity in kale leaf tissue. *PLoS One* **9**: e103407.
- Kuc, J.** (1995). Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 275-297.
- Kuhn, H., Wiesner, R., Rathmann, J., et Schewe, T.** (1991). Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids* **4**: 9-14.
- Kurotani, K., Hayashi, K., Hatanaka, S., Toda, Y., Ogawa, D., Ichikawa, H., Ishimaru, Y., Tashita, R., Suzuki, T., Ueda, M., Hattori, T., et Takeda, S.** (2015). Elevated Levels of CYP94 Family Gene Expression Alleviate the Jasmonate Response and Enhance Salt Tolerance in Rice. *Plant Cell Physiol.* **56**: 779-789.
- Lakehal, A., Ranjan, A., et Bellini, C.** (2020). Multiple Roles of Jasmonates in Shaping Rhizotaxis: Emerging Integrators. In *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), p. 3-22.
- Larrieu, A. et al.** (2015). A fluorescent hormone biosensor reveals the dynamics of jasmonate signalling in plants. *Nat. Commun.* **6**.
- Larrieu, A. et Vernoux, T.** (2015). Comparison of plant hormone signalling systems. *Essays Biochem.* **58**: 165-181.
- Larsen, P.B.** (2015). Mechanisms of ethylene biosynthesis and response in plants. *Essays Biochem.* **58**: 61-70.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Holländer-Czytko, H., et Weiler, E.W.** (1996). Cloning, molecular and functional characterization of Arabidopsis thaliana allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol. Biol.* **31**: 323-335.
- Lenglet, A., Jašlan, D., Toyota, M., Mueller, M., Müller, T., Schönknecht, G., Marten, I., Gilroy, S., Hedrich, R., et Farmer, E.E.** (2017). Control of basal jasmonate signalling and defence through modulation of intracellular cation flux capacity. *New Phytol.* **216**: 1161-1169.
- Leon-Morcillo, R.J., Angel, J., Martin-Rodriguez, Vierheilig, H., Ocampo, J.A., et Garcia-Garrido, J.M.** (2012). Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling. *J. Exp. Bot.* **63**: 3545-3558.
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E.S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S.C.M., Ritsema, T., et Pieterse, C.M.J.** (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* **232**: 1423-1432.

- Li, H., Xue, D., Gao, Z., Yan, M., Xu, W., Xing, Z., Huang, D., Qian, Q., et Xue, Y.** (2009). A putative lipase gene EXTRA GLUME1 regulates both empty-glume fate and spikelet development in rice. *Plant J.* **57**: 593-605.
- Li, J., Zhang, K., Meng, Y., Hu, J., Ding, M., Bian, J., Yan, M., Han, J., et Zhou, M.** (2018). Jasmonic acid/ethylene signaling coordinates hydroxycinnamic acid amides biosynthesis through ORA59 transcription factor. *Plant J.* **95**: 444-457.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., et Howe, G.A.** (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* **16**: 126-143.
- Li, Q., Zheng, J., Li, S., Huang, G., Skilling, S.J., Wang, L., Li, L., Li, M., Yuan, L., et Liu, P.** (2017). Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-isooleucine is essential for jasmonate signaling. *Mol. Plant* **10**: 695-708.
- Lin, S., Dong, Y., Li, X., Xing, Y., Liu, M., et Sun, X.** (2020). Ja-Ile-macrolactone 5b induces tea plant (*Camellia sinensis*) resistance to both herbivore ectropis obliqua and pathogen Colletotrichum camelliae. *Int. J. Mol. Sci.* **21**.
- Liu, Y., Ahn, J.E., Datta, S., Salzman, R.A., Moon, J., Huyghues-Despointes, B., Pittendrigh, B., Murdock, L.L., Koiwa, H., et Zhu-Salzman, K.** (2005). Arabidopsis vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase. *Plant Physiol.* **139**: 1545-1556.
- Liu, Y., Du, M., Deng, L., Shen, J., Fang, M., Chen, Q., Lu, Y., Wang, Q., Li, C., et Zhai, Q.** (2019). MYC2 regulates the termination of jasmonate signaling via an autoregulatory negative feedback loop. *Plant Cell* **31**: 106-127.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., et Solano, R.** (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1938-1950.
- Mabood, F., Souleimanov, A., Khan, W., et Smith, D.L.** (2006). Jasmonates induce Nod factor production by Bradyrhizobium japonicum. *Plant Physiol. Biochem.* **44**: 759-765.
- Machado, R.A., McClure, M., Hervé, M.R., Baldwin, I.T., et Erb, M.** (2016). Benefits of jasmonate-dependent defenses against vertebrate herbivores in nature. *Elife* **5**: e13720.
- Mandaokar, A. et Browse, J.** (2009). MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **149**: 851-862.
- Manzaneda, A.J., Prasad, K.V.S.K., et Mitchell-Olds, T.** (2010). Variation and fitness costs for tolerance to different types of herbivore damage in Boechera stricta genotypes with contrasting glucosinolate structures. *New Phytol.* **188**: 464-477.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., et Zhang, S.** (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 1639-1653.
- Marella, A., Tanwar, O.P., Saha, R., Ali, M.R., Srivastava, S., Akhter, M., Shaquiquzzaman, M., et Alam, M.M.** (2013). Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharm. J.* **21**: 1-12.
- Marquis, V., Smirnova, E., Poirier, L., Zumsteg, J., Schweizer, F., Reymond, P., et Heitz, T.** (2020). Stress- and pathway-specific impacts of impaired jasmonoyl-isooleucine (JA-Ile) catabolism on defense signalling and biotic stress resistance. *Plant Cell Environ.*: 1-13.
- Martinez, S. et Hausinger, R.P.** (2015). Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases. *J. Biol. Chem.* **290**: 20702-20711.
- Matthes, M.C., Bruce, T.J.A., Ton, J., Verrier, P.J., Pickett, J.A., et Napier, J.A.** (2010). The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in Arabidopsis thaliana and its role in indirect defence. *Planta* **232**: 1163-1180.
- McConn, M. et Browse, J.** (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an Arabidopsis mutant. *Plant Cell* **8**: 403-416.
- Meena, M.K., Prajapati, R., Krishna, D., Divakaran, K., Pandey, Y., Reichelt, M., Mathew, M.K., Boland, W., Mithöfer, A., et Vadassery, J.** (2019). The Ca²⁺ channel CNGC19 regulates arabidopsis defense against spodoptera herbivory. *Plant Cell* **31**: 1539-1562.
- Meesapyodsuk, D. et Qiu, X.** (2011). A peroxygenase pathway involved in the biosynthesis of epoxy

