



HAL
open science

Étude de la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, un apport à la compréhension de l'évolution des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes

Samuel Knosp

► To cite this version:

Samuel Knosp. Étude de la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, un apport à la compréhension de l'évolution des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ006 . tel-04588155

HAL Id: tel-04588155

<https://theses.hal.science/tel-04588155>

Submitted on 26 May 2024

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 (ED414)

Institut de biologie moléculaire des plantes, UPR2357 CNRS

THÈSE présentée par :

Samuel KNOSP

soutenue le : 25 février 2022

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

Discipline / Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Étude de la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes,
une contribution à la compréhension de l'évolution des
polymères apoplastiques hydrophobes des plantes**

THÈSE dirigée par :

M. RENAULT Hugues

Chargé de Recherche, IBMP UPR2357, CNRS Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme INGRAM Gwyneth

Directrice de Recherche, RDP CNRS UMR5667, ENS de Lyon

M. DOMERGUE Frédéric

Chargé de Recherche, LBM UMR5200, CNRS Bordeaux

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. SCHALLER Hubert

Directeur de Recherche, IBMP UPR2357, CNRS Strasbourg

Mme BAKAN Bénédicte

Directrice de Recherche, BIA UR1268, INRAe Nantes

Remerciements

Le travail présenté ici est le fruit de l'interaction et de la collaboration de nombreuses personnes, pour leurs qualités et leur savoir-faire. Ce travail s'est accompagné d'enseignements et d'apprentissages riches, qui m'ont permis d'acquérir et transmettre des connaissances et des compétences. Je souhaite pour ces raisons remercier celles et ceux qui m'ont accompagné et aidé au cours de mon doctorat.

Je tiens tout d'abord à remercier Hugues Renault, pour avoir encadré ces trois années et demie de thèse. Son encadrement a été très riche, rigoureux et bienveillant. Hugues a toujours été disponible et patient pour m'apprendre beaucoup de choses, apporter ses idées et son expérience, sans hésiter à aller vers des domaines inconnus et en veillant à créer des conditions de travail épanouissantes. J'ai ainsi eu la chance de travailler dans un environnement scientifiquement riche, propice à être créatif et à entreprendre de multiples projets. Je suis très reconnaissant pour cet encadrement et cet environnement d'une grande qualité, qui m'ont permis de beaucoup apprendre et progresser. Merci !

Je remercie les membres de l'équipe « Evolution et diversité du métabolisme des plantes » de l'IBMP, dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, pour notre entraide au laboratoire. Je souhaite notamment remercier Ludivine Malherbe qui a apporté un soutien technique précieux et considérable à ces travaux. Merci beaucoup pour cette aide, cette implication et pour avoir travaillé ensemble dans une atmosphère agréable. Je remercie Florence Bernardeau que j'ai eu l'opportunité d'encadrer lors de son stage de master au laboratoire et dont le travail figure dans ce manuscrit. Merci pour cette expérience nouvelle et enrichissante pour moi, d'encadrement, d'enseignement et de collaboration, et pour la contribution à ce projet. Merci également à Kanade Tatsumi et David Elser qui m'ont fréquemment aidé au quotidien par leurs compétences et leur gentillesse.

Je souhaite remercier les collaborateurs externes à l'IBMP avec qui il a été possible de travailler à distance, pour avoir apporté leur réflexion et leur expertise, et pour avoir rendu possible une grande partie de mes travaux. Merci à Bénédicte Bakan de l'INRAe de Nantes, pour nos échanges scientifiques réguliers, pour nous avoir souvent conseillé et aidé, et pour le partage de ressources précieuses. Merci d'avoir contribué à ces projets et de pouvoir travailler ensemble ainsi. Je remercie aussi Jocelyn K.C. Rose de l'université de Cornell aux Etats-Unis, qui a également apporté son expertise et nous a partagé des ressources uniques à plusieurs reprises, qui ont permis d'approfondir nos recherches.

Je remercie Marie Barberon de l'université de Genève et Grégory Mouille de l'INRAe de Versailles, d'avoir accepté à deux reprises de constituer le jury de mon comité de suivi de thèse, et d'avoir à cette occasion apporté leur regard scientifique extérieur et pertinent sur l'évolution de mes travaux.

J'ai eu l'occasion et la chance d'interagir avec les nombreuses plateformes de l'IBMP, qui ont beaucoup contribué à la réalisation de ces travaux, et que je souhaite remercier pour leur investissement, leur disponibilité et leurs compétences. Je remercie grandement Malek Alioua et Sandrine Koechler, de la plateforme d'analyse de l'expression génique, que j'ai beaucoup sollicités pour mes travaux de génotypage. Je remercie les membres de la plateforme d'imagerie et de spectrométrie de masse, Claire Villette, Julie Zumsteg et Dimitri Heintz, de m'avoir formé sur l'utilisation de ces technologies intéressantes et d'avoir réalisé certaines expérimentations. Je remercie Mathieu Erhardt et Jérôme Mutterer, de la plateforme de microscopie et d'imagerie cellulaire, pour la réalisation des analyses en microscopie électronique et l'accompagnement sur l'utilisation des microscopes optiques. Je remercie aussi Nicolas Baumberger et Laurence Herrgott, de la plateforme de production et de purification des protéines, avec qui j'ai eu plaisir à collaborer pour la production complexe de protéines, et qui m'ont aussi accompagné dans la réalisation de ces expérimentations. Toute l'aide apportée par ces personnes n'est pas retranscrite dans les travaux présentés ici : certains projets se sont avérés plus compliqués ou moins concluants que prévus, d'autres sont encore en cours, et j'espère qu'ils pourront être prolongés. Je tiens donc à souligner la contribution et le soutien des membres des plateformes, et les remercier pour leur travail et leur implication.

Merci enfin à Claire pour sa relecture fine et son soutien !

Table des matières

Introduction générale	1
La colonisation des terres par les plantes : origines et conséquences	3
Contraintes et adaptations liées à la terrestrialisation.....	6
Les polymères apoplastiques hydrophobes des plantes : fonctions et composition	11
La subérine.....	11
La lignine	13
La sporopollénine	17
La cutine.....	18
Objectifs de la thèse.....	24
Chapitre 1 : Rôle de la voie des phénylpropanoïdes dans la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes.....	29
Voie des phénylpropanoïdes et polymères apoplastiques.....	31
La voie des phénylpropanoïdes.....	31
Origine et implication dans les polymères apoplastiques hydrophobes	34
Étude de la famille CYP73 chez les bryophytes	36
Introduction.....	36
Résultats	38
La famille CYP73 forme un clade monophylétique chez les embryophytes	38
Les protéines PpCYP73A48 et PpCYP73A49 ont une activité C4H	39
La conservation de l'activité C4H des CYP73 repose sur la conservation d'un résidu arginine essentiel.....	41
PpCYP73A48 et PpCYP73A49 sont exprimées dans le protonema et les gamétophores	41
L'activité CYP73/C4H est nécessaire au développement correct de <i>P. patens</i>	43
L'activité CYP73/C4H est indispensable à la production de phénylpropanoïdes et à la synthèse de cutine chez <i>P. patens</i>	45
L'altération de l'activité CYP73/C4H perturbe également le développement, le métabolisme phénolique et les propriétés de la cuticule chez <i>M. polymorpha</i>	47
L'activité CYP73/C4H est cruciale dans le développement des bryophytes	51
L'activité CYP73/C4H est conservée au sein des embryophytes.....	51
Discussion	52
Les fonctions biochimiques de la famille CYP73 sont conservées chez les embryophytes	52
Les fonctions physiologiques de la famille CYP73 sont conservées chez les embryophytes.....	53
L'émergence de la famille CYP73 a contribué à l'adaptation des plantes aux milieux terrestres	55
Conclusions et perspectives	56
Matériels et méthodes	57
Analyses phylogénétiques	57

Modélisation des protéines et docking du substrat	57
Expression recombinante en levure.....	58
Mutagenèse dirigée.....	58
Activités enzymatiques.....	58
Génération des lignées transgéniques.....	59
Coloration GUS	59
Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR.....	59
Analyse des molécules solubles	60
Préparation des échantillons	60
Chromatographie HPLC-PDA	60
Chromatographie UHPLC-MS/MS.....	61
Analyse de la composition de la cutine.....	61
Traitement à l'acide pipéronylique	61
Trans-complémentation du mutant <i>Atcyp73a5</i>	61
Function of the HYDROXYCINNAMOYL-CoA:SHIKIMATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE is evolutionarily conserved in embryophytes	63
Abstract.....	64
Introduction.....	65
Results.....	66
<i>A bona fide</i> HCT gene emerged in an embryophyte progenitor and was subsequently conserved	66
PpHCT is co-expressed with the <i>p</i> -coumaroyl ester 3'-hydroxylase PpCYP98.....	67
PpHCT demonstrates substrate permissiveness <i>in vitro</i>	67
PpHCT kinetic parameters largely favor shikimate acylation	68
Reconstitution of the moss phenolic pathway in yeast.....	69
PpHCT efficiently converts caffeoyl-5-O-shikimate into caffeoyl-CoA <i>in vitro</i>	69
PpHCT produces <i>p</i> -coumaroyl-shikimate <i>in planta</i> as a precursor of caffeate derivatives.....	70
<i>PpHCT</i> deficiency impairs cuticle development.....	71
Conservation of HCT properties between bryophytes and angiosperms	72
Discussion	73
Materials and methods	75
Phylogenetic analysis.....	75
Homology modeling of proteins.....	75
Plant growth conditions	75
Determination of gene expression by RT-qPCR.....	76
GUS staining.....	76
<i>In vitro</i> enzyme assays.....	76
Yeast metabolic engineering.....	77
Generation of <i>P. patens</i> transgenic lines	77
Molecular characterization of <i>P. patens</i> transgenic lines.....	77
Determination of HCT activity in <i>P. patens</i> protein extracts	78
Plant tissue collection and metabolite extraction	78

HPLC–UV chromatography.....	78
Targeted metabolic profiling by UHPLC–MS/MS.....	78
Cuticular biopolymer compositional analysis	79
Permeability assay	79
Production and complementation of an <i>Arabidopsis hct</i> null mutant.....	79
Replication and statistical analyses.....	79
References	80
L'enzyme PpFHT connecte la voie des phénylpropanoïdes et le métabolisme lipidique dans la biosynthèse de la cutine	84
Introduction.....	84
Résultats	87
Un clade de BAHD de classe V a une origine commune chez les embryophytes	87
Le mutant <i>Ppfht</i> est affecté dans la biosynthèse de cutine	89
PpFHT a une activité HHT	89
PpFHT catalyse la formation du caféoyl-hydroxypalmitate, un intermédiaire de la cutine de <i>P. patens</i>	94
Discussion	94
Le clade FHT a une origine commune et une fonction conservée chez les embryophytes.....	94
PpFHT connecte le métabolisme phénolique et lipidique dans la biosynthèse de la cutine	95
L'activité PpFHT conditionne l'incorporation des monomères aliphatiques de la cutine	96
Le mutant <i>fht</i> suggère un rôle séquentiel de l'assemblage des monomères phénoliques et aliphatiques	97
La fonction conservée du clade FHT suggère une origine commune entre cutine et subérine	99
Conclusions et perspectives.....	100
Matériels et méthodes.....	101
Génération et caractérisation des lignées génétiquement modifiées.....	101
Activités enzymatiques de PpFHT et identification des produits par UHPLC-MS/MS	102
Chapitre 2 : Polymérisation de la cutine chez les bryophytes	103
Biosynthèse de la cutine et polymérisation des polymères apoplastiques	105
Biosynthèse et polymérisation de la cutine.....	105
Biosynthèse des monomères aliphatiques	105
Transport des précurseurs	106
Polymérisation de la cutine.....	107
Les cutine synthases	107
Autres mécanismes de polymérisation de la cutine	109
Polymérisation des autres polymères apoplastiques.....	111
Polymérisation de la subérine.....	111
Polymérisation de la lignine	111
Polymérisation de la sporopollénine.....	113

Étude de la famille CUS chez <i>P. patens</i>	115
Introduction.....	115
Résultats	117
PpCUS1 et PpCUS2 sont deux membres d'une famille unique de GDSLs.....	117
PpCUS1 et PpCUS2 ont les caractéristiques de protéines CUS	117
PpCUS1 et PpCUS2 ont un rôle redondant dans la synthèse de cutine.....	119
Le 2-MHG s'accumule dans le mutant <i>cus1/cus2</i>	124
PpCUS1 métabolise le 2-MHG.....	126
SICD1 ne complète pas le mutant <i>cus1/cus2</i>	128
Discussion	128
La famille CUS participe à la biosynthèse de la cutine de <i>P. patens</i>	128
L'activité et la fonction de la famille CUS sont partiellement conservées chez les embryophytes.....	130
D'autres mécanismes de polymérisation de la cutine existent chez <i>P. patens</i>	131
Conclusion et perspectives	132
Matériels et méthodes.....	133
Analyse phylogénétique	133
Analyse des séquences protéiques	133
Génération des lignées génétiquement modifiées.....	133
Analyse de la cutine et de la cuticule	135
Analyses métaboliques.....	135
Activité enzymatique de PpCUS1	135
Étude d'une voie peroxydase dans la biosynthèse de la cutine de <i>P. patens</i>	139
Introduction.....	139
Résultats	141
Un cluster de gènes contenant des peroxydases est co-exprimé avec <i>PpFHT</i>	141
Les ROS jouent un rôle dans le développement des bryophytes.....	144
La déficience de <i>PRX1/2/3</i> inhibe le développement de <i>P. patens</i> dans un fond génétique <i>cus1/cus2</i>	146
La synthèse de cutine est plus affectée dans les mutants <i>cus/prx</i> que dans le mutant <i>cus1/cus2</i>	151
Discussion	154
Une activité peroxydase est nécessaire à la synthèse de la cutine de <i>P. patens</i>	154
Une concomitance de la terrestrialisation, du stress oxydatif et des barrières apoplastiques.....	156
Vers une origine commune de la voie Schengen.....	157
...et de la polymérisation des polymères apoplastiques ?.....	160
Conclusions et perspectives	161
Matériels et méthodes.....	162
Analyse phylogénétique	162
Traitement au iodure de potassium.....	163
Génération des lignées génétiquement modifiées.....	163
Analyse de la cutine et de la cuticule	163

Analyses métaboliques.....	164
Discussion générale	165
L'étude des bryophytes est pertinente pour comprendre l'apparition et l'évolution des barrières apoplastiques.....	167
Des adaptations successives peuvent être à l'origine de la cuticule	169
Les polymères apoplastiques hydrophobes partagent une origine commune	171
Conclusions et perspectives.....	172
Protocoles et méthodologies générales	177
Conditions de culture des plantes	178
Clonage et production des plasmides.....	178
Amplification par PCR.....	178
Clonage Gateway®	179
Clonage Gibson.....	179
Clonage Golden Gate.....	180
Transformations bactériennes et purification des plasmides	180
Génération des lignées génétiquement modifiées	181
Production des plasmides de transformation.....	181
Transformation de <i>P. patens</i>	181
Transformation de <i>M. polymorpha</i>	183
Caractérisation des lignées génétiquement modifiées	183
Extraction et purification d'ADN génomique.....	183
Génotypage par PCR et séquençage	184
Analyse de la composition de la cutine.....	184
Culture et récolte du matériel végétal.....	184
Délipidation du matériel et dépolymérisation de la cutine.....	185
Analyse en GC-TOFMS.....	186
Analyses métaboliques.....	187
Extraction des molécules solubles	187
Analyse en UHPLC-MS/MS	187
Coloration au bleu de toluidine	188
Microscopie électronique	188
Analyses statistiques et création des figures.....	189
Références.....	191
Annexes.....	211
Annexe 1 : Phénotypes des lignées knock-out et knock-in	212
Annexe 2 : Caractérisation moléculaire des lignées KO CRISPR/Cas9.....	222
Annexe 3 : Production des mutants <i>Ppcyp73</i> par recombinaison homologue.....	225
Annexe 4 : Listes des oligonucléotides utilisés	226
Annexe 5 : Co-expression des gènes étudiés.....	229
Annexe 6 : Listes des milieux et solutions utilisés	241
Annexe 7 : Facteurs de réponse des monomères de cutine en GC-TOFMS	242
Annexe 8 : Transitions MRM utilisées en UHPLC-MS/MS	243
Annexe 9 : Résultats des analyses statistiques	244

Liste des figures

Figure 1 : Lignée verte et colonisation des terres par les plantes.....	2
Figure 2 : Evolution des teneurs en CO ₂ et O ₂ dans l'atmosphère au cours du Phanérozoïque.	4
Figure 3 : Évolution croisée de la lignée verte et des polymères apoplastiques hydrophobes.	8
Figure 4 : Localisation, structure et composition de la subérine.	10
Figure 5 : Localisation, structure et composition de la lignine.....	14
Figure 6 : Localisation, structure et composition de la sporopolléine.	16
Figure 7 : Localisation, structure et composition de la cutine et de la cuticule.	19
Figure 8 : Phylogénie des Bryophyta.....	25
Figure 9 : Cycle de vie de la mousse <i>Physcomitrium patens</i>	25
Figure 10 : Etude du gène <i>CYP98</i> chez <i>P. patens</i>	26
Figure 11 : Voie des phénylpropanoïdes.....	30
Figure 12 : Histoire évolutive de la famille CYP73 chez les embryophytes.	37
Figure 13 : Profil d'expression et enzymologie des CYP73s de <i>P. patens</i>	40
Figure 14 : Investigation de la fonction biologique de <i>PpCYP73A48</i> et <i>PpCYP73A49</i>	42
Figure 15 : Profilage métabolique des mutants <i>Ppcyp73</i>	44
Figure 16 : Analyse fonctionnelle du gène <i>MpCYP73A1</i> chez <i>M. polymorpha</i>	48
Figure 17 : Conservation fonctionnelle de la famille CYP73 chez les embryophytes.....	50
Figure 17 : Conservation fonctionnelle de la famille CYP73 chez les embryophytes.....	50
Figure 18 : Exemples de BAHDs hydroxycinnamoyl-transférases utilisant des accepteurs lipidiques. .	85
Figure 19 : Histoire évolutive des BAHDs hydroxycinnamoyl-transférases.....	88
Figure 20 : Investigation de la fonction biologique de <i>PpFHT</i>	90
Figure 21 : Activités potentielles de <i>PpFHT</i>	92
Figure 22 : Identification des produits enzymatiques de <i>PpFHT</i>	93
Figure 23 : Voie de biosynthèse de la cutine.	104
Figure 24 : Histoire évolutive de la famille CUS.	116
Figure 25 : Profil d'expression et caractéristiques de <i>PpCUS1</i> et <i>PpCUS2</i>	118
Figure 26 : Investigation de la fonction biologique de <i>PpCUS1</i> et <i>PpCUS2</i>	120
Figure 27 : Analyse de la cutine et de la cuticule des mutants <i>Ppcus</i>	122
Figure 28 : Profil métabolique des mutants <i>Ppcus</i>	123
Figure 29 : Activité enzymatique des enzymes <i>PpCUSs</i>	125
Figure 30 : Trans-complémentation du mutant <i>Ppcus1/cus2</i> par <i>SICD1</i>	127
Figure 31 : Lignification du cadre de Caspary.	138

Figure 32 : Co-expression des gènes de biosynthèse de la cutine et d'une voie peroxydase potentielle chez <i>P. patens</i>	142
Figure 33 : Histoire évolutive des peroxydases associées à la lignification.....	143
Figure 34 : Rôle de l'H ₂ O ₂ dans le développement des bryophytes.	145
Figure 35 : Investigation de la fonction biologique de PpRBOH et de PpPRX1/2/3	149
Figure 36 : Analyse de la cutine, de la cuticule et profilage métabolique des mutants affectés dans la voie peroxydase.	152
Figure 37 : Contrôle de la biosynthèse de la cuticule de l'embryon par la voie Schengen/Gassho.	159
Figure 38 : Voie de biosynthèse de la cutine chez <i>P. patens</i>	166
Figure 39 : Émergence des adaptations aux contraintes de la vie hors de l'eau.	168
Figure 40 : Origine commune et évolution des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes.	173

Introduction générale

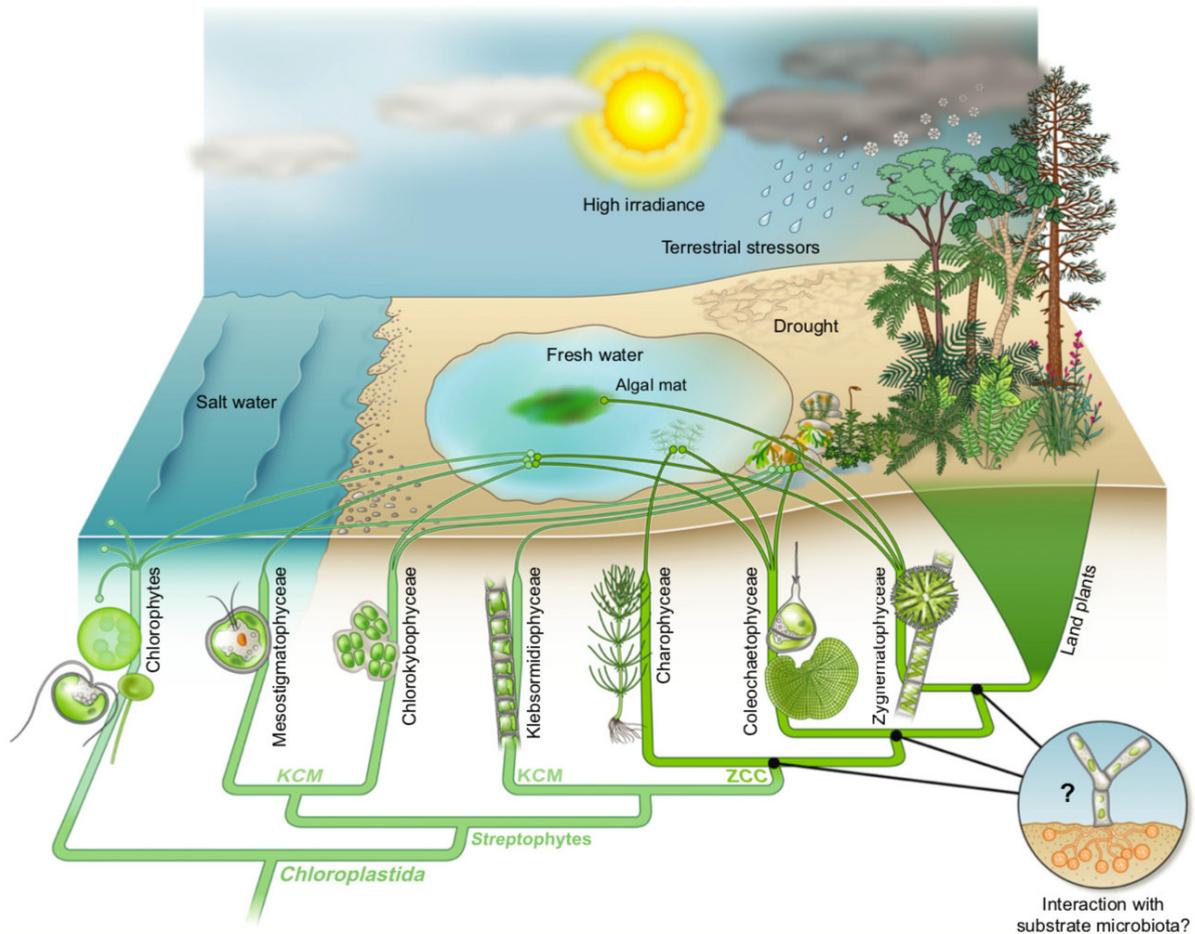


Figure 1 : Lignée verte et colonisation des terres par les plantes.

Il y a environ un milliard d'années, la lignée verte, ou *Chloroplastida*, s'est séparée en deux groupes : les chlorophytes et les streptophytes. Les espèces chlorophytes vivent principalement dans des milieux marins, et dans une moindre mesure en eau douce ou dans des milieux humides. Les streptophytes comprennent le groupe monophylétique des embryophytes (ou plantes terrestres), et le groupe paraphylétique des charophytes (ou algues streptophytes). Les espèces charophytes habitent en eau douce et dans des milieux terrestres où la présence d'eau est intermittente ; elles tolèrent donc, au moins provisoirement, des contraintes telles que la déshydratation ou les rayonnements UV intenses. Les embryophytes ont colonisé et dominent largement les écosystèmes terrestres, grâce à l'acquisition d'adaptations fondamentales aux nombreuses contraintes spécifiques des milieux terrestres : sécheresse, rayonnements lumineux et UV intenses, effets accrus de la gravité, bio-agresseurs, fluctuations importantes des températures. Ces adaptations, telle que la capacité à établir des interactions symbiotiques avec des champignons, ont émergé chez les ancêtres communs aux embryophytes et à certains clades charophytes. D'après de Vries et Archibald (2018).

La colonisation des terres par les plantes : origines et conséquences

Les plantes terrestres actuelles, ou embryophytes, prédominent largement dans les écosystèmes des terres émergées. Les 391 000 espèces vivantes d'embryophytes représentent à elles seules 82% de la biomasse terrestre (Enquist *et al.*, 2019 ; Bar-On *et al.*, 2018). Ce clade est apparu il y a environ 500 millions d'années (Ma), entre le Cambrien et l'Ordovicien, lors de la colonisation des terres par les plantes (Morris *et al.*, 2018). Cet événement, aussi appelé « terrestrialisation », a été décisif dans la suite de l'histoire de la vie et de la terre. La phylogénie de la lignée verte, ou *Chloroplastidia* (fig. 1), montre que le clade des *Zygnematophyceae* est le plus proche des embryophytes. Ce clade frère appartient au groupe polyphylétique des charophytes, également appelés « algues streptophytes ». Contrairement aux chlorophytes qui vivent principalement dans l'eau de mer, les espèces charophytes vivent dans l'eau douce et/ou dans des milieux humides où la présence d'eau est intermittente (fig. 1 ; de Vries et Archibald., 2018 ; Delwiche et Cooper, 2015 ; Bowman *et al.*, 2013). Ces données phylogénomiques et physiologiques suggèrent que la colonisation des terres s'est faite par des adaptations progressives aux milieux émergés et à leurs contraintes. Le séquençage et l'étude d'espèces charophytes, en plein essor actuellement, montrent que certains gènes et/ou caractères jusqu'alors considérés comme spécifiques aux embryophytes sont aussi présents chez les charophytes, repoussant leur origine (Wang *et al.*, 2020 ; Cheng *et al.*, 2019 ; Jiao *et al.*, 2019 ; Hori *et al.*, 2019). Il semble alors que les premières espèces qui ont colonisé les terres pouvaient être « pré-adaptées », mais que l'acquisition de caractères cruciaux à la vie sur terre chez les embryophytes ait provoqué leur succès évolutif. (Bowman *et al.*, 2013 ; de Vries *et al.*, 2017). En effet, s'il est probable que plusieurs événements de terrestrialisation se soient produits de manière indépendante, la radiation du clade embryophyte s'est produite à partir d'un ancêtre commun unique dont les descendants ont progressivement colonisé l'ensemble des habitats terrestres (Wickett *et al.*, 2014 ; Rensing, 2020).

La radiation des embryophytes a engendré de profonds changements géo-climatiques, qui ont à leur tour impacté l'évolution du vivant au fil des ères géologiques. Bien avant l'émergence des plantes sur terre, l'apparition de la photosynthèse chez les cyanobactéries il y a environ 2,6 milliards d'années a enrichi l'atmosphère en O₂ de 0,001% à 17% de son niveau actuel (Payne *et al.*, 2011 ; Bekker *et al.*, 2004 ; Lenton *et al.*, 2016), provoquant une extinction massive et l'apparition de la respiration chez les espèces qui survivaient à cette concentration en O₂ (Fischer *et al.*, 2016). Lors de la terrestrialisation, des cyanobactéries et d'autres micro-organismes peuplaient déjà les milieux terrestres, sans toutefois les modifier en profondeur

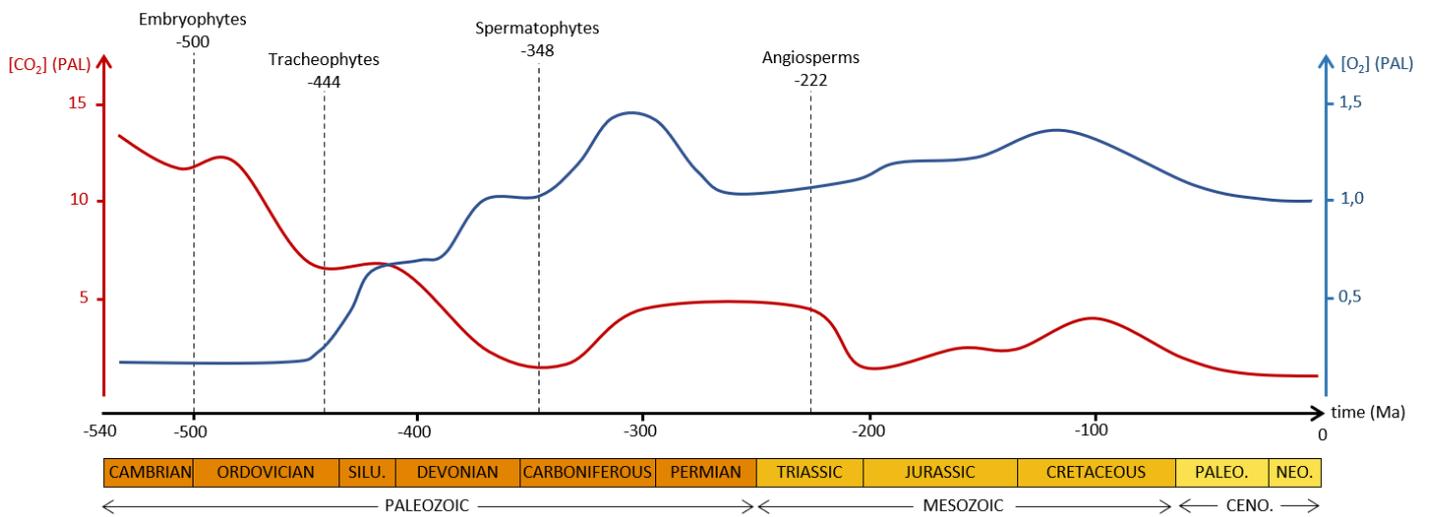


Figure 2 : Evolution des teneurs en CO₂ et O₂ dans l'atmosphère au cours du Phanérozoïque.

L'émergence des embryophytes, puis des trachéophytes, sur les milieux terrestres a engendré des changements majeurs et durables des concentrations en CO₂ et O₂ de l'atmosphère. Des changements moins importants et plus réversibles ont eu lieu à la fin du Paléozoïque et pendant le Mésozoïque. Ces concentrations se sont progressivement stabilisées aux niveaux actuels pendant le Cénozoïque. PAL : teneur atmosphérique par rapport au niveau actuel (« Present Atmospheric Level »). D'après Lenton *et al.* (2018) et Morris *et al.* (2018).

(Watanabe *et al.*, 2000). Les embryophytes ont en revanche interagi avec leur environnement jusqu'à l'impacter significativement. L'augmentation de l'activité photosynthétique globale par l'émergence de cette biomasse végétale terrestre a provoqué une nouvelle augmentation de la teneur en O₂ atmosphérique à partir d'il y a 450 Ma, jusqu'à environ 60% du niveau actuel (fig. 2 ; Lenton *et al.*, 2016). Les premières plantes terrestres ont également via leurs rhizoïdes – des filaments uni- ou pluricellulaires à gravitropisme positif qui ancrent les plantes à leur substrat et participent à l'absorption de l'eau et des minéraux, altéré physiquement et chimiquement les roches, notamment par la libération d'acides organiques (Porada *et al.*, 2016). L'érosion des roches et le dépôt de matière organique végétale ont alors progressivement formé les premiers sols. Une partie des minéraux libérés, principalement Ca²⁺ et Mg²⁺, ont ruisselé jusqu'aux océans où ils ont précipité avec le CO₂ dissout (HCO₃⁻) pour former les roches carbonatées (e.g. calcaire et magnésie). Le déplacement de l'équilibre entre CO₂ dissout et atmosphérique a provoqué une dissolution du CO₂ atmosphérique dans les océans, et une baisse du CO₂ atmosphérique (Kenrick *et al.*, 2012 ; Lenton, 2012). Ce phénomène et la captation du CO₂ par l'activité photosynthétique ont engendré une forte baisse de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère, qui a diminué environ de moitié entre le précambrien et la fin de l'Ordovicien (fig. 2 ; Lenton *et al.*, 2018). L'apparition il y a 444 Ma des plantes vasculaires, ou trachéophytes, qui possèdent un système racinaire plus performant et un système vasculaire leur permettant de croître davantage en hauteur, a augmenté ces effets. L'érosion plus massive des roches et l'augmentation de la biomasse végétale, et donc de l'activité photosynthétique, ont par les mêmes mécanismes augmenté à nouveau la teneur en O₂ et diminué la teneur en CO₂ de l'atmosphère, jusqu'à atteindre des niveaux proches d'aujourd'hui au début du Carbonifère (fig. 2 ; Morris *et al.*, 2015 et 2018 ; Lenton *et al.*, 2018). Ces modifications de la composition atmosphérique ont impacté l'évolution du climat : la diminution du CO₂ atmosphérique a engendré une diminution de la température moyenne, jusqu'à provoquer par exemple des périodes de glaciations à la fin de l'Ordovicien (Lenton, 2012). Si d'autres variations des teneurs en O₂ et CO₂ pendant la fin du Paléozoïque et le Mésozoïque ont eu lieu, provoquées par des périodes de forte activité volcanique et/ou de combustion de la matière organique enfouie dans les sols, ces modifications ont été davantage réversibles que celles, massives, provoquées par l'émergence et la colonisation des terres par les plantes (Lenton *et al.*, 2018 ; Kentick *et al.*, 2012).

Les changements géo-climatiques provoqués par la radiation des plantes terrestres ont à leur tour eu des implications dans l'évolution des autres grands groupes du vivant. La formation progressive des sols a modifié les paysages et la structure des cours d'eau, et a formé des

habitats propices à la diversification et l'expansion des animaux et des champignons (Porada *et al.*, 2016 ; Gibling et Davies, 2012 ; Lozano-Fernandez *et al.*, 2016 ; Selosse *et al.*, 2015). Les arthropodes ont ainsi colonisé les milieux terrestres il y a 424 Ma (Ward *et al.*, 2006) et l'herbivorie des insectes remonte à entre 385 et 420 Ma (Labandeira, 2013). Ces évènements ont conduit à une explosion de la biodiversité au début du Dévonien (Kentick *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en O₂ atmosphérique a permis le gigantisme des animaux, dont l'augmentation de la taille requiert une activité respiratoire plus importante et donc une demande accrue en O₂ (Vermeij, 2016 ; Dahl *et al.*, 2006).

L'émergence du clade embryophyte il y a 500 Ma a directement et indirectement entraîné des conséquences considérables et irréversibles sur l'évolution de la géologie, du climat et du vivant. L'histoire de la vie et de la terre telle qu'elle a eu lieu et telle que nous la connaissons depuis les derniers 500 Ma, a pris une direction contingente à la suite de cet évènement de terrestrialisation. D'un point de vue évolutif, cet évènement a requis de nombreuses adaptations physiologiques, anatomiques et biochimiques (Delwiche et Cooper, 2015 ; Rensing, 2020). Les espèces de la lignée verte, apparue il y a environ un milliard d'années, vivaient jusqu'alors en milieu aquatique (Del Cortana *et al.*, 2020). Les milieux terrestres ont en comparaison exposé les plantes à des contraintes inédites et spécifiques.

Contraintes et adaptations liées à la terrestrialisation

En comparaison au milieu aquatique, le milieu terrestre présente à première vue un avantage notable : la meilleure disponibilité en CO₂ et O₂ pour la photosynthèse, dont les concentrations sont nettement supérieures sous forme gazeuse dans l'air, que dissoutes dans l'eau. L'activité photosynthétique et la croissance des plantes peuvent ainsi être plus rapides sur terre. En revanche, une plus grande concentration intracellulaire en O₂ signifie une activité plus importante de la photorespiration et une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont la forte réactivité peut avoir des effets toxiques sur les cellules. Par ailleurs, le flux de photons est plus intense hors de l'eau, ce qui peut engendrer plus facilement des photodommages. Les rayonnements UV en grande partie filtrés par l'eau atteignent également davantage les tissus, provoquant là aussi des dommages via un stress oxydatif et/ou une interaction avec les macromolécules (Maberly, 2014). Il est d'ailleurs proposé que la terrestrialisation n'ait pu avoir lieu que lorsqu'une partie de l'O₂ formé lors de la grande oxygénation ait formé une couche d'ozone suffisante pour limiter les rayonnements UV (Cockell et Raven, 2007). Les premières plantes terrestres, et par extension l'ancêtre des

embryophytes, ont donc dû acquérir la capacité de tolérer à la fois un rayonnement UV et un stress oxydatif accru. Ces adaptations regroupent de nombreux mécanismes biochimiques et anatomiques pour refléter ou absorber une partie du rayonnement lumineux et/ou neutraliser les ROS dans des réactions enzymatiques (Delwiche et Cooper, 2015).

Une contrainte principale du milieu terrestre est son atmosphère asséchante et la limitation de la disponibilité en eau. Deux types d'adaptations physiologiques permettent de faire face à cette contrainte. Les plantes homoiohydriques sont ainsi capables de conserver leur teneur en eau en limitant l'évapotranspiration tout en maintenant les échanges gazeux nécessaires à la photosynthèse, mais ne tolèrent pas ou peu la déshydratation. Il s'agit d'un mécanisme actif de maintien de l'homéostasie hydrique. Les plantes poïkilohydriques voient leur contenu en eau s'équilibrer de manière passive avec l'environnement. Elles tolèrent une déshydratation importante et prolongée en état de repos, et l'activité métabolique reprend lorsque l'environnement devient à nouveau humide. Ces plantes possèdent donc des mécanismes biochimiques et cellulaires pour survivre à la déshydratation (Proctor et Tuba, 2002). Aujourd'hui, la grande majorité des espèces trachéophytes sont homoiohydriques, tandis que les espèces bryophytes, les plantes terrestres non vasculaires, sont poïkilohydriques. Il est supposé qu'à l'instar des bryophytes et de nombreuses algues charophytes, les premières plantes terrestres étaient homoiohydriques, car vivant dans des zones de balancement où la présence d'eau est fluctuante (Oliver, 2005). L'apparition ultérieure de la poïkilohydrie, qui requiert une anatomie plus complexe, a certainement constitué un avantage évolutif puisque permettant la poursuite de l'activité photosynthétique et de la croissance dans un contexte de disponibilité limitée en eau, et donc de coloniser des habitats moins humides. La colonisation des terres et l'homoiohydrie ont tout de même requis des innovations pour contrôler la perte progressive en eau puis tolérer la déshydratation (de Vries et Archibald, 2018 ; Proctor et Tuba, 2002).

De nombreuses autres contraintes sont aussi associées au milieu terrestre en comparaison au milieu aquatique. L'absence de poussée d'Archimède accroît les effets de la gravité, conduisant les plantes à renforcer leur structure et posséder un port érigé. Les éléments minéraux sont moins accessibles sur les roches et dans les sols que dans l'eau. Les écarts de températures sont plus importants, avec des fluctuations plus rapides. En outre, les plantes terrestres ont été exposées à de nouveaux agents pathogènes et bioagresseurs. Face à ces contraintes inhérentes à la vie hors de l'eau, de nombreux caractères propres aux embryophytes sont apparus et sont considérés comme cruciaux dans l'adaptation des premières plantes terrestres (Donoghue *et al.*, 2021 ; Delwiche et Cooper, 2015 ; de Vries et Archibald, 2018).

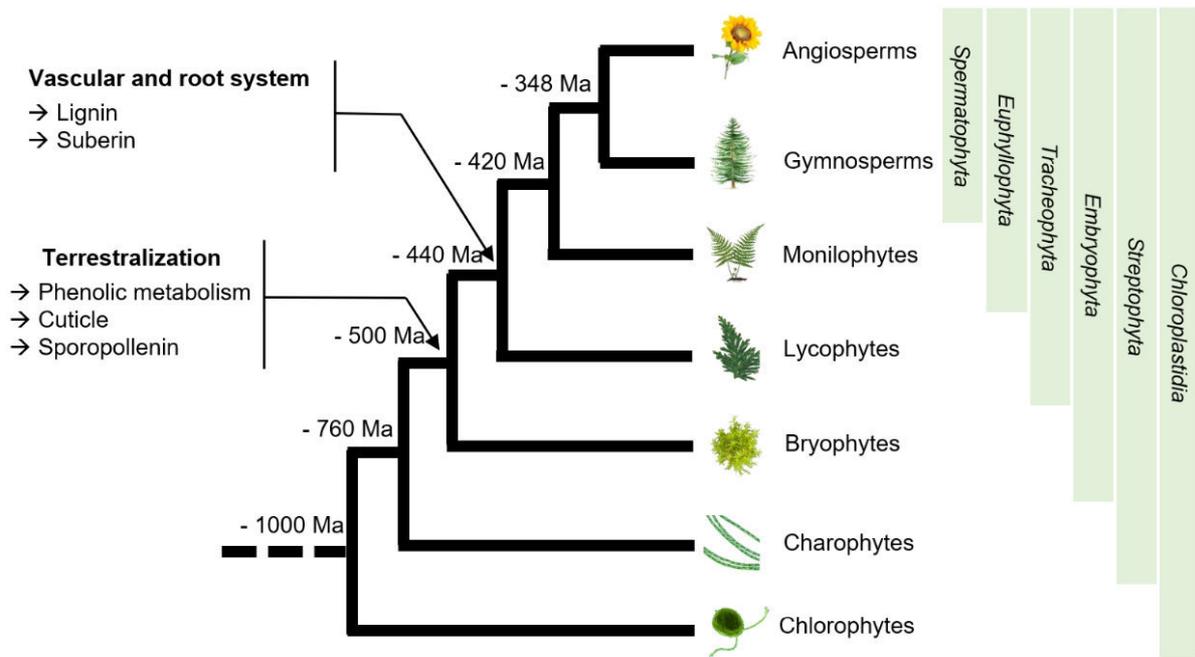


Figure 3 : Évolution croisée de la lignée verte et des polymères apoplastiques hydrophobes.

L'arbre phylogénétique représente les grands clades de la lignée verte (*Chloroplastidia*) et l'apparition des quatre polymères apoplastiques hydrophobes au cours de l'évolution. Les plantes terrestres, ou embryophytes, sont apparues avec la terrestrialisation, au cours de laquelle l'émergence du métabolisme phénolique, de la cuticule et de la sporopollénine ont eu un rôle crucial. Les systèmes vasculaire et racinaire, qui nécessitent les polymères de lignine et subérine, sont apparus chez les plantes vasculaires, ou trachéophytes. Ma : millions d'années. D'après Morris *et al.* (2018).

Ainsi, la possibilité d'établir des symbioses avec des champignons a vraisemblablement eu une importance majeure dans l'accès aux éléments minéraux (Delaux *et al.*, 2013), l'apparition de phytohormones et de nouvelles voies de signalisations a joué un rôle dans les réponses rapides et coordonnées aux stress (Fürst-Jansen *et al.*, 2020), et l'épaississement des parois pecto-cellulosiques a renforcé leur propriétés protectrices (Popper *et al.*, 2011). Ces innovations métaboliques, cellulaires ou physiologiques impliquent de nombreux gènes sous-jacents dont l'apparition ou la néofonctionnalisation a permis l'émergence de ces caractères (Bowles *et al.*, 2020 ; Rensing, 2018). Des publications récentes montrent souvent que ces familles géniques sont aussi présentes dans des espèces charophytes et partagent une origine commune avec les embryophytes, posant la question de connaître si leurs fonctions sont identiques ou différentes, et comment ces caractères sont apparus (Delaux *et al.*, 2012 et 2015 ; Popper *et al.*, 2011 ; de Vries *et al.*, 2018). Si toutes ces adaptations semblent coïncider avec la terrestrialisation, d'autres caractères apparus ultérieurement ont aussi conféré des capacités adaptatives majeures, qui sont d'ailleurs souvent choisies pour nommer les grands clades d'embryophytes. Ainsi, l'apparition de tissus vasculaires (e.g. trachéïdes, tubes criblés) chez les trachéophytes il y a 444 Ma a permis une croissance plus importante et un transport de l'eau plus efficace. Les graines apparues chez les spermatophytes il y a 348 Ma peuvent rester latentes jusqu'à des conditions favorables à la germination, et les fleurs des angiospermes apparus il y a 222 Ma protègent les organes sexuels tout en facilitant la pollinisation (Morris *et al.*, 2018). Parmi toutes ces adaptations apparues au cours de l'évolution, il est notable que nombre d'entre elles impliquent des polymères apoplastiques hydrophobes (fig. 3). Ces polymères ont des propriétés variées en termes de composition, fonction et localisation. D'une manière générale, ils permettent de limiter la perte en eau, d'apporter une rigidité et une barrière contre les UV ou les agents pathogènes, soit autant de caractères adaptatifs aux milieux terrestres (Niklas *et al.*, 2017). Si la lignine et la subérine sont apparues avec les trachéophytes, la cutine et la sporopollénine sont apparues avec les embryophytes. L'origine de ces deux polymères coïncide donc avec la colonisation de la terre par les plantes, et a vraisemblablement contribué à celle-ci (fig. 3 ; Niklas *et al.*, 2017 ; Seale, 2020 ; Renault *et al.*, 2017a). En effet, la cutine est le constituant central de la cuticule, une couche hydrophobe qui recouvre les organes aériens des plantes terrestres, leur conférant une imperméabilité et limitant la perte passive en eau (Fich *et al.*, 2016). La sporopollénine est un polymère très récalcitrant qui recouvre les spores et les grains de pollen, les rendant résistants à des conditions extérieures variées et extrêmes, jusqu'à leur germination (Li *et al.*, 2019). Dans un environnement asséchant et fluctuant, l'existence de ces deux polymères, ou de leur forme ancestrale, est considérée comme centrale dans la survie

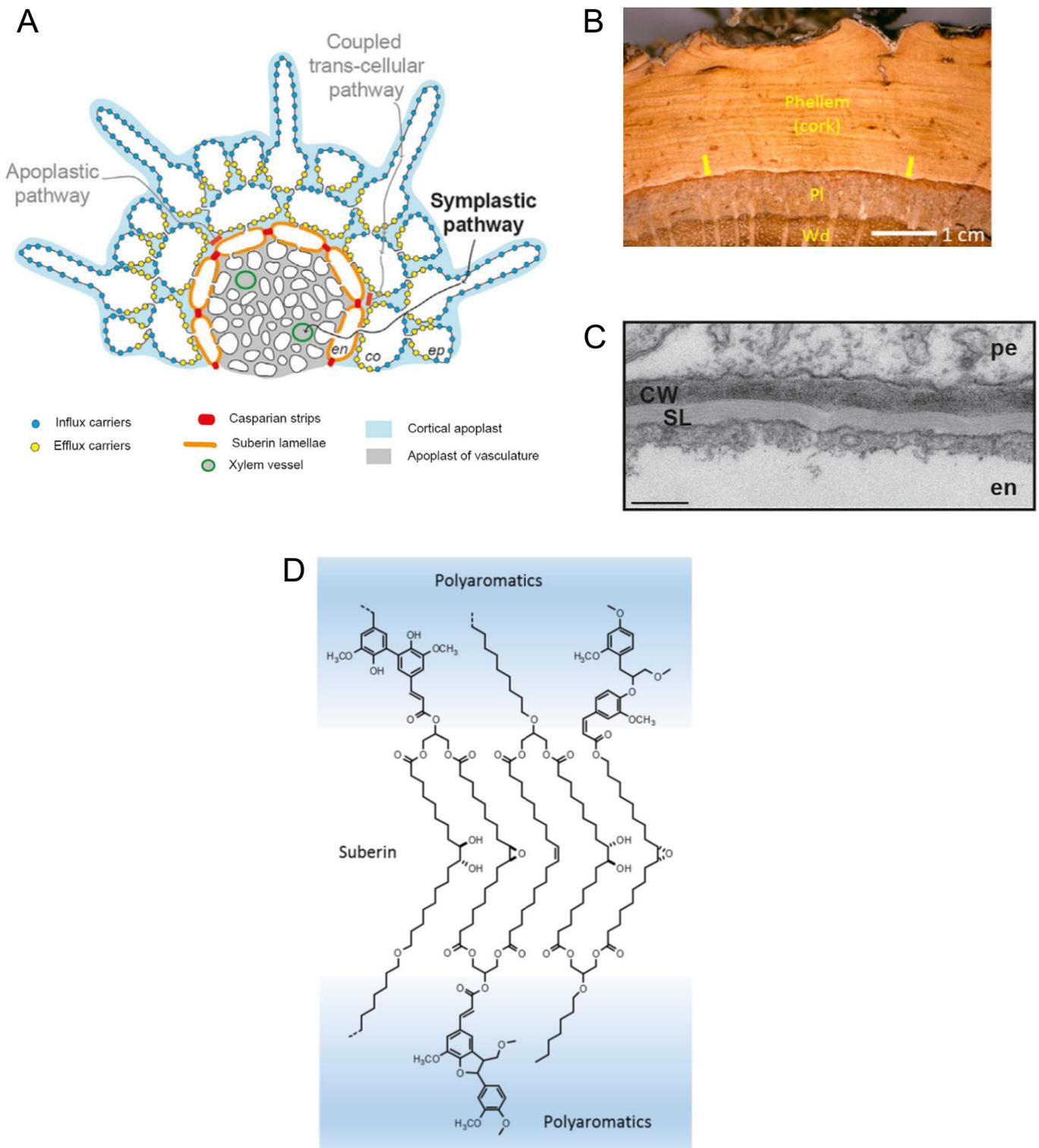


Figure 4 : Localisation, structure et composition de la subérine.

A : Schéma d'une coupe radiale de racine après subérisation de l'endoderme. Le mouvement de l'eau et des minéraux est possible dans le cortex par transport apoplastique et trans-cellulaire jusqu'à l'endoderme où la subérine et le cadre de Caspariy empêchent le passage cytoplasmique. Le transport symplastique via les plasmodesmes n'est pas impacté par ces barrières hydrophobes. D'après Barberon *et al.* (2016). **B** : Coupe d'un tronc de chêne. Le périderme est composé du phellogène, la couche méristématique indiquée par les flèches jaunes, de laquelle se forme le phelloderme (invisible) et le phellème (liège), particulièrement développé et subérisé chez le chêne-liège. PI : phloème ; wd : bois (xylème). D'après Graça (2015). **C** : Photographie en microscopie électronique à transmission montrant la couche de subérine d'une cellule d'endoderme d'une racine d'*Arabidopsis thaliana*. La subérine est déposée entre la membrane plasmique et la paroi primaire de l'endoderme. La structure lamellaire alternant des zones claires et sombres est visible. SL : subérine lamellaire ; CW : paroi ; en : endoderme ; pe : péricycle. Échelle : 200 nm. D'après Barberon *et al.* (2016). **D** : Structure macromoléculaire de la subérine. Le domaine poly-aliphatique est constitué d'un polymère linéaire alternant glycérol et α,ω -diFA, avec un ω -OH-FA en bout de chaîne. Les acides féruliques sont estérifiés aux unités glycérol ou ω -OH-FA, et sont l'interface entre le domaine poly-aliphatique et poly-aromatique, composé d'acides hydroxycinnamiques condensés par des liaisons fortes de type éther. Les domaines poly-aliphatiques et poly-aromatiques forment respectivement les couches claires et sombres dans la structure lamellaire observée en microscopie électronique. D'après Graça (2015).

des premières plantes terrestres (Renault *et al.*, 2017a ; Niklas *et al.*, 2017). Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur la voie de biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, afin de savoir dans quelle mesure cette voie est conservée chez les embryophytes, comment elle a émergé et évolué, et quels liens évolutifs existent entre les voies de biosynthèse des différents polymères apoplastiques hydrophobes. Avant d'exposer plus en détails les objectifs de ma thèse, il me semble nécessaire d'introduire davantage ces polymères pour mieux discuter de leur histoire évolutive.