- fatty acids in oat. *Plant Physiol.* **157**: 454-463.
- Meesters, C., Mönig, T., Oeljeklaus, J., Krahn, D., Westfall, C.S., Hause, B., Jez, J.M., Kaiser, M., et Kombrink, E.** (2014). A chemical inhibitor of jasmonate signaling targets JAR1 in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 830-836.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., Howe, G.A., et He, S.Y.** (2008). A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J.* **55**: 979-988.
- Mielke, S. et Gasperini, D.** (2019). Interplay between plant cell walls and jasmonate production. *Plant Cell Physiol.* **0**: 1-9.
- Miersch, O., Herrmann, G., Kramell, H.M., et Sembdner, G.** (1987). Biological activity of jasmonic acid glucosyl ester. *Biochem. und Physiol. der Pflanz.* **182**: 425-428.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., et Wasternack, C.** (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* **177**: 114-127.
- Miquel, M. et Browse, J.** (1992). *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis: Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J. Biol. Chem.* **267**: 1502-1509.
- Mizutani, M. et Ohta, D.** (2010). Diversification of P450 Genes During Land Plant Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 291-315.
- Monte, I., Hamberg, M., Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., García-Casado, G., Porzel, A., Pazos, F., Boter, M., et Solano, R.** (2014). Rational design of a ligand-based antagonist of jasmonate perception. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 671-676.
- Mosblech, A., Feussner, I., et Heilmann, I.** (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol. Biochem.* **47**: 511-517.
- Mousavi, S.A.R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., et Farmer, E.E.** (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**: 422-426.
- Msanne, J., Lin, J., Stone, J.M., et Awada, T.** (2011). Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes. *Planta* **234**: 97-107.
- Mueller, O., Lightfoot, S., et Schroeder, A.** (2004). RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control Application. *Nano*: 1-17.
- Munemasa, S., Oda, K., Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., et Murata, Y.** (2007). The *coronatine - insensitive 1* Mutation Reveals the Hormonal Signaling Interaction between Abscisic Acid and Methyl Jasmonate in *Arabidopsis* Guard Cells. Specific Impairment of Ion Channel Activation and Second Messenger Production. *Plant Physiol.* **143**: 1398-1407.
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., et Nishioka, T.** (2009). Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **230**: 517-527.
- Muroi, A., Matsui, K., Shimoda, T., Kihara, H., Ozawa, R., Ishihara, A., Nishihara, M., et Arimura, G.I.** (2012). Acquired immunity of transgenic *torenia* plants overexpressing agmatine coumaroyltransferase to pathogens and herbivore pests. *Sci. Rep.* **2**: 1-7.
- Nagels Durand, A., Pauwels, L., et Goossens, A.** (2016). The ubiquitin system and jasmonate signaling. *Plants* **5**: 6.
- Nakamura, Y., Mithofer, A., Kombrink, E., Boland, W., Hamamoto, S., Uozumi, N., Tohma, K., et Ueda, M.** (2011). 12-hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiol.* **155**: 1226-1236.
- Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A.J.K., Moreno, J.E., Suzuki, K., Howe, G.A., et Ohme-Takagi, M.** (2013). A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 1641-1656.
- Nakata, M. et Ohme-Takagi, M.** (2013). Two bHLH-type transcription factors, JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE2 and JAM3, are transcriptional repressors and affect male fertility. *Plant Signal. Behav.* **8**: e26473.