Les polymères apoplastiques hydrophobes des plantes : fonctions et composition

La subérine

La subérine est un polymère complexe aliphatique et phénolique, dont la synthèse est finement régulée pendant le développement mais également en fonction des conditions environnementales dans divers organes et tissus des plantes vasculaires. La subérine est notamment synthétisée dans l'endoderme racinaire, une couche unicellulaire qui sépare le cortex du péricycle des racines. La présence de cette couche hydrophobe bloque les transports apoplastique et trans-cellulaire de l'eau et des minéraux, mais n'affecte pas le transport symplastique (fig. 4A ; Barberon *et al.*, 2016 ; Schreiber *et al.*, 2010). Le transport et l'absorption de l'eau et des minéraux peut alors être régulé et adapté aux conditions environnementales. La couche de subérine de l'endoderme a en effet une certaine plasticité : le polymère peut être dégradé ou synthétisé en réponse à des carences en minéraux ou des stress abiotiques, et ce sous contrôle de l'acide abscissique et de l'éthylène (Barberon *et al.*, 2016). La subérine est aussi synthétisée de manière constitutive dans les téguments des graines et dans le périderme d'organes spécialisés, tels que les tubercules ou l'écorce des plantes à croissance secondaire. Le phellème – la partie externe du périderme – de l'écorce du chêne-liège est par exemple particulièrement épais et subérisé, et constitue le liège (fig. 4B ; Graça, 2015). La subérine est déposée entre la membrane plasmique et la paroi primaire des cellules subérisées. Elle présente souvent une structure lamellaire en microscopie électronique à transmission (TEM), avec une alternance de couches claires et sombres (fig. 4C). Cette structure est certainement liée à la composition chimique et à l'arrangement moléculaire du polymère (Graça, 2015). La subérine est composée entre 80 et 90 % d'acides gras à longue chaîne (LCFA), allant de 16 à 26 atomes de carbone (C16 → C26). La plupart de ces acides gras sont des C16 et C18 contenant un groupe hydroxyle (ω -OH-FA) ou une deuxième fonction acide

carboxylique (α,ω -diFA) en bout de chaîne, ainsi qu'une modification en milieu de chaîne (insaturation, époxyde, deux hydroxyles). Le polymère contient aussi 5 à 20 % de glycérol, et 10 à 20 % d'acide férulique, ainsi que des quantités mineures d'acides gras saturés non hydroxylés et d'alcools gras. La subérine peut aussi contenir jusqu'à 20 % de cires (alcools et alcanes à très longue chaîne) et jusqu'à 10 % de composés phénoliques qui sont imprégnés dans le polymère sans être polymérisés. Ces quantités sont indicatives, la composition de la subérine étant très variable entre les organes et les espèces (Schreiber, 2010 ; Graça, 2015). La subérine est un polyester ; les monomères sont polymérisés par des liaisons ester entre leurs fonctions acides carboxyliques et hydroxyles. Les acides gras hydroxylés en bout et/ou en milieu de chaîne permettent de former un polymère plus ou moins linéaire ou réticulé (Graça, 2015). La composition de la subérine est analysée par diverses méthodes de dépolymérisation chimique totale du polymère, qui clivent spécifiquement les liaisons ester. Ces traitements laissent une proportion de subérine intacte, composée d'acides hydroxycinnamiques assemblés par d'autres types de liaisons telles que les liaisons éther. Ce domaine de la subérine, à la composition proche de la lignine, est appelé domaine poly-phénolique ou poly-aromatique (Bernards *et al.*, 1995 ; Bernards et Razem, 2001). A l'inverse de la dépolymérisation totale, d'autres techniques de dépolymérisation partielle permettent de libérer et d'identifier des oligomères de subérine, et ainsi de révéler la nature de certaines liaisons caractéristiques entre monomères. Il a ainsi été montré la présence de mono-, di- et tri-acylglycerol, composés de ω -OH-FAs ou α,ω -diFAs estérifiés à une molécule de glycérol (Graça et Pereira, 2000 ; Graça et Santos, 2006a ; Wang *et al.*, 2010), des esters entre ω -OH-FAs et α,ω -diFAs (Graça et Santos, 2006b), ainsi qu'entre ω -OH-FA et férulate (Graça et Pereira, 2000). Des oligomères plus complexes ont également été identifiés : des polyesters linéaires alternant un glycérol et un α,ω -diFA, ainsi que des trimères glycérol – ω -OH-FA – férulate (Graça *et al.*, 2015). Ces données suggèrent une structure macromoléculaire de la subérine présentée en figure 3C. La subérine serait composée d'un domaine dit poly-aliphatique alternant une molécule de glycérol et de α,ω -diFA, avec un ω -OH-FA en bout de chaîne. Les molécules de férulate sont estérifiées par leur fonction acide carboxylique à des molécules de glycérol ou de ω -OH-FA, et servent d'interface entre les domaines poly-aliphatiques et poly-aromatiques. La nature de la subérine est donc complexe au vu de la diversité des monomères qui la composent, des liaisons chimiques entre monomères, et de leur assemblage macromoléculaire qui semble hétérogène. Les deux domaines de la subérine rappellent à la fois la composition du polyester lipidique de cutine et du polymère phénolique de lignine

La lignine

La lignine est le nom générique pour des hétéropolymères phénoliques dérivés de la voie des phénylpropanoïdes (Ralph *et al.*, 2004). La lignine est le deuxième biopolymère le plus abondant sur terre après la cellulose et représente environ 30% du carbone organique de la biosphère (Boerjan *et al.*, 2003). Ce polymère est notamment présent dans les tissus vasculaires des trachéophytes, auxquels il confère une rigidité en imprégnant les parois secondaires. Chez les plantes à croissance secondaire, la lignine est le composant principal du bois. Le renforcement des cellules du xylème permet aux tissus conducteurs de résister à la pression négative exercée par le transport de l'eau, et ainsi de ne pas collapser (fig. 5A ; Smith *et al.*, 2017). L'apparition de la lignine et des systèmes racinaire et vasculaire a ainsi permis aux plantes de croître considérablement en hauteur, de s'adapter à de nouveaux milieux et de dominer les écosystèmes (Weng et Chapple, 2010). Si la présence de composés similaires à la lignine dans des espèces chlorophytes, charophytes et bryophytes est discutée (Siegel, 1969 ; Delwiche *et al.*, 1989 ; Ligrone *et al.*, 2009 ; Martone *et al.*, 2009 ; Sørensen *et al.*, 2011), il s'agit vraisemblablement d'artefacts analytiques et/ou d'évolutions convergentes, la biosynthèse de lignine *stricto sensu* étant propre au groupe monophylétique des trachéophytes (Weng et Chapple, 2010 ; Renault *et al.*, 2019). Les espèces bryophytes ont des cellules spécialisées dans le transport de l'eau qui possèdent une paroi épaissie (e.g. hydroïdes des mousses) et de nombreux plasmodesmes, mais ne sont toutefois pas considérées comme homologues aux trachéïdes et éléments de vaisseaux du xylème des trachéophytes (Ligrone *et al.*, 2000). Si le rôle majeur de la lignine est de renforcer les tissus conducteurs des plantes vasculaires et conférer une croissance et un transport de l'eau efficaces, le polymère constitue aussi une barrière contre l'infection par les agents pathogènes. Sa synthèse constitutive est ainsi aussi modulable par des stress biotiques et abiotiques (Moura *et al.*, 2010). La biosynthèse de lignine a lieu dans une moindre proportion dans d'autres tissus des plantes. Le cadre de Caspary, une structure qui entoure les cellules de l'endoderme et renforce la barrière apoplastique constituée avec la subérine, est ainsi entièrement composé de lignine (fig. 4A ; Naseer *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2013). Certaines cellules à la base des pétales et des sépales produisent aussi une structure composée de lignine, qui joue un rôle lors de l'abscission de ces organes (Lee *et al.*, 2018). De la lignine est également synthétisée dans les fibres interfasciculaires (fig. 5A), le phloème et les téguments des graines (Smith *et al.*, 2017 ; Vanholme *et al.*, 2010 ; Renault *et al.*, 2019). Dans ces derniers exemples, la lignine est synthétisée dans des tissus qui restent

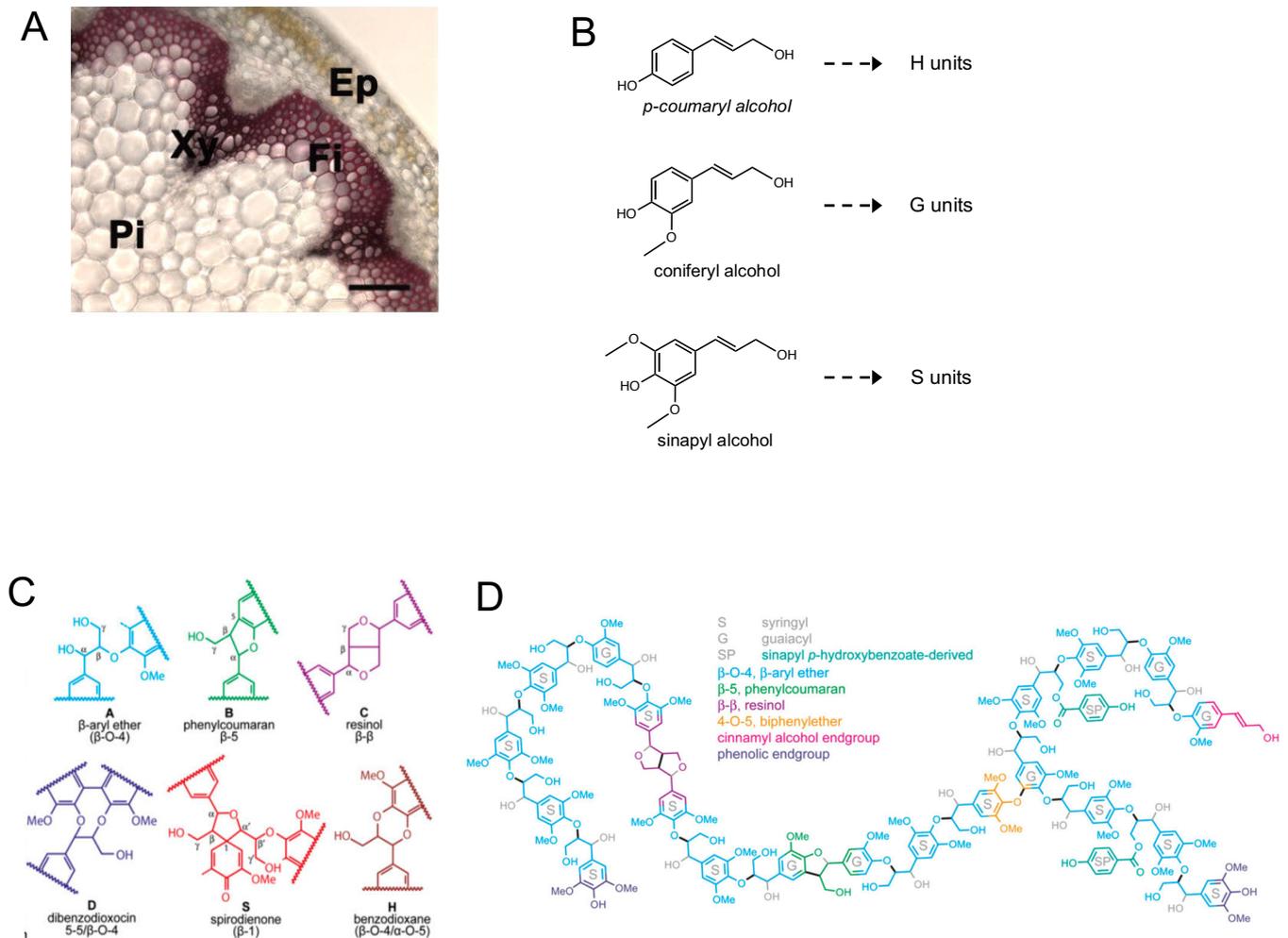


Figure 5 : Localisation, structure et composition de la lignine.

A : Coupe transversale d'une tige d'*Arabidopsis thaliana* colorée au phloroglucinol-HCl. La lignine présente dans les parois des cellules du xylème et des fibres est colorée en violet. Ep : épiderme et cortex ; Fi : fibres interfasciculaires ; Xy : xylème ; Pi : parenchyme. Échelle : 100 μ m. D'après Pradhan Mitra et Loqué (2014). **B** : Les trois monomères principaux de la lignine sont issus de la réduction d'acides hydroxycinnamiques et constituent les unités H, G et S une fois polymérisés. **C** : La polymérisation radicalaire des monolignols forme une diversité de liaisons chimiques entre les monolignols au sein du polymère de lignine. D'après Vanholme *et al.* (2010). **D** : Prédiction d'une structure de lignine du peuplier d'après une analyse en RMN. D'après Vanholme *et al.* (2010).

vivants et peut être située dans la paroi primaire, contrairement aux cellules du xylème. La lignine est très majoritairement composée de trois précurseurs appelés monolignols, issus de la réduction de trois des acides hydroxycinnamiques activés par du coenzyme A (hydroxycinnamoyl-CoA), dérivant de la voie des phénylpropanoïdes : acide *p*-coumaroyl-CoA → alcool *p*-coumarylique ; féruloyl-CoA → alcool coniférylique ; sinapoyl-CoA → alcool sinapylique. Après incorporation dans le polymère de lignine par couplage radicalaire, ces trois monolignols deviennent respectivement des unités *p*-hydroxyphényl (H), guaiacyl (G), et syringyl (S ; fig. 5B). Hormis quelques exceptions, les gymnospermes possèdent uniquement les unités H et G, tandis que les angiospermes, les Sélaginellacées et quelques lycophytes possèdent les unités H, G et S. Les différentes lignines des plantes ont généralement une teneur très faible en unités H, le polymère étant en grande partie composé d'unités G et S avec des ratios S/G variables, voire une quasi-totalité d'unités G chez les gymnospermes (Dixon et Barros, 2019). La variabilité de la composition des lignines entre les espèces, les tissus, ou dans des plantes génétiquement modifiées, montre la grande plasticité de la lignine, dont les propriétés diffèrent selon sa composition (Dixon et Barros, 2019 ; Nakashima *et al.*, 2008 ; Anderson *et al.*, 2015). Au-delà des trois monomères canoniques de lignine, des lignines spécifiques à certains taxons de plantes utilisent d'autres monolignols issus d'autres précurseurs hydroxycinnamoyl-CoA. L'alcool cafféylique et l'alcool 5-hydroxyférulique forment respectivement des unités C et 5F dans la lignine des téguments d'espèces appartenant aux familles *Euphorbiaceae* et *Cleomaceae* (Tobimatsu *et al.*, 2013). Ces unités s'associent aux unités S ou G ou peuvent former un polymère entièrement composé d'unités C tel que dans les téguments des graines de vanille (*Vanilla panifolia* ; Chen *et al.*, 2013). En plus des monolignols, d'autres molécules phénoliques minoritaires peuvent être incorporés au polymère de lignine. C'est le cas d'acides hydroxycinnamiques non réduits estérifiés à des monolignols, notamment chez les monocotylédones (Hatfield *et al.*, 2009 ; Karlen *et al.*, 2016). D'autres composés phénoliques sont parfois identifiés tels que des glycosides de stilbènes (Rencoret *et al.*, 2009), des phénolamides (Río *et al.*, 2018) ou des flavonoïdes, ces derniers pouvant être des sites de nucléation qui initient la polymérisation de la lignine (Lan *et al.*, 2015). Les monolignols sont effectivement polymérisés dans l'apoplaste via des réactions radicalaires catalysées par des enzymes de type laccase et/ou peroxydases. Ces enzymes utilisent respectivement le dioxygène et le peroxyde d'hydrogène comme co-substrat pour générer des radicaux libres à partir des monolignols. Ces radicaux très réactifs se condensent spontanément et forment au fur et à mesure un polymère de lignine. Il existe une grande diversité de liaisons

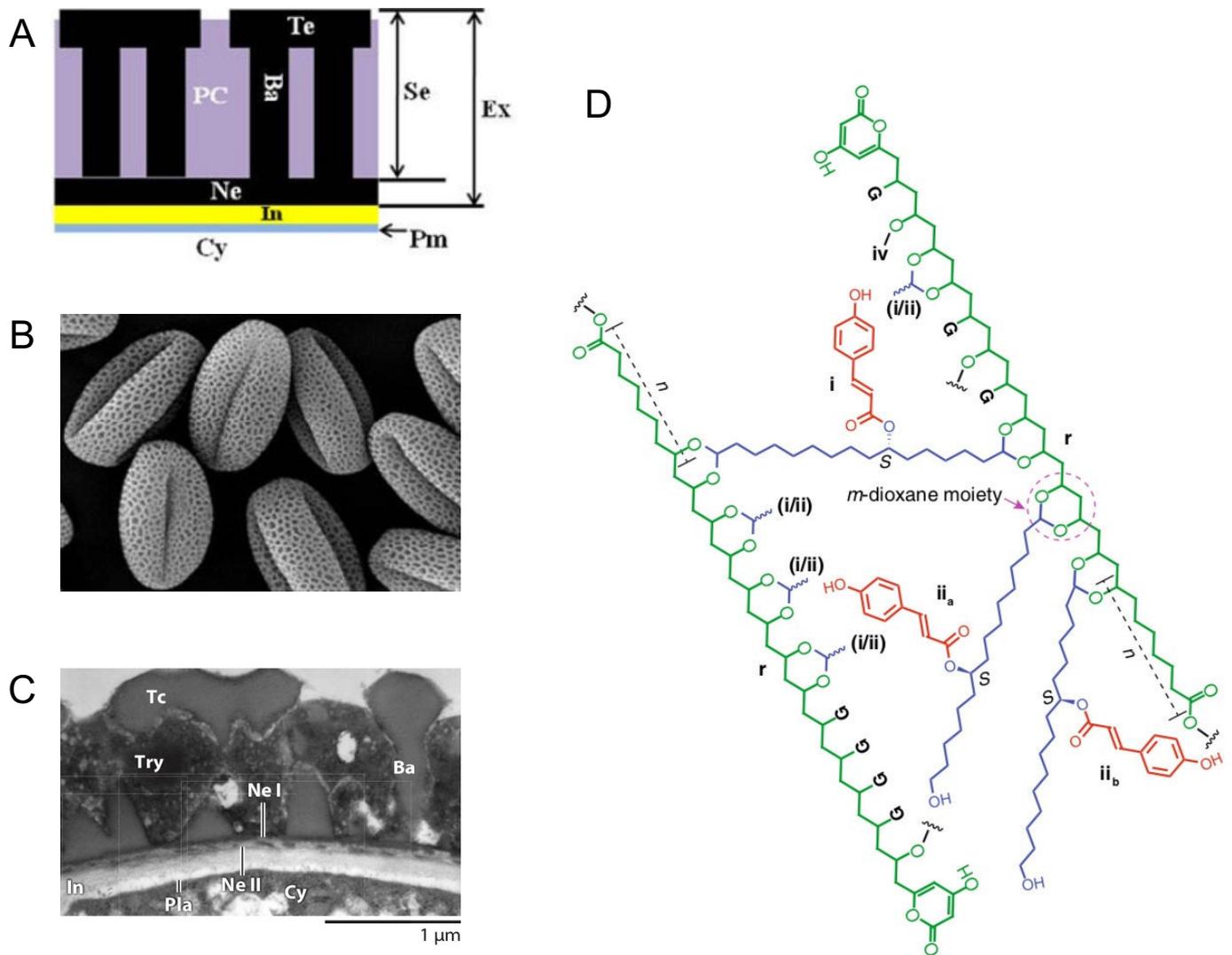


Figure 6 : Localisation, structure et composition de la sporopollénine.

A : Coupe schématique d'un grain de pollen. L'exine est composée de nexine et de sexine, elle-même composée de bacula et de tectum. La sexine est responsable des réticulations caractéristiques des grains de pollen visibles en microscopie électronique. L'exine est composée de sporopollénine. Le manteau pollinique est composé d'une variété de molécules (acides gras, protéines, phénolamides, caroténoïdes) non polymérisés. Cy : cytoplasme ; Pm : membrane plasmique ; In : intine ; Ex : exine ; Ne : nexine ; Se : sexine ; Ba : bacula ; Te : tectum ; PC : manteau pollinique. D'après Kim et Douglas (2013). **B :** Photographie en microscopie électronique à balayage de grains de pollen d'*Arabidopsis thaliana*. D'après Kim et Douglas (2013). **C :** Photographie en microscopie électronique à transmission d'une coupe de grain de pollen d'*Arabidopsis thaliana*, montrant la structure de la paroi. D'après Ariizumi et Toriyama (2011). **D :** Structure partielle de la sporopollénine de *Pinus rigida*. Des chaînes polvinyliques (vert) sont terminées par des fonctions α -pyrone, et reliées par des groupements 7,16-dihydroxy-C16 (violet), acylés par des unités *p*-coumarate (rouge). Les unités 7,16-dihydroxy-C16 et *p*-coumarate sont reliées par des liaisons ester. Les unités polyvinyl et 7,16-dihydroxy-C16 sont reliés par des liaisons éther qui forment des groupements dioxane. D'après Li *et al.* (2019).

chimiques formées, qui dépendent de l'environnement cellulaire et de la nature des monolignols disponibles (fig. 5C ; Vanholme *et al.*, 2010 ; Renault *et al.*, 2019 ; Dixon et Barros, 2019). Ainsi, bien que la lignine ait une composition simple au vu de ses trois unités H, G, S principales, sa structure finale est complexe et hétérogène. Les différentes molécules de polymère sont différentes en termes de taille, composition, liaison et réticulation. Si la structure exacte est difficilement identifiable, des techniques analytiques permettent de mesurer la proportion des unités et des types de liaisons (Vanholme *et al.*, 2010). Une structure prédite de la lignine du peuplier est par exemple présentée figure 5D d'après des analyses en RMN bidimensionnelle ^{13}C - ^1H .

La sporopollénine

La sporopollénine est un polymère complexe de nature composite et toujours partiellement inconnue, qui compose l'exine : la paroi externe des spores et des grains de pollen (fig. 6A ; l'exine est parfois appelée périne pour les spores). Les spores et les grains de pollen peuvent survivre de manière latente pendant de longues périodes dans un environnement fluctuant et contraignant. La couche d'exine protège le gamétophyte de la dessiccation, des rayonnements UV, des températures extrêmes et des attaques par des agents pathogènes, c'est-à-dire des contraintes spécifiques au milieu terrestre (Kim et Douglas, 2013 ; Ariizumi et Toriyama, 2011). Pour cette raison, la biosynthèse de la sporopollénine est considérée comme ayant été un prérequis indispensable à la terrestrialisation (Niklas *et al.*, 2017 ; Seale, 2020). Chez les bryophytes, les lycophytes et les monilophytes (i.e. les embryophytes non-spermatophytes), la sporopollénine est synthétisée la fois par la spore après méiose et par le sporophyte diploïde environnant. Chez les spermatophytes, la sporopollénine est exclusivement synthétisée par le tapetum, tissu interne des anthères, qui fournit aux microspores en développement les précurseurs du polymère (Wallace *et al.*, 2011). La paroi des grains de pollen est *in fine* constituée d'une couche interne d'intine à la composition similaire à la paroi primaire, et d'une couche externe d'exine composée de sporopollénine. L'exine est subdivisée en une couche homogène de nexine et une couche hétérogène de sexine (fig. 6A), cette dernière étant à l'origine des morphologies caractéristiques de l'exine des grains de pollen, observables en microscopie électronique (fig. 6B et 6C ; Ariizumi et Toriyama, 2011). En plus de son rôle protecteur, l'exine joue un rôle dans la reconnaissance du stigma et dans l'interaction avec les pollinisateurs (Zinkl, 1999 ; Kim et Douglas, 2013).

La sporopollénine est un polymère très résistant et récalcitrant aux traitements chimiques et enzymatiques. Les spores et les grains de pollen sont pour cette raison bien mieux

conservés et fossilisés que d'autres tissus de plantes (Fraser *et al.*, 2012 ; Jardine *et al.*, 2021). Cela explique aussi pourquoi la sporopollénine est le polymère apoplastique hydrophobe dont la composition et la structure sont les moins connues. Jusqu'à récemment, la composition de la sporopollénine était donc surtout inférée par l'élucidation génétique et biochimique de sa voie de biosynthèse, reliée au métabolisme des acides gras et des polycétides (Quilichini *et al.*, 2015). Récemment, Li *et al.* (2019) ont élucidé grâce à de nouveaux protocoles analytiques, 45 % la structure de la sporopollénine du pin rigide (*Pinus rigida*), révélant la nature des différents monomères et des liaisons chimiques qui les assemblent. La portion identifiée du polymère comporte de longues chaînes d'alcool polvinyliques dérivées d'acides gras et de polycétides, terminées par des fonctions α -pyrone, et reliées entre elles par des groupements 7-*O-p*-coumaroyl-16-hydroxy-C16. Ces groupements réticulent le polymère via des liaisons éther qui forment des groupements dioxane (fig. 6D). De faibles quantités de naringénine liées au polymère ont aussi été détectées. Cette élucidation est cohérente avec les voies métaboliques jusqu'alors élucidées. Les auteurs suggèrent que l'existence de deux types de liaisons – les liaisons ester entre les unités *p*-coumarate et 7,16-dihydroxypalmitate, et les liaisons éther entre ces acides gras acylés et les chaînes polyvinyliques – confèrent au polymère ses propriétés de résistance et récalcitrance. La moitié de la structure du polymère reste inconnue, et comporte probablement d'autres types de liaisons qui, à l'instar de la lignine, forment un polymère très hétérogène. De plus, cette élucidation révèle que la sporopollénine dérive aussi de la voie des phénylpropanoïdes, via la présence d'acide hydroxycinnamique (*p*-coumarate) et de flavonoïde (naringénine). D'un point de vue évolutif, cela soutient l'idée que la voie des phénylpropanoïdes a émergé avec les plantes terrestres et a contribué à l'adaptation aux milieux terrestres ; en partie via la biosynthèse de la sporopollénine (fig. 3 ; de Vries *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2019).

La cutine

Avec la sporopollénine, la cutine est le deuxième polymère apoplastique hydrophobe présent dans l'ensemble des embryophytes. Il est le composant principal de la cuticule, une couche hydrophobe qui recouvre les organes aériens des plantes terrestres, et les rend imperméables (fig. 7A ; Fich *et al.*, 2016). La cuticule se compose généralement de plusieurs couches distinctes dans les parois des cellules cutinisées. Une première couche contient le polymère de cutine associé avec les polysaccharides de la paroi, il s'agit de la couche cuticulaire ou « cuticular layer ». Une deuxième couche est composée exclusivement de cutine, à

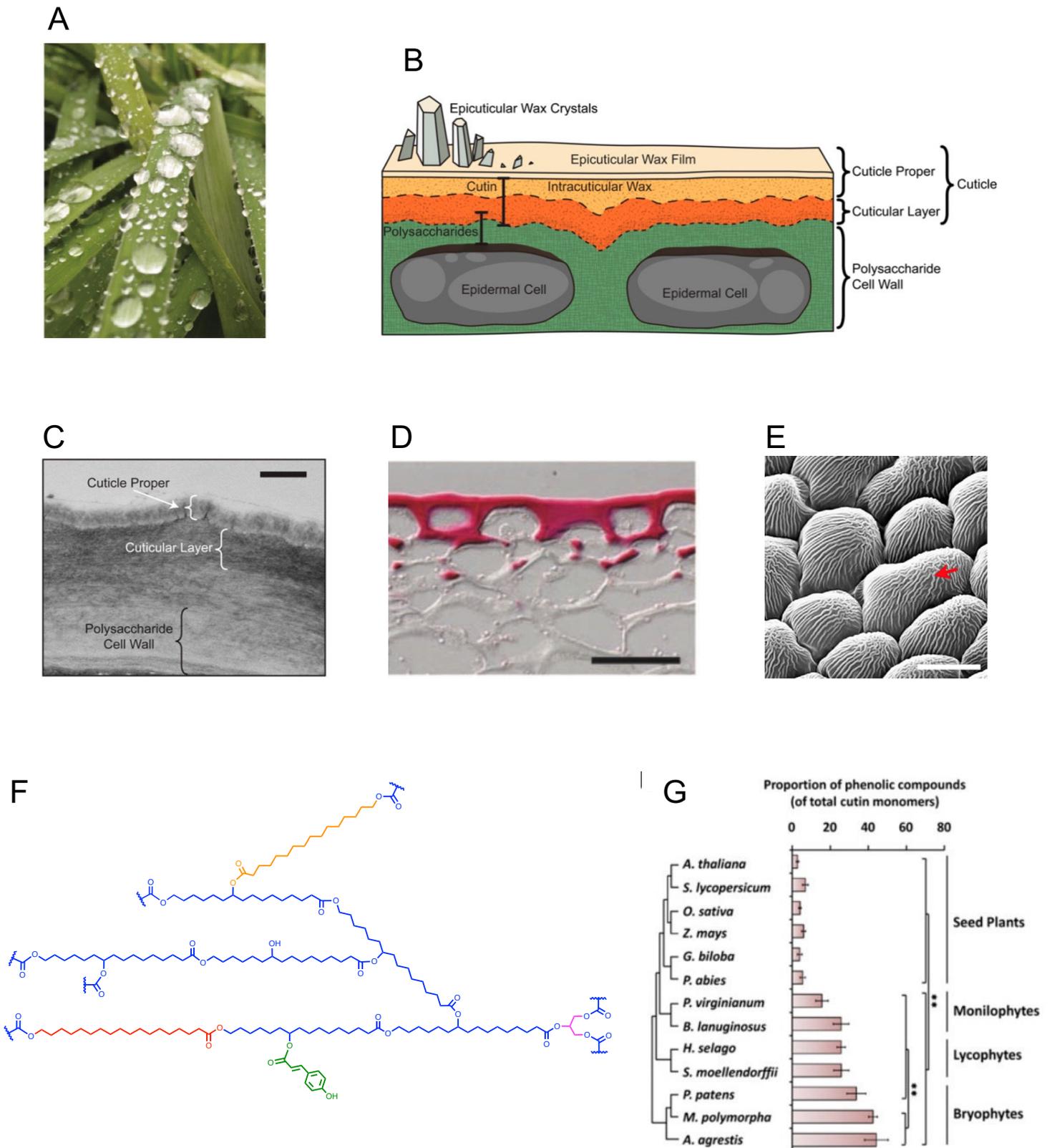


Figure 7 : Localisation, structure et composition de la cutine et de la cuticule.

A : La cuticule confère une grande hydrophobicité aux surfaces des organes aériens des plantes, observable sur cette photo de feuilles de *Phragmites australis* recouvertes de rosée. D'après Barthlott *et al.* (2017). **B** : Schéma d'une cellule d'épiderme montrant les différentes couches de la cuticule. Les polysaccharides de la paroi et le polyester de cutine sont imbriqués au niveau de la « cuticular layer ». Le « cuticle proper » est composé de cutine où sont incorporées des cires non polymérisées. Une couche de cires épicuticulaires est déposée à la surface de la cuticule, formant parfois des cristaux visibles en microscopie électronique. D'après Yeats et Rose (2013).

C : Photographie en microscopie électronique à transmission d'une cellule épidermique de tige d'*Arabidopsis thaliana*, montrant les différentes couches caractéristiques de la cuticule. Échelle : 500 nm. D'après Yeats *et al.* (2012). **D** : Coupe transversale de l'épiderme d'un fruit de tomate coloré au rouge Soudan, faisant apparaître une couche de cuticule particulièrement épaisse. Échelle : 50 μm . D'après Yeats *et al.* (2012). **E** : Photographie en microscopie électronique à balayage de la face abaxiale d'un pétale d'*Arabidopsis thaliana*, montrant les crêtes cuticulaires caractéristiques formées par la cuticule (flèche rouge). Échelle : 10 μm . D'après Hong *et al.* (2017). **F** : Structure théorique d'un polymère de cutine du fruit de tomate. Le 10,16-dihydroxypalmitate (bleu) est le monomère majoritaire. Le polymère comporte aussi en moindre proportion d'autres acides gras tels que l'acide 16-hydroxypalmitique (orange) et l'acide 18-hydroxyoctadecanoïque (rouge), des acides hydroxycinnamiques tel que l'acide *p*-coumarique (vert), et du glycérol (rose). Les monomères les plus minoritaires ne sont pas représentés. La plupart des fonctions hydroxyles sont impliquées dans des liaisons ester, bien qu'une proportion variable des hydroxyles situés en milieu de chaîne des acides gras restent libres. Les acides gras hydroxylés en bout de chaîne seulement forment des chaînes linéaires, tandis que les acides gras hydroxylés en bout et en milieu de chaîne peuvent former des réticulations. Cette structure a été dessinée d'après la littérature citée dans le manuscrit. **G** : Proportion en acides hydroxycinnamiques, ou « phenolic compounds », dans la cutine d'espèces représentatives des clades embryophytes. D'après Kong *et al.* (2020).

l'intérieure de laquelle des cires intracuticulaires non polymérisées sont enchâssées ; il s'agit de la cuticule à proprement dit ou « cuticle proper ». Une dernière couche est composée de cires épicuticulaires qui peuvent s'assembler en cristaux (fig. 7B ; Ingram et Nawrath, 2017 ; Fich *et al.*, 2016). À l'inverse de la subérine qui se situe entre la membrane plasmique et la paroi primaire (fig. 4C), la cuticule est déposée dans l'apoplaste à l'extérieur de la paroi (fig. 7C). Bien que la structure canonique de la cuticule soit généralement identifiable dans les différents tissus cuticulaires avec des proportions variables de chaque couche, plus de 6 structures différentes de cuticules ont déjà été observées chez les plantes (Jeffree *et al.*, 2006). La structure de la cuticule peut être observée par diverses méthodes complémentaires de microscopie. En microscopie optique, la coloration de coupes tissulaires par des colorants lipidiques permet d'apprécier la localisation tissulaire et l'épaisseur de la cuticule (fig. 7D). La microscopie électronique à transmission permet de distinguer les couches caractéristiques de la cuticule (fig. 7C). L'observation en microscopie électronique à balayage de la surface d'un organe permet d'observer les potentielles nanostructures caractéristiques formées par la cuticule (fig. 7E). Ces architectures très variées au sein des espèces et des organes de plantes, ainsi que les cristaux épicuticulaires, peuvent conférer une couleur, un effet autonettoyant (« l'effet Lotus »), une super-hydrophobicité ou encore attirer les pollinisateurs (Vignolini *et al.*, 2015 ; Barthlott *et al.*, 2017 ; Domínguez *et al.*, 2011). Selon l'organe et l'espèce considérée, l'épaisseur de la cuticule peut varier de 0,02 à 200 μm , et représenter une quantité supérieure à 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Nawrath, 2006). Mis à part les tiges des plantes ligneuses qui possèdent un périoderme subérisé, l'ensemble des organes aériens des plantes terrestres comportent une cuticule, synthétisée et déposée sur la couche épidermique (Fich *et al.*, 2016). D'autres organes synthétisent et possèdent toutefois une cuticule. Dans les graines ex-albuminées, une couche de cuticule est synthétisée autour de l'embryon, et est maintenue lors de la croissance de la plantule (Delude *et al.*, 2016 ; Creff *et al.*, 2019). Des couches de cuticules sont aussi présentes autour de l'endosperme et dans le tégument interne des graines, importantes pour leur dormance et leur

viabilité (De Giorgi *et al.*, 2015 ; Beeckman *et al.*, 2000). Récemment, il a été découvert qu'une fine couche de cuticule est présente à l'extrémité des racines principales et secondaires. Cette couche appelée « Root Cap Cuticle » protège les zones méristématiques des stress osmotique et salin, et permet l'émergence normale des racines secondaires à travers les tissus racinaires (Berhin *et al.*, 2019). Mis à part ces derniers exemples, le rôle majeur attribué à la cuticule est d'imperméabiliser les organes aériens et de limiter la perte en eau des tissus. De fait, les propriétés hydrophobes imperméables des cuticules sont comparables aux polymères synthétiques, et une paroi entourée d'une cuticule est de l'ordre de 1000 fois plus imperméable qu'une paroi seule (Schreiber et Schönherr, 2009 ; Domínguez *et al.*, 2011). La cuticule permet ainsi de limiter les pertes passives en eau si efficacement que chez les plantes homoiohydriques, environ 95% de l'évapotranspiration se fait via les stomates (Leide *et al.*, 2007). Cette imperméabilité est davantage attribuée aux cires épicuticulaires qu'au polymère de cutine. Les organes protégés par une cuticule deviennent en effet perméables une fois les cires enlevées par du chloroforme (Schreiber et Schönherr, 2009). De plus, il n'y a pas de corrélation entre l'imperméabilité d'une cuticule et son épaisseur, mais avec la quantité de cire déposée à sa surface (Kissinger *et al.*, 2005 ; Isaacson *et al.*, 2009). Ainsi, les fruits d'une lignée mutante de tomate (*Solanum lycopersicum*) affectée dans la biosynthèse de cutine ont une quantité de cutine diminuée de 98%, mais une quantité de cires et une imperméabilité qui sont similaires aux fruits de plantes sauvages (Isaacson *et al.*, 2009). D'autres lignées mutantes montrent que la modification de la composition de la cutine peut en revanche affecter la composition et/ou la quantité des cires, et augmenter les pertes passives en eau (Leide *et al.*, 2007 ; Isaacson *et al.*, 2009). Du point de vue de l'imperméabilité et de la limitation des pertes passives en eau, il est donc proposé que la cutine soit le support nécessaire au dépôt conforme des cires (Fich *et al.*, 2016 ; Kissinger *et al.*, 2005 ; Isaacson *et al.*, 2009). Si l'épaisseur de la cutine n'affecte pas directement l'imperméabilité de la cuticule, elle peut en revanche être corrélée avec la sensibilité à la pénétration et l'infection par des agents pathogènes. Une autre fonction importante de la cuticule est donc de constituer une barrière à l'attaque d'agents pathogènes et de bio-agresseurs (Isaacson *et al.*, 2009 ; Nawrath, 2006). D'un point de vue développemental, la cuticule permet également d'empêcher la fusion des organes. Si ce phénomène peut avoir lieu de manière contrôlée tel que lors de la fusion des carpelles (Ingram et Nawrath, 2017), il s'agit d'un phénotype souvent observé dans des lignées mutantes affectées dans la synthèse, le transport, ou la régulation de la biosynthèse de cutine (Tanaka *et al.*, 2004), ainsi que dans des lignées surexprimant des cutinases de champignon ou de plante (Sieber *et al.*, 2000 ; Takahashi *et al.*, 2010). Notamment lors de l'organogénèse, l'épiderme et la cuticule restreignent et

dirigent la croissance. La déformation de la paroi et la synthèse progressive de la cuticule permettent de séparer les organes et d'empêcher leur fusion (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2007 ; Kutschera et Niklas, 2007). Il est suggéré que dans cette perspective, les polysaccharides confèrent une rigidité tandis que la cuticule apporte une élasticité à l'épiderme (Lopez-Casado *et al.*, 2007 ; Bargel *et al.*, 2005). Enfin, par sa structure physique et sa composition chimique, la cuticule peut refléter une partie des rayonnements UV et exercer un premier filtre sur les tissus qu'elle protège (Domínguez *et al.*, 2011).

Il existe une grande diversité de cuticules au sein des différents tissus et organes, et de l'ensemble des plantes terrestres. Cette diversité en termes de quantité et d'épaisseur des différentes couches, de propriétés physico-chimiques ou de forme des nanostructures, est reflétée par une diversité de composition chimique et d'assemblage macromoléculaire des cires, et surtout du polymère de cutine (Jeffree *et al.*, 2006 ; Barthlott *et al.*, 2017 ; Pollard *et al.*, 2008). Au sein de cette diversité, les plantes modèles *A. thaliana* et *S. lycopersicum* ont particulièrement été étudiées pour des raisons pratiques et agronomiques. Les données sur la biosynthèse, la composition et la structure de la cutine et de la cuticule proviennent donc principalement de ces deux espèces. Les cires intra- et épicuticulaires sont composées d'un ensemble de molécules aliphatiques saturées à très longue chaîne (C24 → C34). Il s'agit d'un mélange d'alcane, d'alcool, et d'aldéhyde, et dans une moindre mesure de triterpène. La cutine est un polyester majoritairement composé d'acides gras hydroxylés. Globalement, les acides gras hydroxylés à longue chaîne (C16 et C18) sont majoritaires, tandis que les acides gras à plus courte ou plus longue chaîne et/ou les acides gras saturés non hydroxylés sont minoritaires ou absents. Les acides gras sont hydroxylés en bout de chaîne et peuvent posséder une ou deux hydroxylations supplémentaires en milieu de chaîne, ou d'autres modifications (insaturation, époxyde). Le polymère comporte des proportions variables en glycérol, en acides dicarboxyliques (α,ω -diFA), ainsi qu'en acides hydroxycinnamiques (souvent *p*-coumarate ou férulate ; Pollard *et al.*, 2008). À cette échelle également, il existe une grande diversité de compositions chimiques entre les organes et les espèces. La cutine des feuilles et des graines des *Brassicaceae* contient par exemple plus de 50% de α,ω -diFAs, alors que cette teneur est généralement inférieure à 5% (Molina *et al.*, 2006 ; Pollard *et al.*, 2008). A l'inverse, l'acide 10,16-dihydroxypalmitique (diOH-C16) est le monomère majoritaire des fruits de tomate et des fleurs d'*A. thaliana* (fig. 7F ; Panikashvili *et al.*, 2009 ; Girard *et al.*, 2012). Une autre différence importante concerne la teneur en acides hydroxycinnamiques, qui sont minoritaires dans la cutine des spermatophytes (<5%) mais dont la teneur est nettement supérieure dans la cutine

des autres embryophytes, notamment des bryophytes où elle peut être supérieure à 40% (fig. 7G ; Kong *et al.*, 2020).

Tout comme pour la subérine, le polyester de cutine est polymérisé par des liaisons ester entre les fonctions acides carboxyliques et hydroxyles des différents monomères. La présence de fonction hydroxyles en bout de chaîne des acides gras permet de former des polymères linéaires, alors les fonctions hydroxyles situées en milieu de chaîne ou sur d'autres monomères peuvent former des réticulations lorsqu'elles sont estérifiées (Fich *et al.*, 2016). Si la composition en monomères peut être mesurée via une dépolymérisation chimique totale du polymère, les questions encore ouvertes concernent la structure 3D de la cutine, et son interaction physique et chimique avec son environnement (Pollard *et al.*, 2008). Tout comme pour les autres polymères apoplastiques hydrophobes, des éléments de réponses sont apportés par des techniques de dépolymérisation partielle suivie d'analyse des oligomères libérés, ainsi que par des analyses en RMN ou en infra-rouge. Il a ainsi été montré que plus de 95 % des fonctions hydroxyles en bout de chaîne sont impliquées dans une liaison ester, alors que seulement 20 à 50 % des fonctions hydroxyles en milieu de chaîne le sont (Deshmukh *et al.*, 2003 ; Philippe *et al.*, 2016 ; Graça et Lamosa, 2010). Le taux d'estérification des fonctions hydroxyles affecte directement la réticulation du polymère. L'estérification des fonctions hydroxyles en milieu de chaîne abaisse notamment les interactions hydrophobes entre les chaînes aliphatiques et contraint les conformations du polymère. Une baisse du taux d'estérification, visible en RMN en mesurant le ratio entre les fonctions hydroxyles et méthylènes, déstructure le polymère, augmente les interactions hydrophiles et rend *in fine* la cuticule plus perméable (Isaacson *et al.*, 2009 ; Domínguez *et al.*, 2011 ; Serra *et al.*, 2012). Même si la structure exacte d'un polymère de cutine n'est pas directement observable, nous avons donc des outils pour en apprécier la nature. En revanche, les interactions physiques et/ou chimiques entre la cutine et les polysaccharides de la paroi restent plus énigmatiques. Des données suggèrent l'existence de liaisons covalentes entre les polymères de cutine et les polysaccharides (Tian *et al.*, 2008), alors que d'autres auteurs proposent davantage que la cutine interagit avec les pectines, avec ou sans liaison covalente (Jeffrey *et al.*, 2006 ; Lopez-Casado *et al.*, 2007 ; Philippe *et al.*, 2020a).

La cutine est un polymère apoplastique hydrophobe qui structure la cuticule, une barrière centrale dans l'adaptation des plantes à leurs contraintes environnementales. La diversité des compositions et des structures des différentes cutines et cuticules au sein des plantes reflète la diversité des fonctions associées à la cuticule, et les trajectoires évolutives de chaque taxon (Yeats et Rose, 2013). Par ses multiples fonctions, l'acquisition d'une cuticule a

été une adaptation majeure au cours de la terrestrialisation. Notamment, la colonisation des terres a pu se faire par la limitation et le contrôle des pertes passives en eau dans un environnement desséchant (Niklas *et al.*, 2017 ; Seale, 2020). Aussi, le fait que la cuticule reflète une partie des rayonnements UV, constitue une barrière contre les bio-agresseurs, et soit nécessaire à la différenciation des organes, a aussi permis de s'adapter aux contraintes terrestres (Yeats et Rose, 2013 ; Fürst-Jansen *et al.*, 2020). De multiples approches montrent que la cutine et la cuticule sont apparues chez les embryophytes. Des échantillons de cutine ont été analysés à partir de fossiles de plantes datant de 400 millions d'années (Taylor *et al.*, 2009 ; Fich *et al.*, 2016). Bien que certaines algues charophytes possèdent une couche lipidique à leur surface, il ne s'agit pas de cutine et de cuticule (Kondo *et al.*, 2016). Enfin, des analyses phylogénomiques montrent que des espèces représentatives des embryophytes possèdent des gènes orthologues de la voie de biosynthèse de la cutine et des cires cuticulaires, ainsi que de leur transport et leur régulation. Un tel réseau de gènes n'est pas ou peu retrouvé chez des espèces charophytes ou chlorophytes (Kong *et al.*, 2020 ; Renault *et al.*, 2019). Ainsi, avec la sporopollénine, la cutine est le deuxième polymère à avoir émergé avec les plantes terrestres et à avoir contribué à leur adaptation sur terre.

Objectifs de la thèse

L'émergence et la colonisation des plantes terrestres ont été accompagnées par l'établissement de barrières apoplastiques qui protègent les plantes des nombreuses contraintes de la vie hors de l'eau (de Vries et Archibald, 2018). Ces barrières sont établies par la biosynthèse de polymères apoplastiques hydrophobes. Ces polymères ont des compositions, localisations, régulations et propriétés variées, qui reflètent leur spécialisation fonctionnelle. Toutefois, ils partagent de nombreuses caractéristiques, particulièrement du point de vue de leur composition et de leur biosynthèse. Notamment, la cutine et la subérine ont une composition et une structure proche, et partagent beaucoup d'étapes enzymatiques et de familles géniques en commun dans leur biosynthèse (Philippe *et al.*, 2020b ; Pollard *et al.*, 2008). De plus, la présence d'unités phénoliques issues de la voie des phénylpropanoïdes est partagée entre les différents polymères. Cette voie métabolique est essentielle pour la biosynthèse de la lignine et de la sporopollénine, et dans une moindre mesure pour la subérine et la cutine (Boerjan *et al.*, 2003 ; Quilichini *et al.*, 2015 ; Pollard *et al.*, 2008). Plusieurs études fonctionnelles convergent vers le fait que des mécanismes de polymérisation puissent être similaires entre ces polymères,

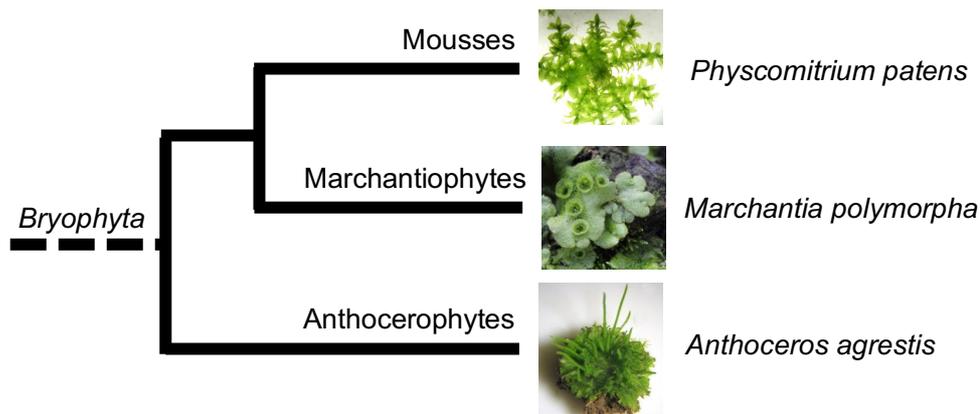


Figure 8 : Phylogénie des Bryophyta.

Les bryophytes forment un groupe monophylétique divisé en trois clades : les mousses, les marchantiophytes et les anthocérophytes. Il existe une espèce modèle dont le génome est séquencé pour chacun de ces clades : respectivement *Physcomitrium patens*, *Marchantia polymorpha* et *Anthoceros agrestis*.

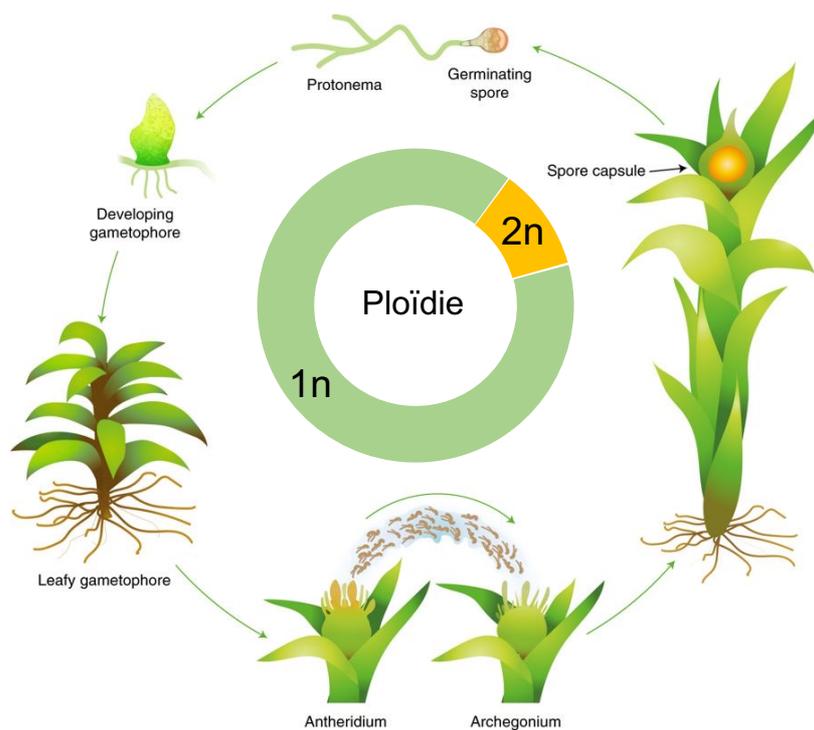


Figure 9 : Cycle de vie de la mousse *Physcomitrium patens*.

Le cycle est initié par la germination d'une spore haploïde (1n) qui développe un tissu filamenteux, le protonema, duquel émerge un gamétophore et des rhizoïdes. Les organes sexuels mâle et femelle, respectivement anthéridie et archégone, se développent sur les gamétophores. Après fécondation, l'archégone se transforme en sporophyte diploïde (2n), qui générera par méiose de nouvelles spores. Le stade dominant est représenté par le protonema et le gamétophore, tous deux haploïdes (1n). Adapté de Reski (2018).

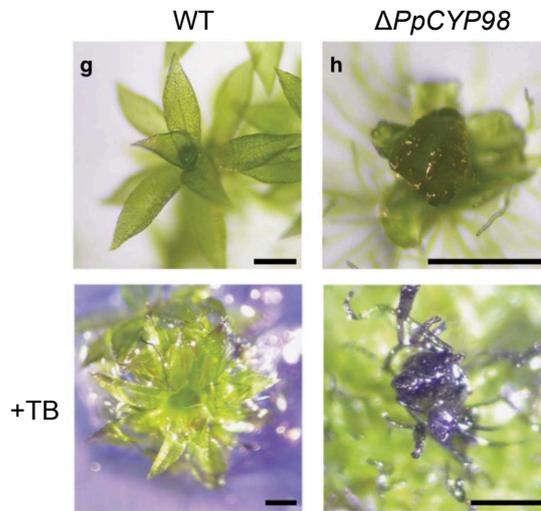


Figure 10 : Etude du gène *CYP98* chez *P. patens*.

La mutation du gène *PpCYP98* empêche le développement normal des gamétophores chez *P. patens*. Les lignées mutantes présentent une fusion d'organes et une perméabilité des tissus aériens, visible par une coloration au bleu de toluidine, des phénotypes caractéristiques d'un défaut de cuticule. Ce phénotype a été relié à l'impossibilité par la plante de synthétiser de l'acide caféique, un acide hydroxycinnamique nécessaire à la synthèse normale de la cutine chez *P. patens*. Échelle : 0,5 mm. D'après Renault *et al.* (2017a).

qui impliquent généralement la formation de liaisons ester ou éther (Ursache *et al.*, 2021 ; Bernards *et al.*, 2004 ; Rabbi *et al.*, 2020). Une idée émergente, soutenue par ces données biochimiques, génétiques et fonctionnelles, est que les polymères apoplastiques hydrophobes partagent une origine commune.