- Nambara, E. et Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 165-185.
- Nelson, D. et Werck-Reichhart, D.** (2011). A P450-centric view of plant evolution. *Plant J.* **66**: 194-211.
- Newcomer, M.E. et Brash, A.R.** (2015). The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Sci.* **24**: 298-309.
- Nguyen, D., Rieu, I., Mariani, C., et van Dam, N.M.** (2016). How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory. *Plant Mol. Biol.* **91**: 727-740.
- Nilsson, A.K., Fahlberg, P., Ellerström, M., et Andersson, M.X.** (2012). Oxo-phytodienoic acid (OPDA) is formed on fatty acids esterified to galactolipids after tissue disruption in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **586**: 2483-2487.
- Nishii, A., Takemura, M., Fujita, H., Shikata, M., Yokota, A., et Kohchi, T.** (2000). Characterization of a Novel Gene Encoding a Putative Single Zinc-finger Protein, ZIM, Expressed during the Reproductive Phase in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1402-1409.
- Nuñez, A., Foglia, T.A., et Piazza, G.J.** (2001). Characterization of lipoxygenase oxidation products by high-performance liquid chromatography with electron impact-mass spectrometric detection. *Lipids* **36**: 851-856.
- de Ollas, C., Arbona, V., et Gómez-Cadenas, A.** (2015). Jasmonoyl isoleucine accumulation is needed for abscisic acid build-up in roots of *Arabidopsis* under water stress conditions. *Plant, Cell Environ.* **38**: 2157-2170.
- de Ollas, C. et Dodd, I.C.** (2016). Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. *Plant Mol. Biol.* **91**: 641-650.
- Oluwafemi, S., Dewhurst, S.Y., Veyrat, N., Powers, S., Bruce, T.J.A., Caulfield, J.C., Pickett, J.A., et Birkett, M.A.** (2013). Priming of Production in Maize of Volatile Organic Defence Compounds by the Natural Plant Activator cis-Jasmone. *PLoS One* **8**: e62299.
- Park, J., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., et Feyereisen, R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* **31**: 1-12.
- Patkar, R.N., Benke, P.I., Qu, Z., Chen, Y.Y.C., Yang, F., Swarup, S., et Naqvi, N.I.** (2015). A fungal monooxygenase-derived jasmonate attenuates host innate immunity. *Nat. Chem. Biol.* **11**: 733-740.
- Pauwels, L. et al.** (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788-791.
- Pauwels, L. et al.** (2015). The RING E3 Ligase KEEP ON GOING modulates JASMONATE ZIM-DOMAIN12 stability. *Plant Physiol.* **169**: 1405-1417.
- Pauwels, L. et Goossens, A.** (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**: 3089-3100.
- Pedras, M.S.C. et Adio, A.M.** (2008). Phytoalexins and phytoanticipins from the wild crucifers *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*: Rapalexin A, wasalexins and camalexin. *Phytochemistry* **69**: 889-893.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M., et Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-2323.
- Pfalz, M., Mikkelsen, M.D., Bednarek, P., Olsen, C.E., Halkier, B.A., et Kroymann, J.** (2011). Metabolic engineering in *Nicotiana benthamiana* reveals key enzyme functions in *Arabidopsis* indole glucosinolate modification. *Plant Cell* **23**: 716-729.
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., et Van Wees, S.C.M.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**: 489-521.
- Pinot, F. et Beisson, F.** (2011). Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS J.* **278**: 195-205.
- Piotrowska, A. et Bajguz, A.** (2011). Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**: 2097-2112.

- Pluskota, W.E., Qu, N., Maitrejean, M., Boland, W., et Baldwin, I.T.** (2007). Jasmonates and its mimics differentially elicit systemic defence responses in *Nicotiana attenuata*. *J. Exp. Bot.* **58**: 4071-4082.
- Van de Poel, B. et Van Der Straeten, D.** (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front. Plant Sci.* **5**: 1-11.
- Pollmann, S., Springer, A., Rustgi, S., Von Wettstein, D., Kang, C.H., Reinbothe, C., et Reinbothe, S.** (2019). Substrate channeling in oxylipin biosynthesis through a protein complex in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **70**: 1483-1495.
- Porco, S. et al.** (2016). Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 11016-11021.
- Potter, S., Uknes, S., Lawton, K., Winter, A.M., Chandler, D., DiMaio, J., Novitzky, R., Ward, E., et Ryals, J.** (1993). Regulation of a Hevein-like Gene in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 680.
- Poudel, A.N., Holtsclaw, R.E., Kimberlin, A., Sen, S., Zeng, S., Joshi, T., Lei, Z., Sumner, L.W., Singh, K., Matsuura, H., et Koo, A.J.** (2019). 12-Hydroxy-jasmonoyl-L-isoleucine is an active jasmonate that signals through CORONATINE INSENSITIVE 1 and contributes to the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **0**: 1-15.
- Poudel, A.N., Zhang, T., Kwasniewski, M., Nakabayashi, R., Saito, K., et Koo, A.J.** (2016). Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**: 1396-1408.
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M.J., et Memelink, J.** (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* **147**: 1347-1357.
- Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., Yano, R., Kamiya, Y., et Nambara, E.** (2009). Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: A comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1786-1800.
- Puhl, I., Stadler, F., et Treutter, D.** (2008). Alterations of flavonoid biosynthesis in young grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves, flowers, and berries induced by the dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 2498-2504.
- Qi, J., Li, J., Han, X., Li, R., Wu, J., Yu, H., Hu, L., Xiao, Y., Lu, J., et Lou, Y.** (2016). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase regulates development and herbivory-induced defense response in rice. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 564-576.
- Qi, T., Huang, H., Song, S., et Xie, D.** (2015). Regulation of Jasmonate-Mediated Stamen Development and Seed Production by a bHLH-MYB Complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**: 1620-1633.
- Qi, T., Huang, H., Wu, D., Yan, J., Qi, Y., Song, S., et Xie, D.** (2014). *Arabidopsis* DELLA and JAZ proteins bind the WD-repeat/bHLH/MYB complex to modulate gibberellin and jasmonate signaling synergy. *Plant Cell* **26**: 1118-1133.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., et Xie, D.** (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1795-1814.
- Qiu, Y., Xi, J., Du, L., Suttle, J.C., et Poovaiah, B.W.** (2012). Coupling calcium/calmodulin-mediated signaling and herbivore-induced plant response through calmodulin-binding transcription factor AtSR1/CAMTA3. *Plant Mol. Biol.* **79**: 89-99.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., et Job, D.** (2012). Seed Germination and Vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**: 507-533.
- Ren, C., Pan, J., Peng, W., Genschik, P., Hobbie, L., Hellmann, H., Estelle, M., Gao, B., Peng, J., Sun, C., et Xie, D.** (2005). Point mutations in *Arabidopsis* Cullin1 reveal its essential role in jasmonate response. *Plant J.* **42**: 514-524.
- Riemann, M., Dhakarey, R., Hazman, M., Miro, B., Kohli, A., et Nick, P.** (2015). Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Front. Plant Sci.* **6**: 1077.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., et Phillips, A.L.** (2008). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-

- oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 2420-2436.
- Robson, F., Okamoto, H., Patrick, E., Sue-Ré, H., Wasternack, C., Brearley, C., et Turner, J.G.** (2010). Jasmonate and phytochrome a signaling in arabidopsis wound and shade responses are integrated through JAZ1 stability. *Plant Cell* **22**: 1143-1160.
- Rodríguez, V.M., Chételat, A., Majcherczyk, P., et Farmer, E.E.** (2010). Chloroplastic phosphoadenosine phosphosulfate metabolism regulates basal levels of the prohormone jasmonic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.* **152**: 1335-1345.
- Rohwer, C.L. et Erwin, J.E.** (2008). Horticultural applications of jasmonates: A review. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **83**: 283-304.
- Rowe, H.C., Walley, J.W., Corwin, J., Chan, E.K.F., Dehesh, K., et Kliebenstein, D.J.** (2010). Deficiencies in jasmonate-mediated plant defense reveal quantitative variation in *Botrytis cinerea* pathogenesis. *PLoS Pathog.* **6**: e1000861.
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., et Zhang, K.** (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **20**.
- Rustgi, S. et al.** (2019). ALLENE OXIDE SYNTHASE and HYDROPEROXIDE LYASE, two non-canonical cytochrome P450s in Arabidopsis thaliana and their different roles in plant defense. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 3064.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K.** (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**: 998-1009.
- Sanchez Carranza, A.P., Singh, A., Steinberger, K., Panigrahi, K., Palme, K., Dovzhenko, A., et Dal Bosco, C.** (2016). Hydrolases of the ILR1-like family of Arabidopsis thaliana modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Sci. Rep.* **6**: 1-11.
- Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., et Flors, V.** (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep.* **32**: 1085-1098.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A., et Estelle, M.** (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 301-307.
- Santner, A. et Estelle, M.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**: 1071-1078.
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., Ohta, H., et Shirasu, K.** (2013). Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **163**: 291-304.
- Sasaki-Sekimoto, Y., Saito, H., Masuda, S., Shirasu, K., et Ohta, H.** (2014). Comprehensive analysis of protein interactions between JAZ proteins and BHLH transcription factors that negatively regulate jasmonate signaling. *Plant Signal. Behav.* **9**: e27639.
- Sato, C., Aikawa, K., Sugiyama, S., Nabeta, K., Masuta, C., et Matsuura, H.** (2011). Distal Transport of Exogenously Applied Jasmonoyl-Isoleucine with Wounding Stress. *Plant Cell Physiol.* **52**: 509-517.
- Savchenko, T. V., Zastrijnaja, O.M., et Klimov, V. V.** (2014). Oxylipins and plant abiotic stress resistance. *Biochem.* **79**: 362-375.
- Scalschi, L., Sanmartín, M., Camañes, G., Troncho, P., Sánchez-Serrano, J.J., García-Agustín, P., et Vicedo, B.** (2015). Silencing of *OPR3* in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *Plant J.* **81**: 304-315.
- Schäfer, M., Fischer, C., Meldau, S., Seebald, E., Oelmüller, R., et Baldwin, I.T.** (2011). Lipase activity in insect oral secretions mediates defense responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **156**: 1520-1534.
- Schaller, A. et Stintzi, A.** (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**: 1532-1538.
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., et Weiler, E.W.** (2000). 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**: 979-984.

- Schaller, F. et Weiler, E.W.** (1997). Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants. *Eur. J. Biochem.* **245**: 294-299.
- Schaller, F., Zerbe, P., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Hofmann, E., et Pollmann, S.** (2008). The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* - localization and cyclization. *FEBS J.* **275**: 2428-2441.
- Scheres, B. et Krizek, B.A.** (2018). Coordination of growth in root and shoot apices by AIL/PLT transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **41**: 95-101.
- Scholz, S.S., Reichelt, M., Boland, W., et Mithöfer, A.** (2015). Additional evidence against jasmonate-induced jasmonate induction hypothesis. *Plant Sci.* **239**: 9-14.
- Schrick, K., Bruno, M., Khosla, A., Cox, P.N., Marlatt, S.A., Roque, R.A., Nguyen, H.C., He, C., Snyder, M.P., Singh, D., et Yadav, G.** (2014). Shared functions of plant and mammalian StAR-related lipid transfer (START) domains in modulating transcription factor activity. *BMC Biol.* **12**: 70.
- Schubert, R., Dobritsch, S., Gruber, C., Hause, G., Athmer, B., Schreiber, T., Marillonnet, S., Okabe, Y., Ezura, H., Acosta, I.F., Tarkowsk, D., et Hause, B.** (2019). Tomato myb21 acts in ovules to mediate jasmonate-regulated fertility. *Plant Cell* **31**: 1043-1062.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatoš, A., Halkier, B.A., et Glawischnig, E.** (2006). CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol.* **141**: 1248-1254.
- Schüler, G. et al.** (2004). Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. *FEBS Lett.* **563**: 17-22.
- Schuler, M.A.** (1996). Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**: 235-284.
- Schulze, A., Zimmer, M., Mielke, S., Stellmach, H., Melnyk, C.W., Hause, B., et Gasperini, D.** (2019). Wound-Induced Shoot-to-Root Relocation of JA-Ile Precursors Coordinates *Arabidopsis* Growth. *Mol. Plant* **12**: 1383-1394.
- Schweizer, F., Fernandez-Calvo, P., Zander, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., Lewsey, M.G., Ecker, J.R., Solano, R., et Reymond, P.** (2013). *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* **25**: 3117-3132.
- Sembdner, G., Atzorn, R., et Schneider, G.** (1994). Plant hormone conjugation. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1459-1481.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-W., Hwang, I., Lee, J.S., et Choi, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 4788-4793.
- Shan, X., Wang, J., Chua, L., Jiang, D., Peng, W., et Xie, D.** (2011). The role of *Arabidopsis* Rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence. *Plant Physiol.* **155**: 751-764.
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., et Xie, D.** (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **60**: 3849-3860.
- Sharma, S. et Verslues, P.E.** (2010). Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant, Cell Environ.* **33**: 1838-1851.
- Sheard, L.B. et al.** (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400-407.
- Shi, Y., An, L., Li, X., Huang, C., et Chen, G.** (2011). The octadecanoid signaling pathway participates in the chilling-induced transcription of ω -3 fatty acid desaturases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **49**: 208-215.
- Shim, J.S., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y.-W., Choi, Y., Lee, J.S., Song, J.T., Kim, J.-K., et Choi, Y. Do** (2013). *AtMYB44* regulates *WRKY70* expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Plant J.* **73**: 483-495.
- Shin, J.-S., Noh, Y.-S., Lee, Y.S., Cho, Y.-W., Baek, N.-I., Choi, M.-S., Jeong, T.-S., Kang, E., Chung, H.-G., et Lee, K.-T.** (2011). Arvelexin from *Brassica rapa* suppresses NF- κ B-regulated pro-inflammatory gene expression by inhibiting activation of I κ B kinase. *Br. J. Pharmacol.* **164**: 145-158.
- Shin, J., Heidrich, K., Sanchez-Villarreal, A., Parker, J.E., et Davis, S.J.** (2012). TIME FOR COFFEE represses accumulation of the MYC2 transcription factor to provide time-of-day regulation of

- jasmonate signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 2470-2482.
- Shinozaki, K. et Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* **58**: 221-227.
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C.L., Cooke, T.F., Sheard, L.B., Moreno, J.E., Katsir, L., Zheng, N., Browse, J., et Howe, G.A.** (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 536-550.
- Singh, U.B., Malviya, D., Singh, S., Kumar, M., Sahu, P.K., Singh, H. V., Kumar, S., Roy, M., Imran, M., Rai, J.P., Sharma, A.K., et Saxena, A.K.** (2019). Trichoderma harzianum-and methyl jasmonate-induced resistance to bipolaris sorokiniana through enhanced phenylpropanoid activities in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Microbiol.* **10**.
- Sirhindi, G., Mushtaq, R., Gill, S.S., Kaushik, S., Dogra, N., et Physiology, S.** (2018). Effect of jasmonates on osmo-protectants in Brassica oleracea L. var. italica, capitata and botrytis. *J. Environ. bio-sciences* **32**: 305-308.
- Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., et Szarejko, I.** (2016). The role and regulation of ABI5 (ABA-insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Smirnova, E., Marquis, V., Poirier, L., Aubert, Y., Zumsteg, J., Ménard, R., Miesch, L., et Heitz, T.** (2017). Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against Botrytis cinerea Infection. *Mol. Plant* **10**: 1159-1173.
- Sobhy, I.S., Woodcock, C.M., Powers, S.J., Caulfield, J.C., Pickett, J.A., et Birkett, M.A.** (2017). cis-Jasmone elicits aphid-induced stress signalling in potatoes. *J. Chem. Ecol.* **43**: 39-52.
- Song, S., Huang, H., Gao, H., Wang, J., Wu, D., Liu, X., Yang, S., Zhai, Q., Li, C., Qi, T., et Xie, D.** (2014). Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 263-279.
- Song, S., Qi, T., Fan, M., Zhang, X., Gao, H., Huang, H., Wu, D., Guo, H., et Xie, D.** (2013a). The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development. *PLoS Genet.* **9**: e1003653.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., et Xie, D.** (2013b). Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin, and gibberellin in Arabidopsis. *Mol. Plant* **6**: 1065-1073.
- Sperdoui, I. et Moustakas, M.** (2012). Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of Arabidopsis thaliana to drought stress. *J. Plant Physiol.* **169**: 577-585.
- Srivastava, A.K., Orosa, B., Singh, P., Cummins, I., Walsh, C., Zhang, C., Grant, M., Roberts, M.R., Anand, G.S., Fitches, E., et Sadanandom, A.** (2018). SUMO suppresses the activity of the jasmonic acid receptor CORONATINE INSENSITIVE1. *Plant Cell* **30**: 2099-2115.
- Staswick, P.E. et Tiryaki, I.** (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2117-2127.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., et Rowe, M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-15.
- Stelmach, B.A., Müller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M., et Weiler, E.W.** (2001). A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* **276**: 12832-12838.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., et Wasternack, C.** (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* **51**: 895-911.
- Stenzel, I., Hause, B., Proels, R., Miersch, O., Oka, M., Roitsch, T., et Wasternack, C.** (2008). The AOC promoter of tomato is regulated by developmental and environmental stimuli. *Phytochemistry* **69**: 1859-1869.
- Stenzel, I., Otto, M., Delker, C., Kirmse, N., Schmidt, D., Miersch, O., Hause, B., et Wasternack, C.** (2012). ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of methylation and chromatin patterning Arabidopsis thaliana: tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization. *J. Exp. Bot.* **63**: 6125-6138.

- Steppuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R., et Baldwin, I.T.** (2004). Nicotine's defensive function in nature. *PLoS Biol.* **2**: e217.
- Stitz, M., Gase, K., Baldwin, I.T., et Gaquerel, E.** (2011). Ectopic expression of AtJMT in *Nicotiana attenuata*: creating a metabolic sink has tissue-specific consequences for the jasmonate metabolic network and silences downstream gene expression. *Plant Physiol.* **157**: 341-354.
- Stuhlfelder, C., Mueller, M.J., et Warzecha, H.** (2004). Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *Eur. J. Biochem.* **271**: 2976-2983.
- Stumpe, M. et Feussner, I.** (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem. Rev.* **5**: 347-357.
- Stumpe, M., Göbel, C., Demchenko, K., Hoffmann, M., Klösigen, R.B., Pawlowski, K., et Feussner, I.** (2006). Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of α -ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *Plant J.* **47**: 883-896.
- Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M., et Vavasseur, A.** (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol.* **134**: 1536-1545.
- Suza, W.P. et Staswick, P.E.** (2008). The role of JAR1 in jasmonoyl-I-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta* **227**: 1221-1232.
- Szabados, L. et Savouré, A.** (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**: 89-97.
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K.** (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 805-818.
- Takaoka, Y., Iwahashi, M., Chini, A., Saito, H., Ishimaru, Y., Egoshi, S., Kato, N., Tanaka, M., Bashir, K., Seki, M., Solano, R., et Ueda, M.** (2018). A rationally designed JAZ subtype-selective agonist of jasmonate perception. *Nat. Commun.* **9**: 3654.
- Takaoka, Y., Nagumo, K., Azizah, I.N., Oura, S., Iwahashi, M., Kato, N., et Ueda, M.** (2019). A comprehensive in vitro fluorescence anisotropy assay system for screening ligands of the jasmonate COI1-JAZ co-receptor in plants. *J. Biol. Chem.* **294**: 5074-5081.
- Taki, N. et al.** (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**: 1268-1283.
- Tamogami, S., Rakwal, R., et Agrawal, G.K.** (2008). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**: 723-727.
- Tang, J., Yang, D., Wu, J., Chen, S., et Wang, L.** (2020). Silencing JA hydroxylases in *Nicotiana attenuata* enhances jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Spodoptera litura*. *Plant Divers.* **42**: 111-119.
- Theodoulou, F.L., Job, K., Scolombe, S., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T., et Graham, I.A.** (2005). Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-Binding Cassette transporter mutants. implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol.* **137**: 835-840.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., et Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665.
- Thireault, C., Shyu, C., Yoshida, Y., St. Aubin, B., Campos, M.L., et Howe, G.A.** (2015). Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in *Arabidopsis*. *Plant J.* **82**: 669-679.
- Thiruvengadam, M., Baskar, V., Kim, S.H., et Chung, I.M.** (2016). Effects of abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid on the content of phytochemicals and their gene expression profiles and biological activity in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). *Plant Growth Regul.* **80**: 377-390.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T., et Mueller, M.J.** (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* **34**: 363-375.
- Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., et Thevissen, K.** (2002). Plant defensins. *Planta* **216**: 193-202.

- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., et Broekaert, W.F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 15107-15111.
- Thorpe, M.R., Ferrieri, A.P., Herth, M.M., et Ferrieri, R.A.** (2007). ¹¹C-imaging: Methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta* **226**: 541-551.
- Tijet, N., Schneider, C., Muller, B.L., et Brash, A.R.** (2001). Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **386**: 281-289.
- Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B., et Turlings, T.C.J.** (2006). Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J.* **49**: 16-26.
- Torrens-Spence, M.P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C.M., Pluskal, T., Shen, A., et Weng, J.K.** (2019). PBS3 and EPS1 Complete Salicylic Acid Biosynthesis from Isochorismate in Arabidopsis. *Mol. Plant* **12**: 1577-1586.
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A.J., Howe, G.A., et Gilroy, S.** (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* (80-). **361**: 1112-1115.
- Turnbull, C.G.N., Booker, J.P., et Leyser, H.M.O.** (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in Arabidopsis. *Plant J.* **32**: 255-262.
- Ueda, M., Kaji, T., et Kozaki, W.** (2020). Recent advances in plant chemical biology of jasmonates. *Int. J. Mol. Sci.* **21**.
- Urano, K., Maruyama, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K.** (2017). Analysis of plant hormone profiles in response to moderate dehydration stress. *Plant J.* **90**: 17-36.
- Varsani, S., Grover, S., Zhou, S., Koch, K.G., Huang, P.C., Kolomiets, M. V., Williams, W.P., Heng-Moss, T., Sarath, G., Luthe, D.S., Jander, G., et Louisa, J.** (2019). 12-oxo-phytodienoic acid acts as a regulator of maize defense against corn leaf aphid. *Plant Physiol.* **179**: 1402-1415.
- Verma, D., Jalmi, S.K., Bhagat, P.K., Verma, N., et Sinha, A.K.** (2020). A bHLH transcription factor, MYC2, imparts salt intolerance by regulating proline biosynthesis in Arabidopsis. *FEBS J.* **287**: 2560-2576.
- Verpoorte, R., Choi, Y.H., Mustafa, N.R., et Kim, H.K.** (2008). Metabolomics: Back to basics. *Phytochem. Rev.* **7**: 525-537.
- Vick, B.A. et Zimmerman, D.C.** (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**: 470-477.
- Villette, C., Zumsteg, J., Schaller, H., et Heintz, D.** (2018). Non-targeted metabolic profiling of BW312 *Hordeum vulgare* semi dwarf mutant using UHPLC coupled to QTOF high resolution mass spectrometry. *Sci. Rep.* **8**: 1-9.
- Vos, I.A., Verhage, A., Schuurink, R.C., Watt, L.G., Pieterse, C.M.J., et Van Wees, S.C.M.** (2013). Onset of herbivore-induced resistance in systemic tissue primed for jasmonate-dependent defenses is activated by abscisic acid. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Vos, I.A., Verhage, A., Watt, L.G., Vlaardingerbroek, I., Schuurink, R.C., Pieterse, C.M., et Wees, S.C. Van** (2019). Abscisic acid is essential for rewiring of jasmonic acid-dependent defenses during herbivory. *bioRxiv*.
- De Vos, M. et Jander, G.** (2009). *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in Arabidopsis thaliana. *Plant. Cell Environ.* **32**: 1548-1560.
- Wagner, A.E. et Rimbach, G.** (2009). Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clin. Dermatol.* **27**: 217-224.
- Wang, J., Wu, D., Wang, Y., et Xie, D.** (2019). Jasmonate action in plant defense against insects. *J. Exp. Bot.* **70**: 3391-3400.
- Wang, K., Guo, Q., Froehlich, J.E., Hersh, H.L., Zienkiewicz, A., Howe, G.A., et Benning, C.** (2018). Two abscisic acid-Responsive plastid lipase genes involved in jasmonic acid biosynthesis in

- Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **30**: 1006-1022.
- Wasternack, C.** (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development — Applied aspects. *Biotechnol. Adv.* **32**: 31-39.
- Wasternack, C.** (2015). How Jasmonates Earned their Laurels: Past and Present. *J. Plant Growth Regul.* **34**: 761-794.
- Wasternack, C. et Feussner, I.** (2017). The oxylipin pathways: biochemistry and function. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 363-386.
- Wasternack, C. et Hause, B.** (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* **111**: 1021-1058.
- Wasternack, C. et Kombrink, E.** (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *Am. Chem. Soc.* **5**: 63-77.
- Wasternack, C. et Song, S.** (2017). Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J. Exp. Bot.* **68**: 1303-1321.
- Wasternack, C. et Strnad, M.** (2016). Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *N. Biotechnol.* **33**: 604-613.
- Wasternack, C. et Strnad, M.** (2018). Jasmonates: News on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 2539.
- Wasternack, C. et Strnad, M.** (2019). Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites — Pathways, transcription factors and applied aspects — A brief review. *N. Biotechnol.* **48**: 1-11.
- Weber, H., Vick, B.A., et Farmer, E.E.** (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 10473-10478.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K., et Schmölling, T.** (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol.* **8**: 371-381.
- Westfall, C.S., Zubieta, C., Herrmann, J., Kapp, U., Nanao, M.H., et Jez, J.M.** (2012). Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by GH3 proteins. *Science* (80-.). **336**: 1708-1711.
- Widemann, E., Grausem, B., Renault, H., Pineau, E., Heinrich, C., Lugan, R., Ullmann, P., Miesch, L., Aubert, Y., Miesch, M., Heitz, T., et Pinot, F.** (2015). Sequential oxidation of Jasmonoyl-Phenylalanine and Jasmonoyl-Isoleucine by multiple cytochrome P450 of the CYP94 family through newly identified aldehyde intermediates. *Phytochemistry* **117**: 388-399.
- Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., Miesch, M., Pinot, F., et Heitz, T.** (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. *J. Biol. Chem.* **288**: 31701-31714.
- Widemann, E., Smirnova, E., Aubert, Y., Miesch, L., et Heitz, T.** (2016). Dynamics of jasmonate metabolism upon flowering and across leaf stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* **5**: 539-547.
- Windram, O. et al.** (2012). *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell* **24**: 3530-3557.
- Woldemariam, M.G., Onkokesung, N., Baldwin, I.T., et Galis, I.** (2012). Jasmonoyl-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *Plant J.* **72**: 758-767.
- Xie, D., Feys, B.F., James, S., Nieto-rostro, M., et Turner, J.G.** (1998). COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* (80-.). **280**: 1091-1095.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., et Xie, D.** (2002). The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 1919-1935.
- Xu, Q., Truong, T.T., Barrero, J.M., Jacobsen, J. V., Hocart, C.H., et Gubler, F.** (2016). A role for jasmonates in the release of dormancy by cold stratification in wheat. *J. Exp. Bot.* **67**: 3497-3508.
- Yan, C., Fan, M., Yang, M., Zhao, J., Zhang, W., Su, Y., Xiao, L., Deng, H., et Xie, D.** (2018a). Injury activates Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis. *Mol. Cell* **70**: 136-149.

- Yan, J., Li, H., Li, S., Yao, R., Deng, H., Xie, Q., et Xie, D.** (2013). The Arabidopsis F-box protein CORONATINE INSENSITIVE1 is stabilized by SCFCO1 and degraded via the 26S proteasome pathway. *Plant Cell* **25**: 486-498.
- Yan, J., Li, S., Gu, M., Yao, R., Li, Y., Chen, J., Yang, M., Tong, J., Xiao, L., Nan, F., et Xie, D.** (2016). Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7-iso-JA-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* **172**: 2154-2164.
- Yan, J., Yao, R., Chen, L., Li, S., Gu, M., Nan, F., et Xie, D.** (2018b). Dynamic perception of jasmonates by the F-Box protein CO1. *Mol. Plant* **11**: 1237-1247.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., et Peng, W.** (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**: 2220-2236.
- Yan, Y., Christensen, S., Isakeit, T., Engelberth, J., Meeley, R., Hayward, A., Emery, R.J.N., et Kolomiets, M. V** (2012). Disruption of OPR7 and OPR8 reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense. *Plant Cell* **24**: 1420-1436.
- Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., et Farmer, E.E.** (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**: 2470-2483.
- Yang, D.H., Hettenhausen, C., Baldwin, I.T., et Wu, J.** (2012). Silencing *Nicotiana attenuata* calcium-dependent protein kinases, CDPK4 and CDPK5, strongly up-regulates wound- and herbivory-induced jasmonic acid accumulations. *Plant Physiol.* **159**: 1591-1607.
- Yang, W., Devaiah, S.P., Pan, X., Isaac, G., Welti, R., et Wang, X.** (2007). AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Biol. Chem.* **282**: 18116-18128.
- Ye, H. et al.** (2017). RD26 mediates crosstalk between drought and brassinosteroid signalling pathways. *Nat. Commun.* **8**: 1-13.
- Yoshida, Y., Nanjo, T., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K.** (1999). Stress-responsive and developmental regulation of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**: 766-772.
- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J., et Okada, K.** (2009). Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development* **125**: 1161-1171.
- Yoshihara, T., Omir, E.A., Koshino, H., Sakamura, S., Kkuta, Y., et Koda, Y.** (1989). Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2835-2837.
- Yuan, Z. et Zhang, D.** (2015). Roles of jasmonate signalling in plant inflorescence and flower development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 44-51.
- Zdyb, A., Demchenko, K., Heumann, J., Mrosk, C., Grzeganeck, P., Göbel, C., Feussner, I., Pawlowski, K., et Hause, B.** (2011). Jasmonate biosynthesis in legume and actinorhizal nodules. *New Phytol.* **189**: 568-579.
- Zhai, Q., Yan, L., Tan, D., Chen, R., Sun, J., Gao, L., Dong, M.-Q., Wang, Y., et Li, C.** (2013). Phosphorylation-coupled proteolysis of the transcription factor MYC2 is important for jasmonate-signaled plant immunity. *PLoS Genet.* **9**: e1003422.
- Zhang, F. et al.** (2015). Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. *Nature* **525**: 269-273.
- Zhang, J., Lin, J.E., Harris, C., Pereira, F.C.M., Wu, F., Blakeslee, J.J., et Peer, W.A.** (2016a). DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 11010-11015.
- Zhang, J. et Peer, W.A.** (2017). Auxin homeostasis: The DAO of catabolism. *J. Exp. Bot.* **68**: 3145-3154.
- Zhang, K., Halitschke, R., Yin, C., Liu, C.J., et Gan, S.S.** (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 14807-14812.
- Zhang, L. et Xing, D.** (2008). Methyl Jasmonate Induces Production of Reactive Oxygen Species and Alterations in Mitochondrial Dynamics that Precede Photosynthetic Dysfunction and Subsequent Cell Death. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1092-1111.