La majorité du travail sur les polymères apoplastiques a été réalisée sur des espèces modèles de spermatophytes, pour leur intérêt scientifique, agronomique ou industriel. Pourtant, étudier leur composition et leur biosynthèse dans les différents clades de plantes peut renseigner sur leur histoire évolutive. Dans cette perspective, l'étude des bryophytes a un intérêt scientifique pertinent grâce à leur position phylogénétique. Les espèces bryophytes actuelles ne sont pas les représentantes des premières plantes terrestres ni des « fossiles vivants », mais avec les angiospermes ou plus largement les spermatophytes, elles constituent les clades les plus éloignés des embryophytes (fig. 3 ; McDaniel, 2021). En d'autres mots, le premier ancêtre commun entre les bryophytes et les angiospermes vivait il y a environ 500 Ma lors de la terrestrialisation. Étudier et comparer les bryophytes avec les données accumulées dans d'autres espèces permet donc de renseigner sur ce qui est conservé ou non chez les embryophytes, et ainsi de savoir quand sont apparus certains caractères (Naramoto *et al.*, 2020). Les bryophytes constituent un groupe monophylétique subdivisé en trois clades : les mousses, les marchantiophytes et les anthocérophytes (fig. 8 ; Puttick *et al.*, 2018). Il existe une espèce modèle pour chacun de ces clades, respectivement *Physcomitrium patens* (anciennement *Physcomitrella patens*), *Marchantia polymorpha* et *Anthoceros agrestis*, pour lesquels nous disposons d'un génome de référence (Rensing *et al.*, 2008 ; Bowman *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2020) et de protocoles de transformation génétique (Lopez-Obando *et al.*, 2016 ; Kubota *et al.*,

2013 ; Frangedakis *et al.*, 2021). D'un point de vue expérimental, ces espèces présentent l'avantage d'avoir un cycle de vie court et majoritairement haploïde (fig. 9), ce qui facilite l'obtention de lignées génétiquement modifiées stables (Strotbek *et al.*, 2013). Les bryophytes sont ainsi devenues des modèles pertinents pour étudier des questions évolutives. Concernant l'investigation des polymères apoplastiques hydrophobes, les bryophytes ont également l'intérêt d'avoir une structure anatomique proche de celle retrouvée dans les fossiles de l'ère Paléozoïque (Taylor *et al.*, 2009). Comme la diversification et la spécialisation des polymères apoplastiques semble avoir suivi la diversification et la spécialisation anatomique des trachéophytes, il est concevable que les espèces bryophytes actuelles aient davantage conservé certains caractères associés aux barrières apoplastiques. Pour l'ensemble de ces raisons, mon laboratoire d'accueil s'intéresse à la voie de biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, notamment sous le prisme du métabolisme phénolique. Une première publication a montré, via l'étude fonctionnelle du gène *PpCYP98*, que la voie des phénylpropanoïdes est essentielle à la synthèse de précurseurs de cutine chez *P. patens* (fig. 10 ; Renault *et al.*, 2017a). L'implication de cette voie métabolique résonne avec le fait qu'en comparaison aux cutines des espèces trachéophytes, la cutine de *P. patens* et des bryophytes en général contient une proportion importante de molécules phénoliques, nécessaires à l'élaboration correcte de la cutine et de la cuticule (Renault *et al.*, 2017a ; Kriegshauser *et al.*, 2021 ; Kong *et al.*, 2020). Les travaux de thèse de Lucie Kriegshauser au laboratoire (2015-2018) ont depuis approfondi l'investigation de cette voie métabolique chez *P. patens*, et ont permis d'identifier un lien métabolique entre les voies des phénylpropanoïdes et des acides gras, dans la synthèse des précurseurs de cutine chez *P. patens*. Au cours de ma thèse, j'ai dans un premier temps souhaité poursuivre l'étude de la voie des phénylpropanoïdes chez les bryophytes. À travers l'étude fonctionnelle de gènes de la famille *CYP73*, j'ai notamment pu confirmer le rôle de cette voie dans le développement de la plante et la synthèse de la cutine, et élargir cette fonction aux bryophytes en général. J'ai ensuite contribué aux travaux menés par Lucie Kriegshauser, ce qui m'a permis d'approfondir au niveau biochimique la connexion entre les métabolismes phénoliques et lipidiques dans la biosynthèse de la cutine chez *P. patens*, et d'identifier vraisemblablement de nouveaux précurseurs de la cutine. Grâce à ces découvertes chez les bryophytes, au vu de la composition particulière de la cutine des bryophytes, et en me basant sur les connaissances accumulées chez des espèces modèles d'angiospermes, j'ai enfin mené des projets sur les mécanismes de polymérisation de la cutine chez *P. patens*. Ces projets appuient l'idée d'une origine commune des différents polymères apoplastiques, et participent à éclaircir la manière dont ils sont apparus et se sont spécialisés au cours de l'évolution.

Chapitre 1 :

Rôle de la voie des phénylpropanoïdes dans la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes

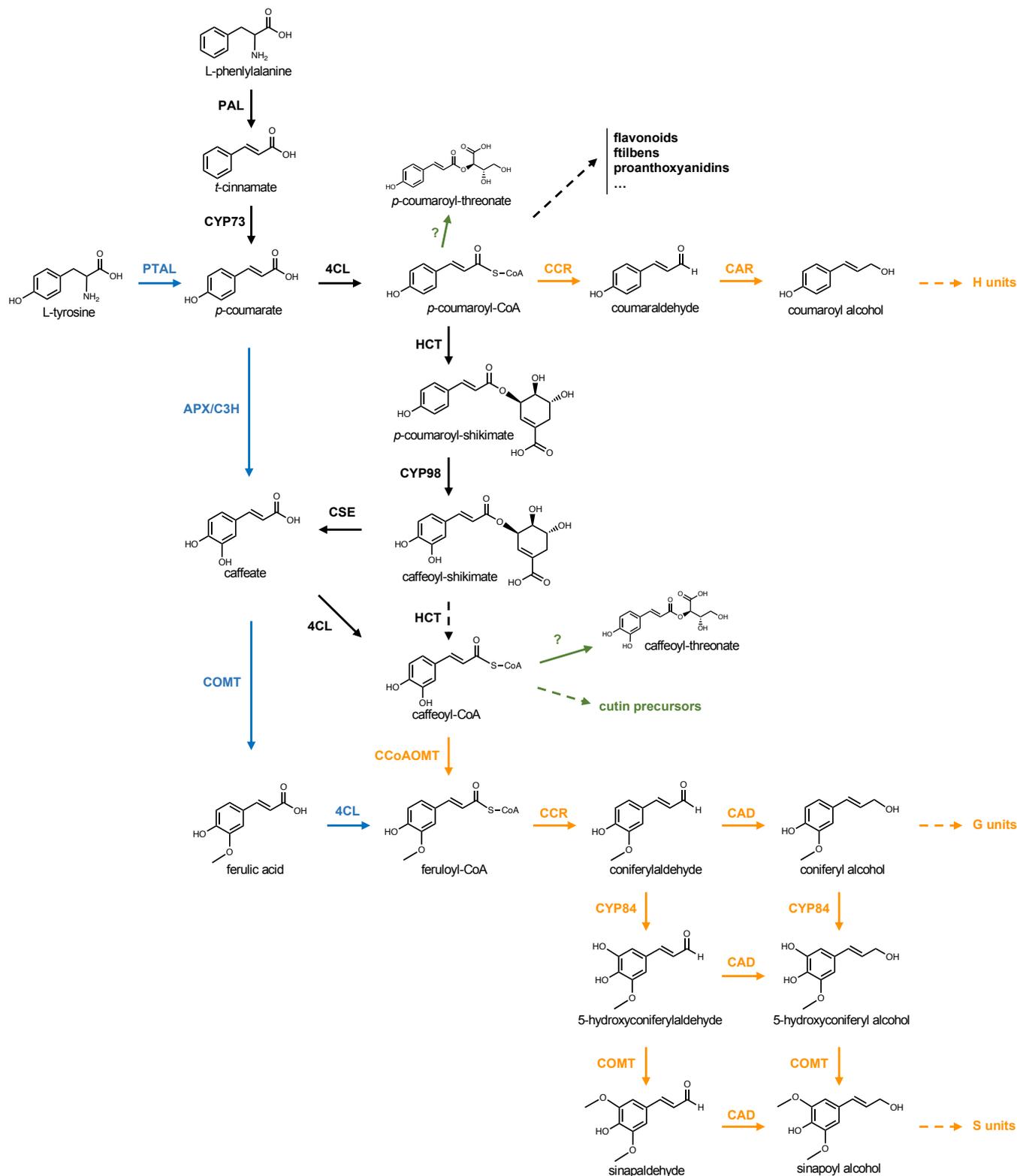


Figure 11 : Voie des phénylpropanoïdes.

La voie métabolique est représentée de son précurseur, la L-phénylalanine, jusqu'aux trois monolignols, précurseurs des unités H, G et S de la lignine. Les étapes en noir représentent la voie canonique conservée chez les embryophytes. Les étapes en orange correspondent à la synthèse des monolignols chez les trachéophytes depuis le *p*-coumaroyl-CoA et le caféoyl-CoA. La voie dite des acides libres, représentée en bleu, est notamment présente chez les monocotylédones. Les étapes en vert sont spécifiques de *P. patens*, d'après Renault *et al.* (2017a). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; PTAL : phénylalanine/tyrosine ammonia-lyase ; 4CL : 4-coumarate-CoA ligase ; HCT : hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transférase ; CSE : caféoyl-shikimate estérase ; APX : ascorbate peroxydase ; C3H : *p*-coumarate-3-hydroxylase ; COMT : caféate O-méthyltransférase ; CCoAOMT : caféoyl-CoA O-méthyltransférase ; CCR : cinnamoyl-CoA réductase ; CAD : cinnamaldéhyde déshydrogénase.

Voie des phénylpropanoïdes et polymères apoplastiques

La voie des phénylpropanoïdes

La voie des phénylpropanoïdes alimente des voies métaboliques attribuées au métabolisme primaire et spécialisé. Elle est en effet à l'origine de précurseurs de polymères structuraux essentiels, notamment la lignine, et d'une grande diversité de métabolites qui jouent un rôle dans les interactions des plantes avec leur environnement (Fraser et Chapple, 2011). Ainsi, environ 40% du carbone organique sur terre est fixé via la voie des phénylpropanoïdes, et 30% exclusivement via la lignine (Vogt, 2010). Cette voie spécifique aux plantes participe considérablement au métabolisme spécialisé des plantes, à travers des familles de molécules phénoliques solubles telles que les flavonoïdes, les stilbènes, les proanthocyanidines, les conjugués d'acides hydroxycinnamiques, etc. Chacune de ces familles regroupe une diversité importante de molécules, dont la présence peut être ubiquitaire chez les plantes, ou restreinte à certains clades spécifiques (Dixon *et al.*, 2002). La synthèse de ces composés en réponse à des stress biotiques et/ou abiotiques semble être partagée au sein des plantes. Les métabolites issus de la voie des phénylpropanoïdes peuvent effectivement être des filtres UV, des phytoalexines, et des molécules antioxydantes participant à la neutralisation du stress oxydatif (Vogt, 2010 ; Grace et Logan, 2002).

En amont de la voie des phénylpropanoïdes, la voie du shikimate produit les trois acides aminés aromatiques : le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Cette dernière, en plus d'être un acide aminé protéinogène, est le premier précurseur de la voie des phénylpropanoïdes (Fraser et Chapple, 2011). Le corps de la voie métabolique est présenté figure 11. La première étape enzymatique consiste en la désamination de la L-phénylalanine en acide *trans*-cinnamique par l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Le squelette phénylpropane (C6-C3) formé subit en aval de la voie des fonctionnalisations du cycle aromatique, et une réduction de la fonction acide carboxylique. La deuxième étape de la voie est l'hydroxylation du cycle aromatique en position *para* par une enzyme de type cinnamate 4-hydroxylase (C4H), appartenant à famille 73 des cytochromes P450 (CYP73). L'acide *p*-coumarique formé est ensuite métabolisé en *p*-coumaroyl-CoA par une enzyme 4-coumarate-CoA ligase (4CL), qui forme une liaison thioester via une réaction requérant de l'ATP. Le *p*-coumaroyl-CoA se situe à un carrefour métabolique à partir duquel plusieurs branches divergent (fig. 11). Une branche conservée de la voie des phénylpropanoïdes chez les trachéophytes alimente la biosynthèse des

précurseurs de lignine – les monolignols. Pour la plupart des plantes, l'hydroxylation supplémentaire du cycle aromatique en position *meta* a lieu non pas sur l'acide *p*-coumarique libre, mais estérifié à une molécule de shikimate. L'enzyme hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transférase (HCT), qui appartient à la famille des BAHD acyltransférases, catalyse l'estérification des deux molécules en *p*-coumaroyl-shikimate. Un deuxième CYP, appartenant à la famille CYP98 catalyse l'hydroxylation du *p*-coumaroyl-shikimate en caféoyl-shikimate (activité C3'H pour *p*-coumaroyl-shikimate 3'-hydroxylase). Bien que difficile à prouver expérimentalement, il est proposé que l'utilisation d'un ester de shikimate comme intermédiaire permet la mise en place d'une boucle de régulation. En effet, le shikimate est un intermédiaire central de la voie du même nom, qui découle de la photosynthèse et alimente à la fois la synthèse des protéines et de la lignine. L'activité C3'H est l'étape limitante dans la synthèse des unités G et S, qui composent plus de 95% de la lignine (Anterola et Lewis, 2002). Connecter cette étape cruciale à la concentration intracellulaire de shikimate permettrait de maintenir une concentration toujours suffisante en acides aminés aromatiques pour la synthèse des protéines, et d'alimenter la synthèse de lignine lorsque le métabolisme photosynthétique est suffisant (Albert et Ehrling, 2012 ; Dixon et Barros, 2019). Plusieurs voies possibles permettent ensuite d'aboutir au caféoyl-CoA, le précurseur commun des unités G et S. Des données *in vitro* montrent que l'enzyme HCT est bifonctionnelle et peut assurer la déconjugaison du caféoyl-shikimate en caféoyl-CoA (Hoffmann *et al.*, 2003 ; Vanholme *et al.*, 2013). Alternativement, l'enzyme caféoyl-shikimate estérase (CSE) catalyse le clivage du caféoyl-shikimate, libérant de l'acide caféique activé à nouveau en caféoyl-CoA par une enzyme 4CL (Vanholme *et al.*, 2013). Une autre voie parallèle court-circuite la voie des esters de shikimate par l'hydroxylation directe de l'acide *p*-coumarique en acide caféique, alors également activé en caféoyl-CoA par une enzyme 4CL. L'enzyme responsable de cette activité *p*-coumarate-3-hydroxylase (C3H) a récemment été identifiée et caractérisée : il s'agit d'une ascorbate peroxydase (APX) soluble bifonctionnelle, ayant l'activité APX et l'activité C3H (APX/C3H ; Barros *et al.*, 2019). Le flux métabolique empruntant cette voie vers la synthèse de lignine est minoritaire chez les dicotylédones, mais est majoritaire chez les monocotylédones, dont les génomes de certaines espèces ont perdu le gène *CSE*. S'il est difficile d'étudier *in planta* l'activité de déconjugaison d'HCT à cause du rôle essentiel de la première activité de l'enzyme, l'analyse de mutants de *cse* et *c3h* chez *A. thaliana* a montré que ces deux voies contribuent à la synthèse de lignine. Par ailleurs, Barros *et al.* (2019) ont montré que le mutant double *cse/c3h* homozygote est létal, indiquant qu'*in planta*, la deuxième activité d'HCT n'est pas présente ou insuffisante pour compenser les autres voies. Le caféoyl-CoA subit une série de décorations

supplémentaires pour aboutir aux monolignols principaux. L'enzyme caféoyl-CoA O-méthyltransférase (CCoAOMT) méthyle le groupement hydroxyle en position *meta* pour former le féruloïl-CoA. Les enzymes cinnamoyl-CoA réductase (CCR) et cinnamaldéhyde déshydrogénase (CAD) réduisent ensuite le féruloïl-CoA en coniféraldéhyde et en alcool coniférylique, respectivement. Les deux mêmes enzymes réduisent selon les mêmes activités enzymatiques les autres esters de CoA en monolignols correspondants. La synthèse de l'alcool sinapylique nécessite une hydroxylation et une méthylation supplémentaire en position 5 du cycle aromatique. La 5-hydroxylation est catalysée par le troisième CYP de la voie des phénylpropanoïdes qui appartient à la famille 84. La méthylation est catalysée par l'enzyme caféate O-méthyltransférase (COMT). Ces deux dernières étapes peuvent avoir lieu à partir du coniféraldéhyde ou de l'alcool coniférylique. Chez les monocotylédones, l'enzyme COMT peut également méthyler directement le caféate libre en férulate, activé ensuite en féruloïl-CoA par une 4CL. Par ailleurs, les monocotylédones possèdent également des PTALs, des PALs possédant une deuxième activité tyrosine ammonia-lyase (TAL). Cette activité TAL permet d'alimenter la voie des phénylpropanoïdes à partir de la tyrosine, contournant de fait l'étape C4H. Cela permet vraisemblablement de conférer une plasticité accrue à la synthèse de lignine (Barros *et al.*, 2016). Ainsi, la voie dite cytosolique (PTAL, C3H, COMT) alimenterait environ 50% de la synthèse de lignine chez *Brachypodium distachion* (Barros *et al.*, 2016 et 2019). La voie des phénylpropanoïdes a par ailleurs un niveau d'organisation supramoléculaire, via l'interaction d'enzymes solubles avec un ou plusieurs CYPs ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique. Cette organisation en métabolon représente certainement un niveau supplémentaire de régulation de la voie (Achnine *et al.*, 2004 ; Bassard *et al.*, 2012).

La voie des phénylpropanoïdes alimente ainsi principalement la synthèse de lignine chez les plantes vasculaires. Les activités C4H et C3'H sont les étapes limitantes qui respectivement dirigent le flux total de la voie, et celui engagé vers la synthèse de lignine (Anterola et Lewis, 2002). Situé entre ces deux étapes, le *p*-coumaroyl-CoA est le précurseur commun de la grande diversité de familles de composés phénoliques que synthétisent les plantes vasculaires (fig. 11 ; Vogt, 2010). Chez les bryophytes, ces familles de composés sont souvent absentes, mais d'autres voies de biosynthèse aboutissent à la formation d'autres molécules. *M. polymorpha* synthétise par exemple des auronidines, une classe de flavonoïdes propres aux marchantiophytes (Berland *et al.*, 2019). *P. patens* synthétise des esters de thréonate (*p*-coumaroyl-thréonate et caféoyl-thréonate), des molécules phénoliques solubles qui ont certainement les mêmes fonctions que les familles plus connues chez les plantes vasculaires (Renault *et al.*, 2017a).

Origine et implication dans les polymères apoplastiques hydrophobes

Bien que certaines étapes soient absentes chez certains clades ou espèces, la voie des phénylpropanoïdes jusqu'à la synthèse des monolignols est spécifique aux trachéophytes. Cependant, le début de la voie, de la L-phénylalanine jusqu'au caféoyl-CoA, semble conservée chez les embryophytes. Plusieurs études phylogénomiques ont recherché la présence d'orthologues des gènes de la voie des phénylpropanoïdes chez des algues chlorophytes ou charophytes, pour remonter à leur origine commune et comprendre l'évolution de cette voie métabolique (de Vries *et al.*, 2017, 2021 ; Renault *et al.*, 2019). Certains gènes semblent être apparus dans l'ancêtre commun des embryophytes et de certains clades charophytes plus ou moins éloignés. Toutefois, il s'agit davantage de familles apparentées qui ont subi des radiations spécifiques dans les lignées concernées, que d'orthologues stricts. Par ailleurs, ces génomes ne contiennent pas d'homologues des deux *CYP* centraux de la voie : *CYP73* et *CYP98*, dont l'origine commune au sein de la super-famille *CYP71* remonte aux embryophytes (de Vries *et al.*, 2021). Ainsi, si des composés phénoliques à priori caractéristiques de la voie des phénylpropanoïdes peuvent être détectés dans certaines algues charophytes (Goiris *et al.*, 2014), ils proviennent probablement d'évolutions convergentes de voies de biosynthèse, mais ne sont pas synthétisés par la voie des phénylpropanoïdes *stricto sensu* caractérisée et conservée chez les embryophytes (de Vries *et al.*, 2021 ; Renault *et al.*, 2019).

La voie des phénylpropanoïdes joue un rôle central dans la synthèse des biopolymères structuraux. Chez les trachéophytes, ce rôle se manifeste principalement par la synthèse de lignine, entièrement issue de cette voie métabolique. Les autres polymères apoplastiques hydrophobes contiennent également des proportions variables d'acides hydroxycinnamiques incorporés aux polymères. C'est notamment le cas de la sporopollénine et de la subérine, qui contiennent principalement de l'acide *p*-coumarique et férulique, respectivement (Pollard *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2019). La cutine peut contenir de faibles quantités d'acide férulique. L'enzyme impliquée dans son intégration au polymère a été identifiée chez *A. thaliana*, il s'agit de l'enzyme DCF (pour « Deficient in Cutin Ferulate »). Cette enzyme est une HYDROXYCINNAMOYL-CoA:ω-HYDROXYACID O-HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE (HHT), de la famille des BAHD, qui transfère le férulate du féruloyl-CoA à un acide gras hydroxylé, formant une liaison ester entre la fonction acide carboxylique et hydroxyle des deux molécules, respectivement (Rautengarten *et al.*, 2012). La présence de ces unités phénoliques dans le polymère de cutine ne semble toutefois pas essentielle, au vu du

phénotype du mutant *dcf* qui ne présente aucun défaut macroscopique particulier. La proportion d'acides hydroxycinnamiques est bien supérieure dans la cutine des espèces bryophytes (Kong *et al.*, 2020). L'étude fonctionnelle du gène *CYP98* chez *P. patens* a montré une conservation fonctionnelle de cette étape enzymatique chez les embryophytes, et le rôle de cette voie dans la biosynthèse du polymère cuticulaire de *P. patens*. En effet, l'abolissement de la capacité à synthétiser et intégrer de l'acide caféique dans la cutine provoque un phénotype développemental fort lié à un défaut de formation de la cuticule (Renault *et al.*, 2017a). A l'instar de la lignine qui contient principalement des unités G et S dont le cycle aromatique est di- ou tri-substitué, la présence de deux hydroxylations sur le cycle aromatique des acides hydroxycinnamiques est donc aussi essentielle dans la synthèse et l'assemblage correct de la cutine chez *P. patens*. Un premier objectif de ma thèse est d'approfondir l'étude de la voie des phénylpropanoïdes chez les bryophytes, afin de mieux documenter l'évolution de la voie chez les embryophytes, et sa fonction chez les bryophytes. Je me suis ainsi intéressé à caractériser la première étape précoce et limitante de la voie, l'activité C4H, par l'étude fonctionnelle de la famille *CYP73* dans plusieurs espèces bryophytes. J'ai également contribué à la poursuite des travaux de thèse de Lucie Kriegshauser, via la caractérisation fonctionnelle et biochimique des homologues *HCT* et *FHT* chez *P. patens*.

Étude de la famille CYP73 chez les bryophytes

Introduction

Les CYP73s sont une famille de cytochrome P450, des monooxygénases héminiques qui catalysent des réactions irréversibles, généralement situées aux étapes limitantes des voies métaboliques. Ces enzymes présentes dans tous les règnes du vivant possèdent un site catalytique très conservé, ainsi qu'un domaine N-terminal, responsable de leur accrochage au réticulum endoplasmique chez les eucaryotes (Hansen *et al.*, 2021). Les CYPs sont impliquées dans la fonctionnalisation des molécules, un prérequis à une expansion et une diversification accrue du répertoire métabolique au travers d'autres modifications (e.g. méthylation, glycosylation). L'émergence d'une nouvelle famille de CYP marque ainsi souvent l'apparition d'une nouvelle classe de molécules (Mizutani et Ohta, 2010). De fait, l'apparition de la famille CYP73 chez les embryophytes est associée à l'émergence de la voie des phénylpropanoïdes et du métabolisme phénolique associé (de Vries *et al.*, 2021). Les premières CYP73s ont été caractérisées chez le haricot mungo (*Vigna radiata* ; Mizutani *et al.*, 1993), la luzerne (*Medicago sativa* ; Fahrendorf et Dixon, 1993), et le topinambour (*Helianthus tuberosus* ; Werck-Reichhart *et al.*, 1993). Depuis, toutes les CYP73s caractérisées ont une activité C4H, et sont très spécifiques pour le *trans*-cinnamate, avec des K_M inférieurs à 10 μ M (Ehlting *et al.*, 2006). *A. thaliana* possède une copie unique de CYP73 – CYP73A5 – identifiée dans la série de mutants *ref* pour « reduced epidermal fluorescence » (Fraser et Chapple, 2011). Le mutant *ref3* présente ainsi un phénotype associé à l'altération de la voie des phénylpropanoïdes : une diminution de la teneur en lignine associée à une modification du rapport S/G, une baisse des concentrations en composés phénoliques solubles dans les feuilles et en tanins dans les graines (Schillmiller *et al.*, 2009). Le même phénotype est observé chez d'autres espèces de plantes qui sous-expriment un gène CYP73 par ARN interférent (RNAi ; Sewalt *et al.*, 1997 ; Blee *et al.*, 2001 ; Reddy *et al.*, 2005 ; Bjurhager *et al.*, 2010).

La famille CYP73 est représentée par au maximum quatre copies dans les génomes de plantes (Ehlting *et al.*, 2006). La faible radiation des familles CYPs est considérée comme représentatif d'une fonction essentielle (Mizutani et Ohta, 2010). Une duplication a eu lieu chez un ancêtre commun des spermatophytes, formant deux sous familles de CYP73 : les classes I et II. Les CYP73s de classe I sont conservées dans tous les génomes de plantes avec au moins une copie, alors que la classe II a été perdue chez une partie des gymnospermes et chez les

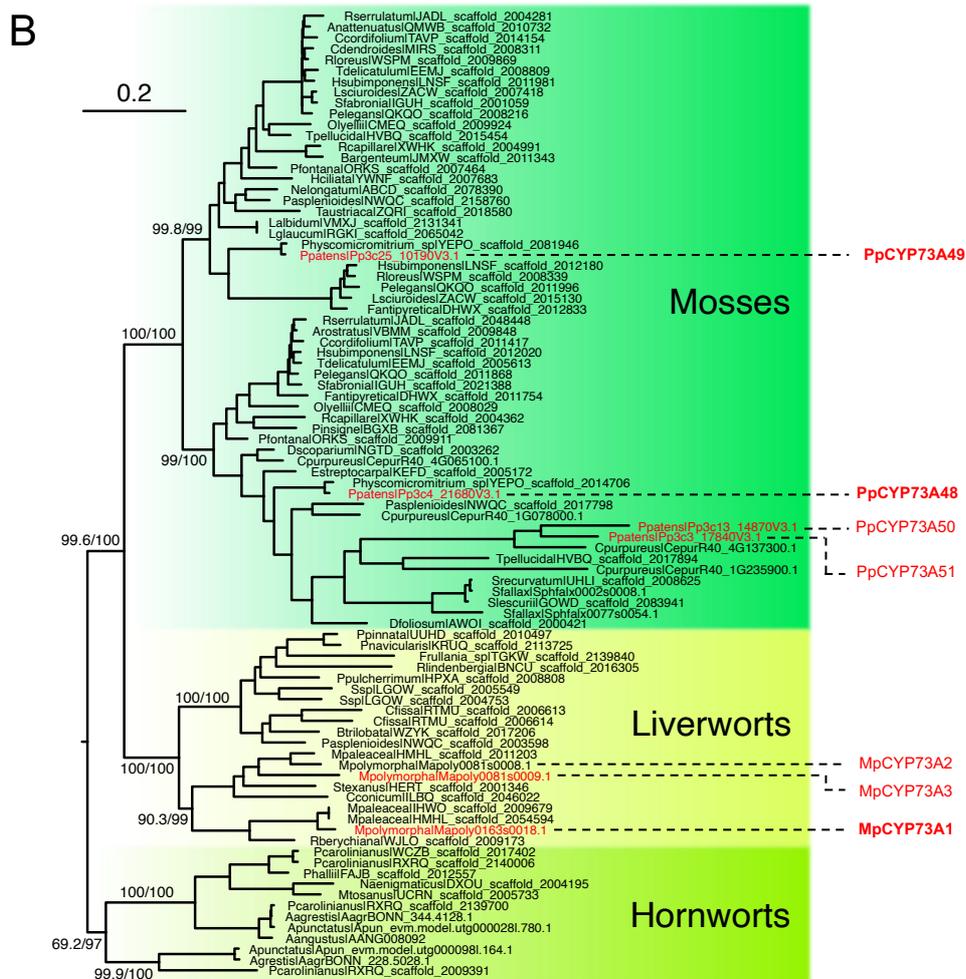
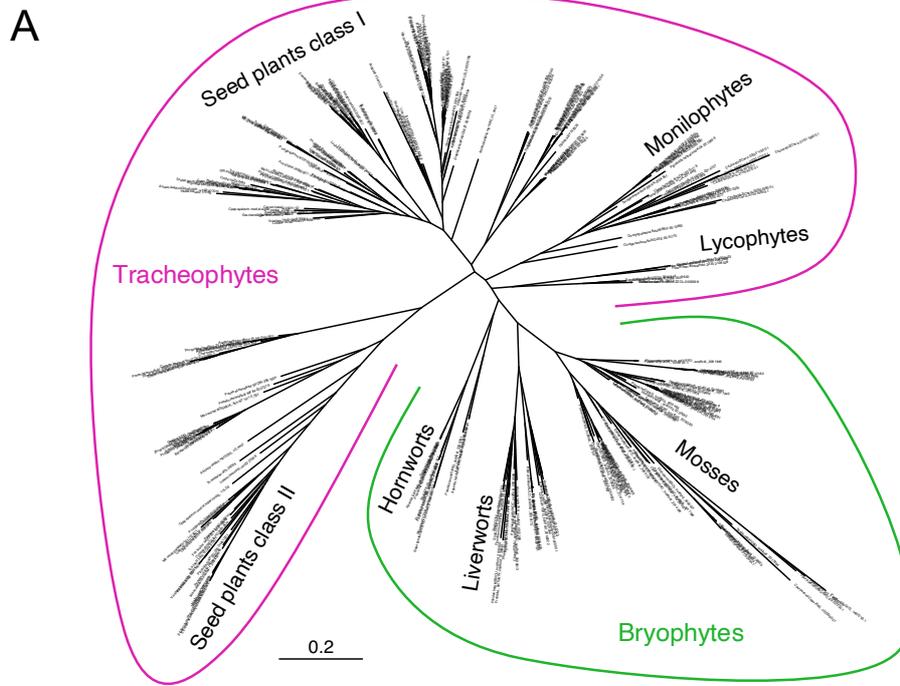


Figure 12 : Histoire évolutive de la famille CYP73 chez les embryophytes.

A : Arbre phylogénétique reconstruit à partir de 273 séquences nucléotidiques de CYP73s d'embryophytes. L'arbre est non enraciné. **B** : Sous-arbre correspondant aux CYP73s de bryophytes, issu de l'arbre visible en A. L'arbre a été enraciné par la méthode du midpoint. Les quatre isoformes de la mousse *P. patens* et les trois isoformes de l'hépatique *M. polymorpha* sont indiquées. Celles pour lesquelles des mutants ont été générés sont marquées en gras.

Brassicaceae (Ehlting *et al.*, 2006 ; Renault *et al.*, 2017b ; Hansen *et al.*, 2021). Plusieurs données suggèrent une implication des formes de classe I dans le métabolisme primaire (*i.e.* la lignine), et des formes de classe II dans un métabolisme plus spécialisé en réponse aux stress (*e.g.* flavonoïdes). Les CYP73s de classe I sont davantage exprimées dans les tissus vasculaires, et sont soumises à une forte sélection négative. A l'inverse, les formes de classe II sont plus exprimées en réponse à des stress, et subissent une sélection négative relaxée (Shi *et al.*, 2010 ; Renault *et al.*, 2017b). Si la duplication menant à l'apparition de ces deux classes de CYP73 a bien eu lieu après la divergence des bryophytes et des trachéophytes, toutes les espèces embryophytes possèdent un ou plusieurs gènes CYP73s (de Vries *et al.*, 2021). D'autres événements de duplication chez les bryophytes ont aussi formé plusieurs sous-famille CYP73s, dont le rôle biologique reste à élucider. A ce jour, une enzyme CYP73 a été caractérisée biochimiquement chez *P. patens* (Renault *et al.*, 2017b), et deux chez *A. agrestis* (Wohl et Petersen, 2020). Ces trois enzymes CYP73s possèdent l'activité canonique C4H. L'étude fonctionnelle de cette famille chez les bryophytes menée ici vise à étendre l'étude de cette étape fondamentale de la voie des phénylpropanoïdes aux bryophytes, et d'éclairer le rôle de cette voie dans l'ensemble des embryophytes.

Résultats

La famille CYP73 forme un clade monophylétique chez les embryophytes

Afin d'appréhender l'histoire évolutive de la famille CYP73 chez les plantes et son origine, un arbre phylogénétique a été réalisé à partir d'un jeu de séquences homologues au CYP73A5 d'*A. thaliana* (fig. 12A). Comme rapporté dans d'autres études (Ehlting *et al.*, 2006 ; Renault *et al.*, 2017b ; de Vries *et al.*, 2021), des séquences homologues sont identifiées dans tous les génomes d'espèces embryophytes, représentatives de chaque clade, mais aucune séquence homologue n'est identifiée dans les génomes d'espèces charophytes et chlorophytes. La famille CYP73 forme ainsi un clade monophylétique apparu chez un ancêtre commun des embryophytes, c'est à dire lors de la terrestrialisation. Une duplication du gène CYP73 a eu lieu avant la divergence des spermatophytes, formant deux clades chez ces espèces (fig. 12A ; Ehlting *et al.*, 2006 ; Renault *et al.*, 2017b). Une analyse plus précise de la phylogénie des CYP73s chez les bryophytes indique sa conservation dans les trois grands groupes (mousses, marchantiophytes et anthocérophytes). Cette analyse met également en évidence une diversité de la famille CYP73 dans ce groupe de plantes terrestres non-vasculaires, en particulier chez les mousses où une duplication précoce est observée (Fig. 12B) D'autres duplications

ponctuelles ont parfois eu lieu au cours de l'évolution des bryophytes. Ainsi, *P. patens* possède quatre copies *CYP73s* : *PpCYP73A48*, *PpCYP73A49*, *PpCYP73A50* et *PpCYP73A51*, les deux dernières étant issues d'une duplication en tandem. De même *M. polymorpha* possède trois copies *CYP73s* : *MpCYP73A1*, *MpCYP73A2* et *MpCYP73A3* (fig. 12B). Afin d'étudier, le rôle de la famille CYP73 chez les bryophytes, une étude fonctionnelle a été conduite chez *P. patens* et *M. polymorpha*, deux espèces représentatives de deux clades bryophytes, pour lesquelles il existe des protocoles de transformation génétique utilisés au laboratoire. Avant de sélectionner des gènes candidats pour générer des mutants KO, les profils d'expression et les propriétés catalytiques des différentes isoformes CYP73s ont d'abord été étudiés.

Les protéines PpCYP73A48 et PpCYP73A49 ont une activité C4H

Le profil d'expression des quatre copies *CYP73s* de *P. patens* a été analysé grâce aux données transcriptomiques (i.e. RNA-Seq) disponibles dans la base de données CoNekT (fig 13A ; Proost et Mutwill, 2018). Les gènes *PpCYP73A48* et *PpCYP73A49* sont de loin les plus exprimés, tous organes confondus. *PpCYP73A48* est majoritairement exprimé dans le protonema et le chloronema, les tissus filamenteux dépourvus de cuticule, tandis que *PpCYP73A49* est majoritairement exprimé dans les gamétophores et les sporophytes, les organes aériens qui synthétisent de la cuticule. Les deux copies sont toutefois exprimées dans les gamétophores et les sporophytes, et peuvent donc participer à la biosynthèse de la cutine et de la cuticule de façon redondante. Contrairement au gène *PpCYP73A50* qui n'est exprimé dans aucun des organes considérés, l'expression de *CYP73A51* est détectée, quoiqu'à de faibles niveaux, dans certains tissus (fig. 13A). Il a donc été décidé de poursuivre l'analyse fonctionnelle uniquement sur les trois gènes *PpCYP73A48*, *PpCYP73A49* et *PpCYP73A51*.

Pour savoir si les CYP73s candidats de *P. patens* possèdent l'activité C4H canonique décrite chez les homologues de trachéophytes, les protéines PpCYP73A48, PpCYP73A49 et PpCYP73A51 ont été exprimées de manière hétérologue en levure. L'activité sur le *t*-cinnamate a été mesurée à partir de microsomes purifiés qui contiennent les protéines ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Parmi les trois protéines étudiées, seules PpCYP73A48 et PpCYP73A49 catalysent la conversion du *t*-cinnamate en *p*-coumarate (fig. 13B). A partir de ce substrat, l'activité catalysée par l'isoforme CYP73A51 n'a pas pu à ce stade être identifiée.

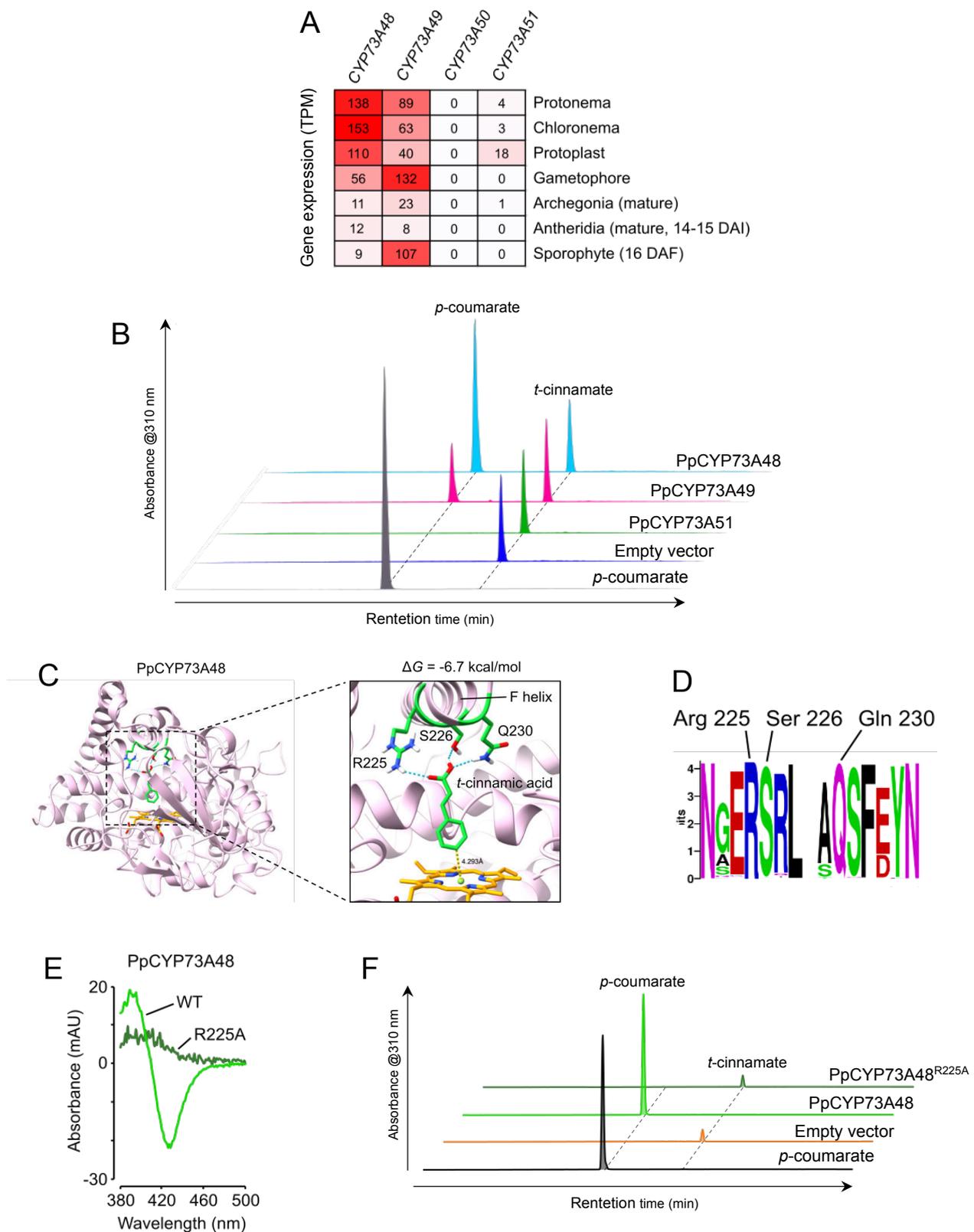


Figure 13 : Profil d'expression et enzymologie des CYP73s de *P. patens*.

A : Heatmap du niveau de transcription des gènes *CYP73s* dans différents organes de *P. patens*, exprimé en transcrits par million (TPM). Les données sont issues de la base de données RNA-seq CoNekT (Proost et Mutwill, 2018). **B** : Activité enzymatique des trois isoformes PpCYP73s exprimées selon les données de RNA-seq visibles en A. L'activité cinnamate 4-hydroxylase a été mesurée *in vitro* à partir de 1 pmole d'enzymes contenues dans des microsomes de levures génétiquement transformées. Seules les isoformes PpCYP73A48 et PpCYP73A49 sont capables de convertir le *t*-cinnamate en *p*-coumarate. **C** : Modélisation de la structure tri-dimensionnelle de la protéine PpCYP73A48 et docking du substrat *t*-cinnamate dans son site actif. La pose du *t*-cinnamate associée à la plus faible énergie libre (-6.7 kcal/mol) est représentée. Dans cette pose, trois résidus – R225, S226 et Q230 – interagissent avec la fonction carboxylique du *t*-cinnamate via des liaisons hydrogène et orientent le cycle aromatique vers l'hème à une distance compatible avec une hydroxylation de la position *para*. **D** : Les trois résidus identifiés dans les expériences de « docking » sont conservés au sein des séquences de la famille CYP73 chez les embryophytes. **E** : Spectre de type I consécutif à la fixation du *t*-cinnamate dans le site actif des protéines PpCYP73A48 (WT) et PpCYP73A48^{R225A}. **F** : Activité *t*-cinnamate 4-hydroxylase *in vitro* des protéines PpCYP73A48 (WT) et PpCYP73A48^{R225A}. Les activités ont été réalisées avec 5 pmoles d'enzymes.

La conservation de l'activité C4H des CYP73 repose sur la conservation d'un résidu arginine essentiel

Afin de comprendre plus en détail les déterminants de l'activité C4H des CYP73, une analyse structurale de CYP73A48 a été entreprise par modélisation de la structure 3D par homologie. La structure obtenue a ensuite servi pour des expériences de « docking » *in silico* du substrat, le *t*-cinnamate. Cette expérience a révélé que trois résidus du site actif du CYP73A48 peuvent établir des liaisons hydrogène avec la fonction carboxylique du *t*-cinnamate (fig. 13C). En particulier, le résidu arginine (R225) agit comme une poignée maintenant le substrat dans une position compatible avec une attaque de la position 4 du cycle aromatique par le noyau ferrique de l'hème. En utilisant l'outil de visualisation Weblogo, nous observons que cette arginine est rigoureusement conservée dans les 273 séquences de CYP73 utilisées pour l'analyse phylogénétique (fig. 13D). Afin de confirmer les prédictions issues des analyses de « docking », une version mutante de CYP73A48 dans laquelle l'arginine225 a été substituée par une alanine (CYP73A48^{R225A}) a été produite en levure. L'analyse du spectre de type I consécutif à la fixation du *t*-cinnamate dans le site actif a révélé une perte totale de cette capacité dans la protéine CYP73A48^{R225A} (fig. 13E), ce qui s'est traduit par une absence totale de conversion du *t*-cinnamate en *p*-coumarate *in vitro* (fig. 13F). Ces résultats permettent de confirmer expérimentalement les analyses structurales *in silico*, et suggèrent que l'émergence et la conservation de l'activité C4H des CYP73s reposent, du moins en partie, sur la conservation de résidus clés, en particulier l'arginine 225.

PpCYP73A48 et *PpCYP73A49* sont exprimées dans le protonema et les gamétophores

L'analyse *in vitro* et *in silico* des propriétés catalytiques des CYP73s candidats de la mousse *P. patens* a permis d'identifier deux isoformes, CYP73A48 et CYP73A49, ayant une activité canonique C4H. L'analyse fonctionnelle des deux gènes correspondants a donc été poursuivie *in planta*. Dans un premier temps, et afin de connaître plus précisément la localisation tissulaire de l'expression de ces deux gènes, des lignées *knock-in PpCYP73:uidA* ont été générées par recombinaison homologe. Les colorations GUS de ces lignées montrent que le gène *PpCYP73A48* est exprimé à la base des gamétophores – principalement dans la tige et dans une moindre mesure dans les phyllides – ainsi que dans le protonema. Le gène *PpCYP73A49* est également exprimé dans le protonema et à la base des gamétophores, mais aussi à l'apex des gamétophores, le lieu de biosynthèse de la cutine et de la cuticule (fig. 14A).

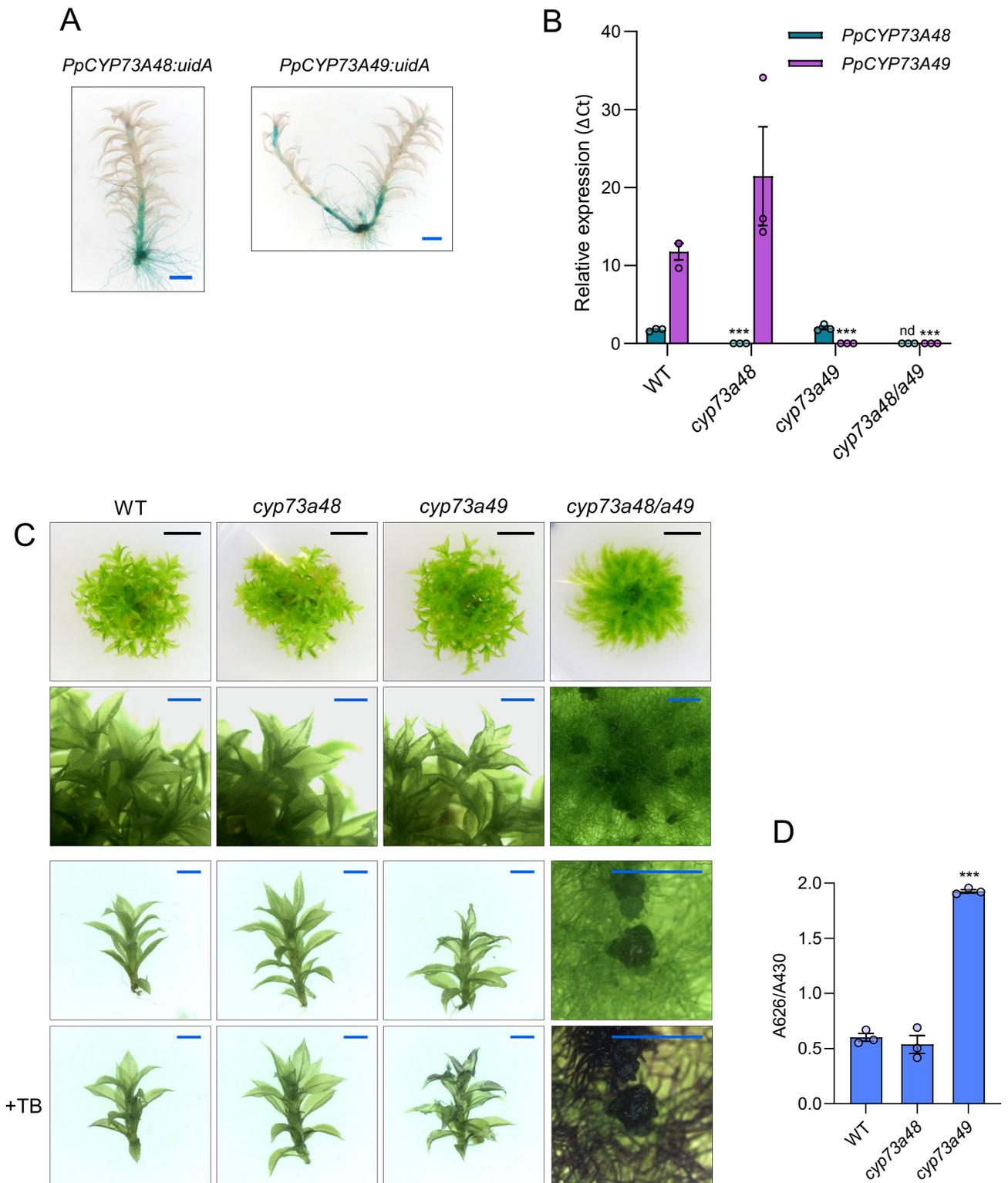


Figure 14 : Investigation de la fonction biologique de *PpCYP73A48* et *PpCYP73A49*.

A : Profil de coloration GUS dans les gamétophores des lignées *PpCYP73A48:uidA* et *PpCYP73A49:uidA*. **B** : Niveaux d'expression des gènes *PpCYP73s* mesurés par RT-qPCR dans les gamétophores de plantes WT, *cyp73a48*, *cyp73a49* et *cyp73a48/a49*. **C** : Phénotype des colonies et gamétophores des lignées sauvages et mutantes. Le niveau de perméabilité des gamétophores a été évalué par coloration au bleu de toluidine (TB). **D** : Niveau de perméabilité des gamétophores mesuré par le ratio d'absorbance A626/A430 après coloration au bleu de toluidine. Échelles : noire 5 mm ; bleue 1 mm. Les données représentent la moyenne de trois lignées indépendantes \pm l'erreur standard. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. nd : non détecté.

Les mêmes observations sont obtenues dans trois et deux lignées indépendantes, pour les lignées *PpCYP73A48:uidA* et *PpCYP73A49:uidA*, respectivement (annexe 1).

L'activité CYP73/C4H est nécessaire au développement correct de *P. patens*

Des lignées *knock-out* (KO) ont ensuite été générées par recombinaison homologue pour comprendre les fonctions des *CYP73s*, et par extension de l'activité C4H, dans la mousse. Des mutants simples (*cyp73a48* et *cyp73a49*) et doubles (*cyp73a48/a49*) ont été générés afin d'appréhender le rôle individuel et/ou redondant des deux gènes. Trois lignées indépendantes ont été obtenues pour chaque génotype. Le niveau d'expression des deux gènes a d'abord été mesuré par RT-qPCR dans les gamétophores des plantes WT et KO afin de confirmer les données RNA-Seq, de vérifier l'absence de transcrite dans les lignées KO, et de savoir si la déficience dans une isoforme induisait une compensation transcriptionnelle chez l'autre isoforme. Le gène *PpCYP73A49* est plus exprimé que le gène *PpCYP73A48* dans les gamétophores des plantes WT (fig. 14B), ce qui corrobore les données RNA-Seq (fig. 13A). L'expression des deux gènes étudiés est bien abolie dans les mutants simples et doubles correspondants. Dans les mutants simples, l'abolition de l'expression d'une copie n'entraîne pas de sous-expression ou de sur-expression significative de la deuxième isoforme par rapport au WT. Il n'y a donc pas de phénomène compensatoire au niveau transcriptionnel dans ces lignées.

L'impact de la déficience des activités CYP73 a dans un premier temps été observée à l'échelle macroscopique sur le développement des plantes. Les lignées *cyp73a48* ne présentent pas de phénotype observable à cette échelle, tant au niveau des colonies entières qu'au niveau des gamétophores individuels (fig. 14C). Alors que le développement des lignées *cyp73a49* semble de prime abord similaire aux plantes WT, une inspection minutieuse révèle que les phyllides des gamétophores sont légèrement repliées sur elles-mêmes, notamment à l'apex des gamétophores (fig. 14C). Le développement des gamétophores dans les lignées double KO *cyp73a48/a49* est stoppé très tôt, dès l'initiation des bourgeons sur le protonema. La croissance du protonema n'est en revanche pas affectée chez le mutant double *cyp73a48/a49*, voire est stimulée (fig. 14C). Ce phénotype macroscopique est identique à celui du mutant *cyp98*, impacté plus en aval dans la voie des phénylpropanoïdes (fig. 10). Cette voie métabolique étant impliquée dans la biosynthèse de la cutine chez *P. patens*, les propriétés hydrophobes de la cuticule ont été étudiées par le niveau de perméabilité des gamétophores au bleu de toluidine (TB), un colorant hydrophile dont la vitesse de pénétration dans les tissus témoigne du niveau de perméabilité de la cuticule (fig. 14D ; Tanaka *et al.*, 2004). Après coloration au TB et

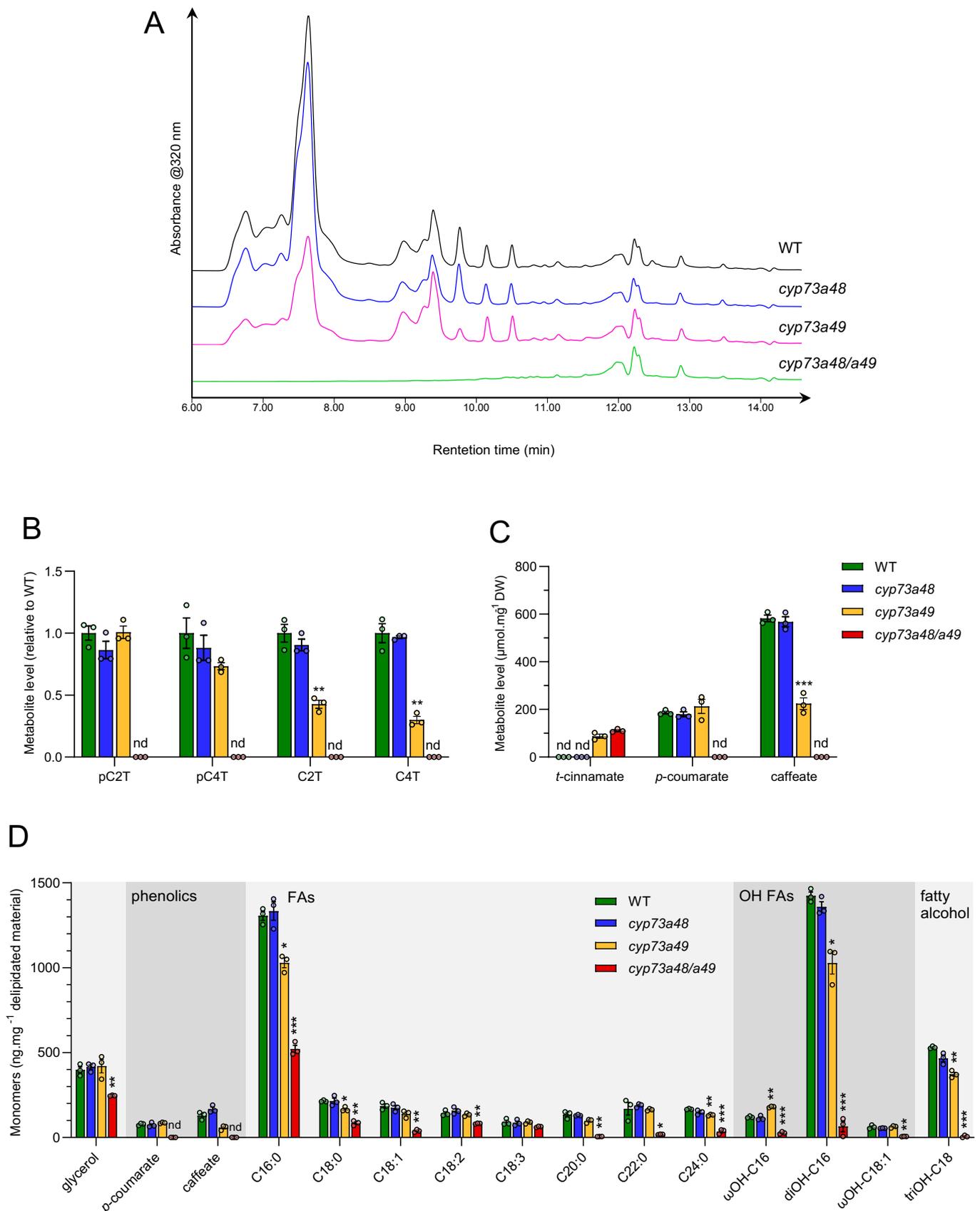


Figure 15 : Profilage métabolique des mutants *Ppcyp73*.