- Zhang, T., Poudel, A.N., Jewell, J.B., Kitaoka, N., Staswick, P., Matsuura, H., et Koo, A.J.** (2016b). Hormone crosstalk in wound stress response: Woundinducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **67**: 2107-2120.
- Zhang, W., Zhao, F., Jiang, L., Chen, C., Wu, L., et Liu, Z.** (2018). Different pathogen defense strategies in *Arabidopsis*: more than pathogen recognition. *Cells* **7**: 252.
- Zhang, Y., Liu, J., Chai, J., et Xing, D.** (2016c). Mitogen-activated protein kinase 6 mediates nuclear translocation of ORE3 to promote *ORE9* gene expression in methyl jasmonate-induced leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **67**: 83-94.
- Zhang, Y.J., Zhao, L., Zhao, J.Z., Li, Y.J., Wang, J. Bin, Guo, R., Gan, S.S., Liu, C.J., et Zhanga, K.W.** (2017). S5H/DMR6 encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiol.* **175**: 1082-1093.
- Zhou, N., Tootle, T.L., et Glazebrook, J.** (1999). *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* **11**: 2419-2428.
- Zhu, X. et Zhu, J.K.** (2013). Double repression in jasmonate-mediated plant defense. *Mol. Cell* **50**: 459-460.
- Zhu, Z. et al.** (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 12539-12544.
- Zhu, Z. et Tian, S.** (2012). Resistant responses of tomato fruit treated with exogenous methyl jasmonate to *Botrytis cinerea* infection. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **142**: 38-43.
- Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganai, M., et Wasternack, C.** (2000). Molecular cloning of allene oxide cyclase: The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J. Biol. Chem.* **275**: 19132-19138.

Valentin MARQUIS



L'homéostasie catabolique des jasmonates et son impact sur la signalisation des réponses aux stress chez *Arabidopsis thaliana*



Résumé Français

Pour se défendre contre les herbivores ou les microorganismes nécrotrophes les plantes supérieures utilisent les jasmonates (JAs), en particulier l'hormone jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), pour activer la signalisation défensive. Les JAs régulent aussi des réponses contre des stress abiotiques. Mes travaux de thèse ont prouvé l'importance d'une signalisation JAs basale, et sa répression par trois oxydases d'acide jasmonique nommées JAO, dont l'action définit un mécanisme de détournement métabolique inédit. En aval de l'action du JA-Ile, deux voies cataboliques distinctes sont activées pour atténuer la signalisation induite. A l'aide de nouvelles lignées de plantes bloquées, pour l'une, l'autre ou les deux voies, mes recherches ont démontré leurs rôles respectifs dans l'élimination du JA-Ile en réponse à l'herbivorie ou à l'infection. Elles ont révélé qu'un catabolisme ralenti du JA-Ile limite sélectivement le gain en défense lorsque des régulateurs négatifs de la signalisation sont surstimulés. Nos résultats apportent de nouvelles connaissances sur les mécanismes cataboliques des JAs régulant les signalisations basales et induites.

Mots clés : Jasmonates, catabolisme, signalisation basale, JAO, feedback, stress biotiques et abiotiques, résistance.

English summary

For defending against herbivores or necrotrophic microorganisms, higher plants rely on jasmonates (JAs), particularly on the hormone jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), to signal adaptive changes. JAs also modulate tolerance to abiotic stresses. My thesis work demonstrated the importance of basal JAs signalling, and its repression by three jasmonic acid oxidases called JAO, whose action defines a new metabolic diversion mechanism with regulatory properties. Using omics approaches, we defined the spectrum of responses activated in *jao2* mutants. Downstream of JA-Ile action, two distinct catabolic pathways of JA-Ile are activated to attenuate induced signalling. Owing to the generation of new higher order mutant plant lines impaired in one, the other, or both pathways, my research demonstrated their respective roles in JA-Ile elimination in response to herbivory and infection. It particularly revealed that restrained JA-Ile catabolism results in increased defense only when negative regulators are not overstimulated. Our results provide new knowledge of JAs catabolic mechanisms regulating basal and induced signalling.

Keywords: Jasmonates, catabolism, basal signalisation, JAO, feedback, biotic and abiotic stress, resistance.