A : Chromatogrammes HPLC-UV d'extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et *cyp73*. Le chromatogramme du mutant double *cyp73a48/a49* montre la quasi-absence de composés phénoliques dans ce génotype. **B** : Teneurs relatives en esters phénoliques de thréonate dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et *cyp73*. pC2T : *p*-coumaroyl-2-thréonate ; pC4T : *p*-coumaroyl-4-thréonate ; C2T : caféoyl-2-thréonate ; C4T : caféoyl-4-thréonate. **C** : Teneurs absolues en acides hydroxycinnamiques après hydrolyse acide d'extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et *cyp73*. **D** : Composition du polymère cuticulaire des plantes WT et *cyp73*, établi par GC-FID après délipidation des tissus et dépolymérisation de la cutine (collaboration avec Bénédicte Bakan, INRAe Nantes). Les données représentent la moyenne de trois lignées indépendantes \pm l'erreur standard à la moyenne. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

extraction des pigments, le niveau de perméabilité est déterminé par le ratio de l'absorbance maximale du TB normalisé par l'absorbance maximale de la chlorophylle (ratio A626/A430 ; fig. 14E). Le niveau de perméabilité des gamétophores des lignées *cyp73a48* est identique à celui des gamétophores WT (fig. 14D et 14E). Le TB pénètre en revanche davantage les gamétophores des lignées *cyp73a49* (fig. 14D), dont le niveau de perméabilité est significativement supérieur à celui des gamétophores WT (fig. 14E). Les bourgeons des gamétophores des lignées *cyp73a48/a49* sont entièrement perméables au TB, à l'instar du protonema qui ne possède pas de cuticule (fig. 14D). Le phénotype macroscopique et de perméabilité des mutants est identique pour chaque lignée indépendante (annexe 1). L'analyse des mutants simples et doubles KO montre ainsi que l'activité des deux isoformes CYP73A48 et CYP73A49 est nécessaire au développement des gamétophores. Selon les caractères macroscopiques observés, il existe une redondance fonctionnelle partielle des deux gènes, puisque que les phénotypes des mutants simples n'ont pas un phénotype aussi fort que le mutant double KO.

L'activité CYP73/C4H est indispensable à la production de phénylpropanoïdes et à la synthèse de cutine chez *P. patens*

L'activité C4H est la deuxième étape de la voie des phénylpropanoïdes, et alimente ainsi la totalité du métabolisme en aval du *p*-coumarate (fig. 11). Cette voie étant par ailleurs cruciale dans la synthèse de la cutine chez *P. patens* (Renault *et al.*, 2017a), l'impact de l'abolition totale ou partielle de cette étape enzymatique sur la synthèse de composés phénoliques et de la cutine a été investigué à l'aide des mutants KO *cyp73*. Afin d'avoir une vue globale de la diversité en composés phénoliques des différentes lignées, des extraits métaboliques de gamétophores ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance couplée à détecteur UV à barrettes de diodes (HPLC-PDA). Les chromatogrammes des extraits métaboliques des plantes WT et des mutants simples *cyp73a48* et *cyp73a49* présentent les mêmes pics et le même profil (fig. 15A). Leur empreinte métabolique en termes de composés phénoliques semble donc similaire. Néanmoins il est à noter que la hauteur des pics majoritaires est inférieure chez le mutant *cyp73a49*. A l'inverse, la quasi-totalité de ces pics est absente dans le chromatogramme des extraits du mutant double *cyp73a48/a49*. Ce mutant n'accumule donc à priori pas ou peu de composés phénoliques en comparaison aux plantes WT. Pour mieux caractériser le profil métabolique en composés phénoliques de ces lignées, les extraits ont ensuite été analysés par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UHPLC-MS/MS), en recherchant spécifiquement les esters phénoliques de thréonate

caractéristiques de *P. patens* (Renault *et al.*, 2017a ; fig. 11) : *p*-coumaroyl-2-thréoate (pC2T), *p*-coumaroyl-4-thréonate (p4CT), caféoyl-2-thréonate (C2T) et caféoyl-4-thréonate (C4T). La teneur de ces quatre métabolites n'est pas significativement différente entre les extraits issus de plantes WT et *cyp73a48* (fig. 15B). En revanche, le mutant *cyp73a49* accumule significativement moins de C2T et C4T. Aucune des molécules recherchées n'est détectée dans le mutant double *cyp73a48/a49*. Pour élargir l'investigation du métabolisme phénolique à d'autres éventuels esters d'acides hydroxycinnamiques inconnus, les extraits métaboliques ont subi une hydrolyse acide afin de cliver l'ensemble des liaisons ester et libérer les aglycones. Les acides hydroxycinnamiques libres ont ensuite été dosés par UPLC-MS/MS. Là aussi, il n'existe pas de différence significative entre les extraits issus de plantes WT et *cyp73a48* (fig. 15C). Les extraits du mutant *cyp73a49* ont plus de deux fois moins d'acide caféique, ce qui reflète les teneurs en C2T et C4T dans les extraits natifs (fig. 15C et 15B). Enfin, l'hydrolyse acide des extraits libère de l'acide *t*-cinnamique pour les mutants *cyp73a49* et *cyp73a48/a49*, alors que cet acide hydroxycinnamique n'est pas détecté pour les plantes WT et *cyp73a48* (fig. 15C). L'abolition de l'activité PpCYP73A9 modifie donc la voie des phénylpropanoïdes notamment par la diminution de l'accumulation d'esters de caféate. L'abolition de toute activité C4H dans le mutant *cyp73a48/a49* empêche toute synthèse de *p*-coumarate et de caféate, mais provoque l'apparition de *t*-cinnamate, le substrat des enzymes C4H, qui s'accumule a priori sous une forme conjuguée puisque détecté uniquement après hydrolyse acide.

Pour explorer le lien potentiel entre l'altération du développement de *P. patens*, la perméabilité des tissus et la modification du métabolisme phénolique, une analyse de la composition du polymère de cutine des lignées WT et mutantes a été réalisée. Comme reporté dans l'analyse fonctionnelle de PpCYP98 (Renault *et al.*, 2017a), la cutine de *P. patens* contient des unités phénoliques – *p*-coumarate et caféate –, des acides gras saturés à longue chaîne – principalement de l'acide palmitique (C16:0) –, des acides gras à longue chaîne (poly)hydroxylés – principalement de l'acide 10,16-dihydroxypalmitique (diOH-C16) –, et un tri-alcool gras : l'octadecane-1,9,18-triol (triOH-C18 ; fig. 15D). Le glycérol a également été recherché et identifié comme un monomère de la cutine. Il n'y a pas de différence significative entre la composition de la cutine des plantes WT et *cyp73a48*. La teneur d'un certain nombre de monomères est inférieure dans la cutine du mutant *cyp73a49*, notamment les monomères aliphatiques majoritaires C16:0, diOH-C16 et triOH-C18, ainsi que le monomère phénolique caféate (fig. 15D). Des changements de composition beaucoup plus importants sont observés dans la cutine du double mutant *cyp73a48/a49*, où la quasi-totalité des monomères voient leur teneur diminuée ou absente, notamment pour les monomères majoritaires. La teneur en C16:0

est plus de deux fois inférieure à celle de la cutine des plantes WT, la diminution du diOH-C16 est quasi-totale, et le triOH-C18 n'est pas détecté. Par ailleurs, la teneur en glycérol est aussi inférieure, et aucun des deux monomères phénoliques n'est détecté. L'abolition de l'activité C4H dans le double mutant KO provoque ainsi une absence de synthèse d'unités *p*-coumarate et caféate (fig. 15B et 15C), mais aussi de leur présence et de leur incorporation dans le polymère de cutine (fig. 15D).

L'altération de l'activité CYP73/C4H perturbe également le développement, le métabolisme phénolique et les propriétés de la cuticule chez *M. polymorpha*

Afin de savoir si les fonctions biologiques attribuées à la famille CYP73 chez *P. patens* peuvent être étendues aux bryophytes au sens large, une autre étude fonctionnelle de la famille a été conduite chez *M. polymorpha* qui appartient à un deuxième clade bryophyte. Les mêmes démarches expérimentales ont donc été menées pour connaître l'effet de l'altération de l'activité CYP73/C4H chez cette espèce. Dans un premier temps, les profils d'expression des trois copies *MpCYP73s* ont été consultés au sein de données transcriptomiques RNA-Seq. Les trois gènes sont exprimés dans les principaux tissus des plantes : le thalle, les organes reproducteurs, et des structures spécifiques aux marchantiophytes qui permettent une reproduction végétative : les « corbeilles à propagules » (gemma cup) présentes sur le thalle, qui contiennent des structures appelés « propagules » (gemmae). Pour chaque organe, l'expression du gène *MpCYP73A1* est entre 3 et 40 fois supérieure à l'expression des gènes *MpCYP73A2* et *MpCYP73A3* (fig. 16A). Des lignées simple KO *Mpcyp73a1* ont ensuite été générées par CRISPR/Cas9 via la transfection de thalles par *Agrobacterium tumefaciens*. La génération de mutants KO multiples étant plus laborieuse chez *M. polymorpha* que *P. patens*, seule la copie la plus exprimée a été choisie pour générer des lignées KO, et voir l'effet de l'altération partielle de l'activité CYP73/C4H. Deux lignées indépendantes ont été obtenues à partir de deux protospacers différents, et dans lesquelles la séquence codante *MpCYP73A1* contient des délétions de 12 ou 37 nucléotides (lignées *Mpcyp73a1^{se}* #1-2 et *Mpcyp73a1^{se}* #2-3, respectivement). Dans la lignée *Mpcyp73a1^{se}* #2-3, la modification génétique provoque un changement du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP prématuré (annexe 2). Pour savoir si ces modifications génétiques sur le gène ciblé provoquent un changement de l'expression des deux autres gènes *MpCYP73s*, les niveaux d'expression des trois gènes ont été mesurés par RT-qPCR dans les thalles de plantes WT et des 2 lignées *cyp73a1*. Dans les thalles de plantes WT, le gène *MpCYP73A1* est respectivement 67 et 148 fois plus exprimé que les gènes *MpCYP73A2* et *MpCYP73A3* (fig. 16B), soit une différence plus importante que celle visible dans les données

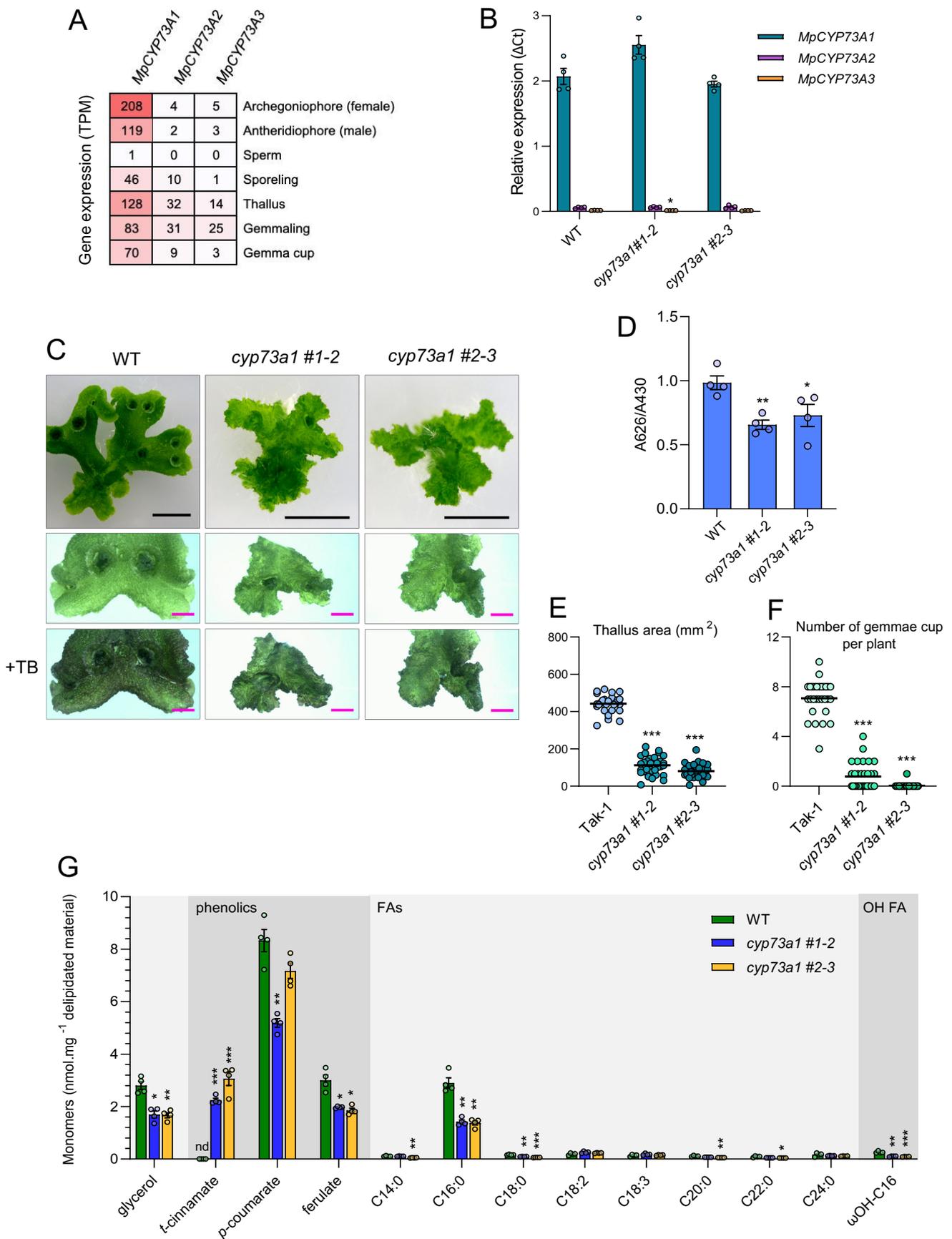


Figure 16 : Analyse fonctionnelle du gène *MpCYP73A1* chez *M. polymorpha*.

A : Heatmap du niveau de transcription des gènes *CYP73s* dans différents organes de *M. polymorpha*, exprimés en transcrits par million (TPM). Les données sont issues de la base de données RNA-seq CoNekt (Proost et Mutwill, 2018). **B** : Niveaux de transcription des gènes *MpCYP73s* mesurés par RT-qPCR dans les thalles de plantes WT et de deux lignées *cyp73a1* indépendantes. **C** : Phénotypes de plantes WT et *cyp73a1*. De haut en bas : plantes entières, morceaux de thalles avant et après et coloration au bleu de toluidine (TB). Échelles : noire 5 mm ; rose 2 mm. **D** : Niveau de perméabilité des thalles mesuré par le ratio d'absorbance A626/A430 après coloration au bleu de toluidine. **E** : Aire du thalle des plantes WT et *cyp73a1*. **F** : Nombre de « gemmae cup » par plante WT ou *cyp73a1*. **G** : Composition du polymère cuticulaire des plantes WT et *cyp73a1*, établi par GC-TOFMS après dépolymérisation de la cutine. Les données représentent la moyenne de quatre répliques biologiques indépendants \pm l'erreur standard. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001.

transcriptomiques (fig. 16A). Les modifications génétiques induites par CRISPR/Cas9 dans la séquence codante de *MpCYP73A1* n'induisent pas de changement significatif du niveau de transcrits. Le gène *MpCYP73A2* est légèrement sous-exprimé dans la lignée *cyp73#1-2* par rapport au WT, et l'expression du gène *MpCYP73A3* n'est pas significativement différente (fig. 16B). La perte de fonction de *MpCYP73A1* induite par CRISPR/Cas9 ne provoque donc pas de compensation de l'activité CYP73/C4H par les deux autres copies au niveau transcriptionnel.

A l'instar des lignées *Ppcyp73*, le développement des lignées *Mpcyp73a1* est altéré. Par rapport aux plantes WT, la croissance globale est ralentie, la symétrie des thalles est rompue, et leur marge est échanquée (fig. 16C). La surface des thalles des deux lignées KO est inférieure (fig. 16D), et le nombre de gemma cup est inférieur voire nul (fig. 16E). Un test de perméabilité au TB montre que le colorant pénètre moins dans le thalle des deux lignées *cyp73a1* que dans le thalle de plantes WT (fig. 16C). La quantification de la pénétration du colorant montre en effet que les thalles des lignées KO sont moins perméables (fig. 16F), à l'inverse des mutants *Ppcyp73a49* et *Ppcyp73a48/a49* (fig. 14D et 14E).

Pour étudier si comme chez *P. patens*, il existe chez *M. polymorpha* un lien entre l'altération de l'activité CYP73/C4H, le développement et la biosynthèse de la cutine et de la cuticule, la composition du polymère de cutine des thalles des plantes WT et KO a été analysée par GC-TOFMS. Comme la cutine des gamétophores de *P. patens*, la cutine des thalles de *M. polymorpha* est composée de glycérol, d'unités phénoliques, d'acides gras à longue chaîne et d'acides gras hydroxylés. Cependant, la proportion et la nature des monomères sont différentes. Les unités phénoliques représentent plus de la moitié du polymère (62%), consistant exclusivement en du *p*-coumarate et du férulate (fig. 16E). Le polymère comporte également une proportion importante de glycérol (15%). Le seul acide gras hydroxylé, l'acide 16-hydroxypalmitique (ω OH-C16), est minoritaire, tout comme la plupart des acides gras non hydroxylés. Ainsi, la cutine de *M. polymorpha* est à 93% composée de quatre monomères : le glycérol, le *p*-coumarate, le férulate et le C16:0. La teneur de ces quatre monomères est significativement inférieure dans la cutine des lignées *cyp73a1*, à l'exception du *p*-coumarate dont la diminution n'est pas significative dans la lignée *cyp73#2-3* (fig. 16E). La teneur de certains monomères minoritaires est également inférieure dans les lignées KO, notamment le C18:0 et le ω OH-C16. Une autre caractéristique de la composition de la cutine de ces lignées est la présence d'une troisième unité phénolique, le *t*-cinnamate, absent de la cutine des plantes WT (fig. 16E), et qui est le substrat des enzymes CYP73/C4H (fig. 11). En plus d'impacter le développement et la perméabilité des thalles, l'abolition de l'activité *MpCYP73A1* provoque ainsi une altération de la composition de la cutine, visible par une baisse de la teneur des

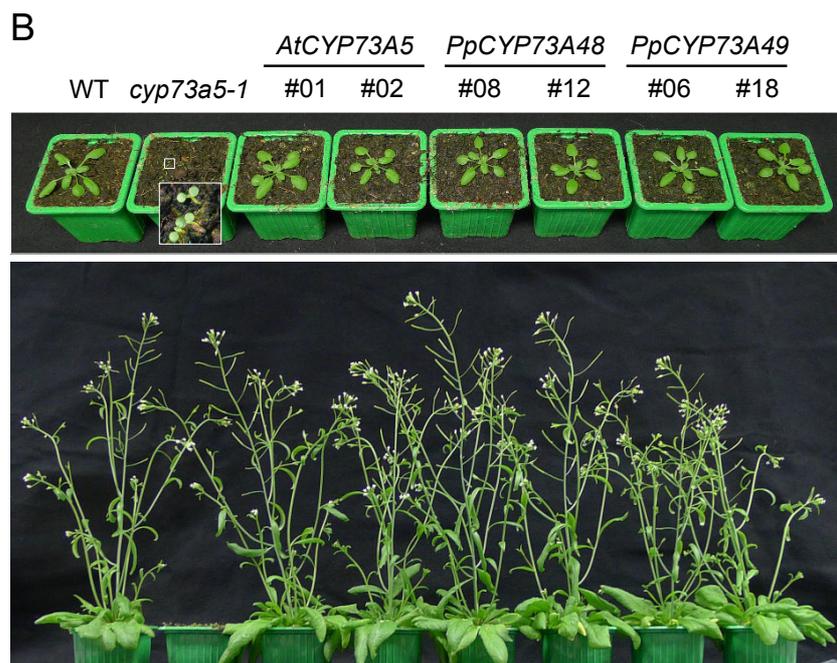
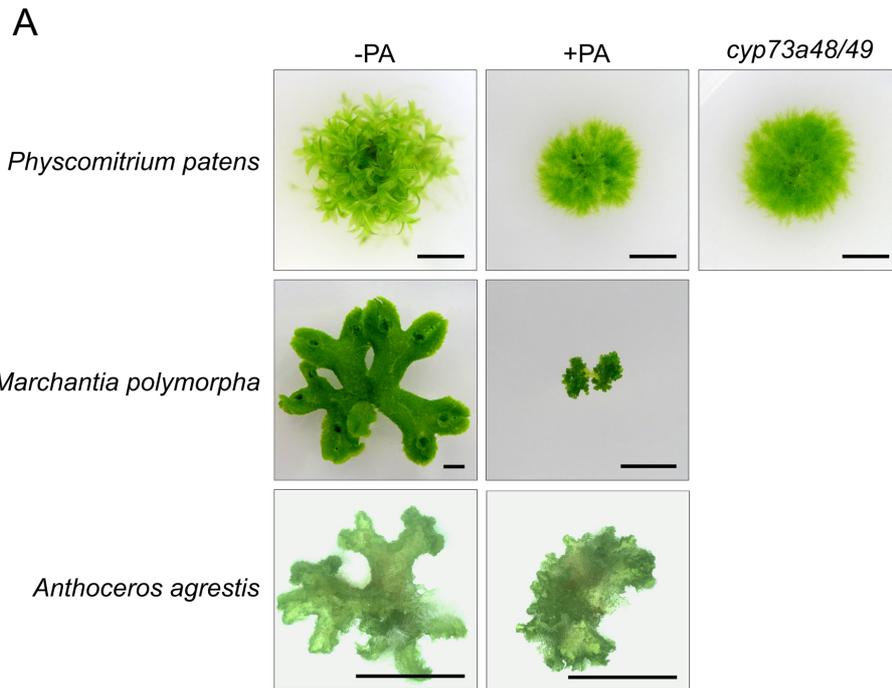


Figure 17 : Conservation fonctionnelle de la famille CYP73 chez les embryophytes.

A : Photographies des trois espèces modèles de bryophytes cultivées en absence ou en présence d'acide pipéronylique (PA). L'inhibiteur a un effet sur le développement des trois espèces, l'effet provoqué sur *P. patens* rappelle le phénotype *cyp73a48/a49*. **B** : Trans-complémentation du mutant *cyp73a5-1* d'*A. thaliana* par la séquence codante d'*AtCYP73A5* (contrôle), *PpCYP73A48* et *PpCYP73A49*. L'expression des trois gènes sous le contrôle du promoteur *AtCYP73A1* restaure le phénotype sauvage.

des monomères majoritaires, et une modification de la nature des composés phénoliques incorporés au polymère.

L'activité CYP73/C4H est cruciale dans le développement des bryophytes

L'étude fonctionnelle de la famille CYP73 chez *P. patens* et *M. polymorpha* a permis de mettre en évidence un rôle de cette famille dans le développement de ces deux espèces bryophytes. Pour étendre cette investigation à l'ensemble des clades bryophytes, une approche pharmacologique a été utilisée. Les trois espèces modèles représentatives des trois clades bryophytes ont été cultivées en absence ou en présence d'acide pipéronylique (PA), un inhibiteur spécifique des C4Hs (Schalk *et al.*, 1998). Ainsi, sans étude biochimique et fonctionnelle approfondie, l'impact de l'abolition de toute activité C4H chez ces espèces peut être approchée. La présence de PA provoque chez *P. patens* une abolition totale de la formation des gamétophores, et un développement accru du protonema. Ce phénotype est comparable au phénotype du double mutant *cyp73a48/a49*, chez qui toute activité C4H a aussi été abolie, validant ainsi la démarche expérimentale (fig. 17A). L'inhibiteur provoque une inhibition quasi-totale du développement de *M. polymorpha*, soit un phénotype bien plus fort que celui observé dans les mutants simple KO *Mpcyp73a1*. Le développement du thalle d'*A. agrestis* est aussi impacté, bien que l'effet soit moins conséquent que pour les deux autres espèces. Le thalle est plus petit et plus dense, et sa forme et sa marge sont altérées (fig. 17A). La présence de cet inhibiteur spécifique des C4H altère voire inhibe le développement des trois espèces bryophytes étudiées, suggérant un rôle général et conservé de la famille CYP73 dans le développement des bryophytes.

L'activité CYP73/C4H est conservée au sein des embryophytes

La famille CYP73 est conservée chez toutes les espèces embryophytes qui possèdent au moins une copie du gène (fig. 12A ; Ehrling *et al.*, 2006). Chez les plantes vasculaires, les CYP73s ont été largement étudiées sur leur activité commune C4H, et son implication dans la voie des phénylpropanoïdes via la synthèse de molécules solubles et de lignine. Nous avons montré que l'activité C4H est conservée chez les bryophytes et donc chez les embryophytes au sens large. Il existe par ailleurs un lien entre l'activité CYP73/C4H chez les bryophytes, la voie des phénylpropanoïdes et la biosynthèse de cutine. Au vu des différences physiologiques entre les bryophytes et les trachéophytes, notamment l'absence/présence de lignine, le rôle physiologique de la famille CYP73 est au moins partiellement différent entre ces deux grands clades. Afin de savoir si l'activité biochimique C4H est conservée *in planta* au sein des

embryophytes, une expérience de trans-complémentation a été réalisée entre *P. patens* et *A. thaliana*, deux espèces modèles appartenant aux clades les plus éloignés des embryophytes (bryophytes et trachéophytes), et dont le premier ancêtre commun correspond à l'ancêtre commun des embryophytes (fig. 3). Les deux gènes *PpCYP73s* dont les protéines ont une activité C4H (*PpCYP73A48* et *PpCYP73A49*) ont été exprimés dans le mutant *cyp73a5* d'*A. thaliana*, sous le contrôle du promoteur endogène *AtCYP73A5*. L'expression du gène endogène *AtCYP73A5*, ainsi que du gène *PpCYP73A48* ou *PpCYP73A49*, restaure le phénotype WT (fig. 17B). Les trois protéines ont donc l'activité canonique C4H *in planta*. Cette expérience de trans-complémentation confirme que l'activité biochimique des protéines CYP73s, qui peut être impliquée *in fine* dans diverses voies métaboliques et processus physiologiques, est conservée chez les embryophytes.

Discussion

Les fonctions biochimiques de la famille CYP73 sont conservées chez les embryophytes

L'étude phylogénétique menée sur la famille CYP73 a confirmé la spécificité de cette famille génique aux embryophytes. La famille a évolué en gardant un faible nombre de copies au sein des embryophytes, dont les génomes possèdent au moins un exemplaire. Cette évolution suit d'ailleurs une forte sélection purificatrice, témoignant d'une fonction essentielle (Renault *et al.*, 2017b). Notamment, les résidus responsables de l'activité C4H sont extrêmement conservés, et les protéines caractérisées lors de ces travaux chez *P. patens* ont effectivement l'activité canonique C4H. La conservation de cette activité entre les plantes bryophytes et les angiospermes a par ailleurs été démontrée à travers la trans-complémentation du mutant *cyp73a5* d'*A. thaliana* par les deux copies *CYP73* de *P. patens*. Ainsi, à ce jour, toutes les protéines CYP73 caractérisées ont l'activité C4H, l'unique activité enzymatique connue de cette famille, conservée au sein de l'ensemble des embryophytes. Ces données suggèrent un rôle essentiel et conservé de la famille CYP73, jusqu'à présent surtout étudiée chez les trachéophytes, et que nous avons voulu étudier chez les bryophytes. L'activité C4H constitue une étape précoce de la voie des phénylpropanoïdes (fig. 11). Cette voie métabolique a été étudiée par des approches métaboliques au sein des mutants obtenus. La synthèse des esters phénoliques est notamment affectée dans le mutant *cyp73a48/a49*, qui n'accumule pas d'esters de *p*-coumarate et de caféate, mais des dérivés de *t*-cinnamate absents chez le WT. De même, la cutine de ce mutant ne contient plus d'unités *p*-coumarate et caféate, contrairement aux

plantes WT et aux mutants KO simple. La synthèse de *p*-coumarate et de caféate nécessitant l'activité C4H d'après la voie des phénylpropanoïdes telle qu'elle est décrite (fig. 11), l'absence de ces composés dans le mutant KO double *cyp73a48/a49* montre que leur synthèse par *P. patens* nécessite également l'activité C4H de la famille CYP73. Par ailleurs, le *t*-cinnamate étant le substrat de cette activité, l'abolition de toute activité C4H provoque la redirection d'une partie du flux métabolique vers la synthèse de dérivés solubles de *t*-cinnamate. Cette activité est partiellement impactée dans le mutant simple KO *cyp73a49*, pour qui la diminution des dérivés de caféate, sous forme d'esters solubles ou de monomères de cutine, est intermédiaire. Ainsi, cette étape clé de la voie des phénylpropanoïdes est conservée entre *P. patens* et les plantes vasculaires. Bien que les familles multigéniques *PAL* et *4CL* n'ont pas été étudiées fonctionnellement chez *P. patens*, nous proposons au vu de ces résultats et de l'analyse fonctionnelle de *PpCYP98* (Renault *et al.*, 2017a), que l'ensemble de la voie des phénylpropanoïdes du précurseur commun L-phénylalanine jusqu'au caféoyl-CoA, est conservée entre *P. patens* et les plantes vasculaires, et donc chez les embryophytes. L'émergence de cette voie est concomitante avec l'émergence de familles géniques responsables d'étapes clés de la voie, telle la famille CYP73.

Les fonctions physiologiques de la famille CYP73 sont conservées chez les embryophytes

L'analyse métabolique des mutants *cyp73* chez *P. patens* montre que l'activité C4H est nécessaire, via la voie des phénylpropanoïdes, à la synthèse et l'accumulation de molécules phénoliques solubles, principalement sous la forme d'esters de thréonate. De manière similaire, la voie des phénylpropanoïdes mène à la synthèse et l'accumulation de nombreux composés phénoliques solubles chez les plantes vasculaires. La plupart de ces molécules sont synthétisées à partir du précurseur *p*-coumaroyl-CoA, et sont souvent accumulées sous forme d'hétérosides (Vogt, 2010 ; fig. 11). Il existe une grande diversité chimique de composés phénoliques au sein des espèces embryophytes (Dixon *et al.*, 2002), dont les esters phénoliques accumulés par *P. patens* font partie. La synthèse de molécules phénoliques solubles est ainsi une fonction conservée de la famille CYP73, et au sens large de la voie des phénylpropanoïdes. Ces molécules sont généralement impliquées dans la tolérance aux contraintes de l'environnement, servant de filtres anti-UV et d'antioxydants.

L'investigation de la famille CYP73 chez les bryophytes a révélé d'autres fonctions associées à cette activité et cette voie métabolique. La caractérisation des mutants *cyp73* chez *P. patens* a à nouveau montré l'importance des unités phénoliques dans la synthèse et les

propriétés du polymère de cutine. En effet, l'absence d'unités phénoliques dans la cutine du mutant *cyp73a48/a49*, provoquée par l'inactivation totale de la voie C4H, entraîne une conséquence forte sur les propriétés de la cuticule et le développement de *P. patens*. Le lien entre l'activité C4H, la présence des unités phénoliques dans la cutine, et le développement des gamétophores, est par ailleurs soutenu par le phénotype intermédiaire du mutant KO simple *cyp73a49* (plus faible teneur en caféate dans la cutine, perméabilité des gamétophores accrue, déformation des phyllides), pour lequel l'isoforme CYP73 la plus exprimée dans les gamétophores a été inactivée. La biosynthèse de cutine est nécessaire au développement des gamétophores dès l'initiation de leur formation depuis le protonema. En plus de conférer un niveau d'imperméabilité aux gamétophores, l'élaboration de la cuticule accompagne donc le développement de ces organes aériens et est nécessaire à leur formation. Ainsi, en alimentant la voie des phénylpropanoïdes vers la synthèse de composés phénoliques cruciaux à la synthèse de la cutine, l'activité C4H est nécessaire au développement des organes aériens de *P. patens*. L'inactivation partielle de l'activité C4H chez *M. polymorpha* impacte également la composition de la cutine et le développement de la plante, à travers l'altération de la voie des phénylpropanoïdes. La réduction des teneurs en unités phénoliques – *p*-coumarate et férulate – dans la cutine du mutant *Mpcyp73a1*, et l'apparition d'unités *t*-cinnamate, sont cohérentes avec la position de l'étape C4H dans la voie des phénylpropanoïdes. Le *p*-coumarate et le férulate étant situés aval de l'étape C4H (fig. 11), la diminution du flux métabolique empruntant cette étape enzymatique diminue la synthèse de ces acides hydroxycinnamiques, et provoque une accumulation de *t*-cinnamate incorporé à la cutine. De même que pour *P. patens*, la modification de la cutine altère les propriétés de la cuticule et le développement de la plante. De manière surprenante, les thalles du mutant *Mpcyp73a1* sont moins perméables par rapport au WT. Toutefois, contrairement aux gamétophores de *P. patens*, les thalles de *M. polymorpha* sont relativement perméables au TB. Au vu de cette propriété et du phénotype macroscopique du mutant *Mpcyp73a1*, la cuticule de *M. polymorpha* joue vraisemblablement davantage un rôle dans le développement du thalle que dans son imperméabilisation. Nous interprétons donc la diminution de la perméabilité des thalles des mutants comme la conséquence d'une déstructuration de la cutine et de la cuticule, provoquée par la compromission de la voie CYP73. De manière similaire au mutant *Ppcyp73a49*, le phénotype du mutant *Mpcyp73a1* est partiel : la synthèse de composés phénoliques et le développement sont altérés, mais pas abolis. L'inhibition de toute activité C4H par le PA provoque en revanche une inhibition totale du développement de *M. polymorpha*. A la lumière i) des conséquences similaires de l'inhibition partielle de l'activité C4H entre *P. patens* et *M. polymorpha*, et ii) du phénotype similaire de *P.*

patens cultivé en présence de PA avec le mutant *cyp73a48/a49*, il est vraisemblable que l'inhibition de toute activité C4H chez *M. polymorpha* via l'obtention d'un mutant triple KO *Mpcyp73a1/a2/a3* aurait le même effet que le PA sur le développement de la plante. Enfin, l'inhibiteur chimique ayant un effet aussi sur le développement d'*A. agrestis*, l'activité C4H et à priori de la famille CYP73 sont aussi impliquées dans le développement de cette troisième espèce bryophyte, possiblement via la voie des phénylpropanoïdes et la synthèse de cutine. Les trois espèces de bryophytes étudiées sont représentatives des différences physiologiques et anatomiques entre les trois clades de bryophytes (e.g. gamétophore vs thalle) qui ont évolué depuis leur divergence avec leur ancêtre commun. L'investigation de la fonction biochimique et physiologique de la famille CYP73 chez les bryophytes met ainsi en avant une fonction commune et conservée de la famille CYP73 chez les plantes non vasculaires, dans la synthèse de précurseurs phénoliques de la cutine, et le développement des organes aériens.

La cutine des espèces trachéophytes peut contenir de faibles proportions de composés phénoliques issus de la voie des phénylpropanoïdes (Pollard *et al.*, 2008), mais contrairement aux bryophytes, leur présence ne semble pas indispensable à la synthèse et à la structure correcte de la cuticule (Rautengarten *et al.*, 2012). En revanche, la voie des phénylpropanoïdes est à l'origine de la biosynthèse de la lignine, dont la présence dans les tissus vasculaires est cruciale dans le développement des plantes vasculaires. Dans ce contexte, l'étape C4H régule le flux métabolique dirigé vers la synthèse de lignine, et est donc aussi nécessaire au développement des plantes vasculaires, comme en témoigne le phénotype quasi-létale du mutant *cyp73a5* chez *A. thaliana* (Anterola et Lewis, 2002 ; Schillmiller *et al.*, 2009). Le rôle de la famille CYP73 et de l'activité C4H dans la synthèse de précurseurs phénoliques pour la synthèse de polymères apoplastiques structuraux, et le développement des organes aériens, est ainsi partagé et conservé au sein des embryophytes. Ce rôle se traduit par la synthèse de cutine chez les bryophytes, et par la synthèse de lignine chez les trachéophytes.

L'émergence de la famille CYP73 a contribué à l'adaptation des plantes aux milieux terrestres

L'étude fonctionnelle de la famille CYP73 chez les bryophytes a montré son rôle dans la synthèse de composés phénoliques solubles. Bien que la nature des molécules solubles et des polymères issus de la voie des phénylpropanoïdes soit différente entre les plantes vasculaires et non-vasculaires, ces voies métaboliques jouent un rôle similaire dans l'adaptation des plantes aux contraintes des milieux terrestres. A l'instar de la grande diversité de composés phénoliques synthétisés par les plantes vasculaires (e.g. flavonoïdes), il est probable que la synthèse d'esters

d'acides hydroxycinnamiques solubles par *P. patens* participe à filtrer les rayonnements UV, à neutraliser le stress oxydatif ou encore à lutter contre l'infection par des agents pathogènes (Vogt, 2010 ; Grace et Logan, 2002). L'activité des CYP73s chez les bryophytes est aussi nécessaire à la synthèse et l'incorporation d'acides hydroxycinnamiques dans la cutine. Ces composés phénoliques peuvent constituer la majorité du polymère et sont cruciaux dans la synthèse correcte du polymère et de la cuticule (Kong *et al.*, 2020 ; Renault *et al.*, 2017a). Cette cuticule confère un niveau d'imperméabilité aux organes aériens et permet de réguler les pertes passives en eau, même chez des espèces poïkilohydriques. Aussi, la synthèse progressive de la cuticule dans les organes aériens des bryophytes est nécessaire à la croissance 3D des organes et à leur port érigé. Ainsi, l'émergence de la famille CYP73 chez les embryophytes lors de la terrestrialisation a certainement joué un rôle majeur dans l'acquisition d'adaptations cruciales à la survie des plantes sur terre. Plus largement, la voie des phénylpropanoïdes *stricto sensu* est aussi conservée chez les embryophytes et est donc apparue au cours de la terrestrialisation. Si la nature des molécules et polymères qui en découle est différente selon les clades embryophytes et l'anatomie des espèces considérées, la voie métabolique est identique dans ces premières étapes communes, et confère *in fine* des caractères adaptatifs aux contraintes des milieux terrestres.

Conclusions et perspectives

L'émergence d'une nouvelle famille de CYP marque souvent l'apparition d'une nouvelle classe de molécules (Mizutani et Ohta, 2010). L'apparition de la famille CYP73 chez les embryophytes a effectivement contribué à l'apparition d'un métabolisme phénolique via la voie des phénylpropanoïdes. L'étude fonctionnelle de la famille CYP73 ici élargie aux bryophytes, montre la conservation des propriétés biochimiques des CYP73s, de la voie des phénylpropanoïdes *stricto sensu*, et du rôle de cette voie dans la synthèse de molécules phénoliques solubles et de précurseurs des polymères structurants. La fonction essentielle de la famille CYP73 est mise en évidence par sa faible radiation dans les génomes de plantes, et par la forte sélection négative qu'elle subit (Ehltig *et al.*, 2006 ; Renault *et al.*, 2017b). Ainsi, les embryophytes possèdent souvent un seul gène *CYP73*, telle l'espèce modèle *A. thaliana*. Pour cette raison, il est souvent difficile d'étudier le rôle de la famille CYP73 et de la voie des phénylpropanoïdes dans d'autres processus que ceux déjà connus. Le mutant *Atcyp73a5* étant par exemple presque létale, il est impossible d'étudier le rôle de la voie dans des stades développementaux tardifs. Notamment, la voie des phénylpropanoïdes joue vraisemblablement

un rôle dans la synthèse de la sporopollénine. Ce polymère apoplastique contient en effet du *p*-coumarate, le produit de l'activité C4H (Li *et al.*, 2019). La présence de plusieurs copies *CYP73s* dans les génomes de bryophytes pourrait alors offrir l'opportunité d'étudier le rôle de la voie des phénylpropanoïdes dans la synthèse de la sporopollénine, dont l'émergence a aussi contribué à l'adaptation des plantes sur terre (de Vries *et al.*, 2017). A ce titre, le mutant simple KO *cyp73a49* de *P. patens* pourrait être un outil pertinent. Ce mutant est altéré dans son développement mais peut accomplir son cycle de développement. D'autre part, le gène *PpCYP73A49* est très exprimé dans les sporophytes, là où a lieu la formation des spores et la synthèse de la sporopollénine. Étudier l'impact de l'extinction de l'activité *PpCYP73A49* pourrait ainsi éclaircir le lien probable entre la voie des phénylpropanoïdes et la synthèse de sporopollénine chez *P. patens*. Dans cette démarche, nous pourrions continuer de comprendre comment l'émergence de cette voie a contribué à l'adaptation des plantes sur terre, et comment les différents polymères apoplastiques hydrophobes ont évolué chez les embryophytes.

Matériels et méthodes

Analyses phylogénétiques

La phylogénie de la famille *CYP73* décrite dans Renault *et al.* (2017b) a été mise à jour avec de nouvelles séquences homologues à *BdCYP73A92* (BLASTp E-value < E^{-100}) identifiées, en particulier, dans des transcriptomes (Projet 1kP ; Carpenter *et al.*, 2019) ou génomes de bryophytes récemment disponibles. Ces 70 nouvelles séquences ont été alignées avec les 203 séquences de *CYP73* d'origine par l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004). La phylogénie a été déterminée à partir de l'alignement des séquences nucléotidiques dont les sites ambigus ont été préalablement masqués par la méthode des GBLOCKS (Castresana, 2000). La phylogénie a été inférée par maximum de vraisemblance avec le logiciel IQTree2 (Minh *et al.*, 2020) et le modèle d'évolution GTR+F+R8, dont le choix a été dicté par l'algorithme ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) se fondant sur le critère d'information Bayésien (BIC). La robustesse de la reconstruction phylogénétique a été testée par les méthodes d'« approximate likelihood ratio test » (LRT) et de bootstrap.

Modélisation des protéines et docking du substrat

La structure tridimensionnelle de la protéine *PpCYP73A48*, tronquée de son domaine N-terminal transmembranaire (résidus 1 à 45), a été déterminée par homologie sur le serveur SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) en utilisant comme référence la structure du

SbiC4H1 (pdb #6vby.1.A) et l'algorithme ProMod3 v3.1.1. La structure obtenue possède des scores GMQE et QMEAN de 0,90 et -2,20, respectivement. Le logiciel Autodock Vina (Trott et Olson, 2009) a été utilisé pour réaliser des expériences de « docking » du *t*-cinnamate dans le site actif du CYP73A48. L'espace de recherche consistait en un parallélépipède de 20Å de côté sur une structure rigide de PpCYP73A48. Les fichiers nécessaires au « docking » ont été préparés par la suite logiciel AutoDockTools 1.5.6. Les structures et résultats de « docking » ont été visualisés avec ChimeraX.

Expression recombinante en levure

Les séquences codantes des gènes *CYP73s* de *P. patens* ont été amplifiées par PCR à partir de cDNA et clonés dans le vecteur pYeDP60 à l'aide des sites de restrictions *Bam*HI et *Kpn*I.. Les plasmides obtenus ont été utilisés pour transformer la souche WAT11 de levure (*S. cerevisiae*) selon le protocole décrit par Liu *et al.* (2016). La production et la purification des protéines recombinantes ont été réalisées tel que décrit par Liu *et al.* (2016). Les microsomes ont été conservés à -20°C jusqu'à la réalisation des activités enzymatiques.

Mutagenèse dirigée

La version mutée de PpCYP73A48 a été obtenue par mutagenèse dirigée du plasmides pYeDP60 contenant la séquence codante de *PpCYP73A48*. La mutation non synonyme désirée a été introduite par amplification du plasmide par PCR avec des amorces dessinées à l'aide du logiciel QuikChange Primer Design (Agilent Technologies), puis le plasmide matrice hémiméthylé a été digéré par l'enzyme *Dpn*I (Promega) selon les instructions du fabricant. Le nouveau plasmide obtenu a été amplifié dans *E. coli*, purifié, et la mutation a été vérifiée par séquençage Sanger.

Activités enzymatiques

Les réactions enzymatiques des protéines recombinantes ont été réalisées dans un volume réactionnel de 100 µL contenant 50 mM de tampon phosphate de potassium (KPi ; pH 7,4), 1 ou 5 pmoles d'enzyme, 100 µM de *t*-cinnamate et 500 µM de NADPH. Les réactions ont été initiées par l'ajout du NADPH, incubées 30 min à 28°C, et arrêtées par l'ajout de 100 µL de méthanol. Après 5 min de centrifugation à 15 000 g à 4°C, le surnageant a été prélevé et injecté en HPLC-PDA pour analyser le *p*-coumarate.

Génération des lignées transgéniques

Les lignées KO *Ppcyp73* ont été générées par transfection de protoplastes avec une construction génétique permettant la disruption du gène avec une cassette de sélection par recombinaison homologue (cf. annexe 3). La construction génétique a été obtenue en amplifiant par PCR deux régions génomiques de 750 pb et la cassette de sélection *NPTII* ou *HPT*, puis en les assemblant dans un plasmide pGEM-T par clonage Gibson (cf. protocoles et méthodologies générales). Le plasmide obtenu a été digéré par *EcoRI* (Promega) grâce aux sites de restriction insérés lors de la PCR, afin de linéariser la construction de recombinaison homologue. 25 µg de fragment linéarisé stérile ont été utilisés pour la transfection des protoplastes. Le double mutants *cyp73A48/cyp73a49* a été obtenu par transformation du mutant *cyp73a48* #23 préalablement généré. Les transformants ont été sélectionnés avec la G418 (*cyp73a48*) ou l'hygromycine B (*cyp73a49*).

Les lignées *Ppcyp73:uidA* ont été générées selon la méthodologie décrite dans Renault *et al.* (2017b), utilisant la recombinaison homologue pour remplacer le codon STOP des gènes cible par le gène rapporteur.

Les lignées KO *Mpcyp73* ont été obtenues par la méthode de la transformation des thalles médiée par *Agrobacterium tumefaciens* (Kubota *et al.*, 2013), qui permet l'insertion T-DNA contenant les constructions génétiques nécessaires à la mutation des gènes cibles par CRISPR/Cas9 (Sugano *et al.*, 2018 ; cf. protocoles et méthodologies générales). Deux protospacers différents ont été utilisés pour générer des lignées indépendantes.

Coloration GUS

Des colonies des lignées indépendantes *PpCYP73:uidA* ont été infiltrées sous vide pendant 10 min dans une solution de coloration (KPi pH 7.0 ; 0,5 mM ferrocyanide ; 0,5 mM ferricyanide ; 0,1 % Triton X-100 ; 0,05 mg/mL X-Gluc) et incubées à 37°C pendant 2h. Les plantes ont ensuite été décolorées par des lavages successifs à l'éthanol 70%. Des gamétophores individuels ont été détachés des colonies et photographiés.

Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

L'extraction d'ARN totaux s'est faite à partir de gamétophores de *P. patens* et de thalles de *M. polymorpha* récoltés cinq semaines après repiquage. Les tissus ont été congelés dans l'azote liquide et lyophilisés, puis broyés en présence de deux billes métalliques de 3 mm au Tissuelyser II (Qiagen) pendant 2 min à 30 Hz. Les ARNs ont été extraits à partir d'environ 5

mg de matériel avec du TriReagent (Sigma), traités à la DNase RQ1 (Promega), et 150 ng (*P. patens*) ou 1 µg (*M. polymorpha*) d'ARN totaux ont été rétro-transcrits avec l'enzyme SuperScript IV (ThermoFisher Scientific) et un oligo(dT)₁₈, selon les instructions des fabricants. La qPCR a été réalisée en plaque 384 puits, dans un volume réactionnel de 10 µL contenant 1 µL cDNA non dilué (*P. patens*) ou dilué au 1/5^{ème} (*M. polymorpha*), 0,5 µM de chaque amorce, et 5 µL de Master mix SYBR Green I (Roche). Les réactions ont été réalisées en triplicat avec un LightCycler® 480 II (Roche), selon le programme suivant : 95°C 10 min, puis 40 cycles d'amplification [95° 10 s (dénaturation) – 60°C 15 s (hybridation) – 72°C 15 s (élongation)], et une courbe de dénaturation de 55 à 95 °C pour vérifier la spécificité des amorces. Les cycles de seuil de fluorescence (Cp) ont été calculés par le logiciel du fabricant et corrigés avec l'efficacité de chaque paire d'amorces. Les niveaux d'expression des gènes *CYP73s* ont été normalisés par les niveaux d'expression des gènes *PpTRX1* (*Pp3c19_1800*) et *PpSEC15* (*Pp3c27_3270*) pour *P. patens*, et *MpACT7* (*Mapoly0016s0139*) et *MpEF1* (*Mapoly0024s0116*) pour *M. polymorpha*. Les amorces utilisées pour la qPCR sont disponibles en annexe 4.

Analyse des molécules solubles

Préparation des échantillons

Les molécules solubles ont été extraites à partir de 10 mg de matériel végétal lyophilisé, selon le protocole d'extraction au méthanol/chloroforme/eau décrit par Kriegshauser *et al.* (2021).

Chromatographie HPLC-PDA

Le profilage métabolique UV des échantillons a été réalisé sur un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC Alliance 2695 ; Waters) couplé à un détecteur à barrettes de diodes (PDA 2996 ; Waters). 10 µL d'extrait ont été injectés sur une colonne Kinetex Core-Shell C18 (100 mm x 4.6 mm, 2,6 µm ; Phenomenex). La phase mobile était composée d'un mélange d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B), chacun supplémenté avec de l'acide formique (0,1%). L'aiguille et la boucle d'injection ont été lavées entre chaque injection par des solvants « Weak » (95 % H₂O, 5 % ACN) et « Strong » (5 % H₂O, 95 % ACN). Le programme d'élution était le suivant : 0 min 95% A, 15 min 5% A, 17 min 5% A, 18 min, 95% A (courbe 8), 20 min, 95% A. Le débit était fixé à 1 ml/min et la température de la colonne à 28°C. L'absorbance a été mesurée entre 200 et 600 nm. Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel Empower 3 (Waters).

Chromatographie UHPLC-MS/MS

Les extraits métaboliques de gamétophores, avant et après hydrolyse acide, ont été injectés sur un système UHPLC-MS/MS pour rechercher de manière ciblée et quantifier les acides hydroxycinnamiques et les esters phénoliques (cf. protocoles et méthodologies générales).

Analyse de la composition de la cutine

La composition de la cutine des mutants *Ppcyp73* a été analysée par Dr. Bénédicte Bakan à l'INRAe de Nantes, par une adaptation du protocole décrit par Renault *et al.* (2017a). La délipidation du matériel, la dépolymérisation de la cutine et la dérivation des monomères, ont été réalisées de manière similaire qu'à l'IBMP (cf. protocoles et méthodologies générales). Les échantillons ont ensuite été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). Les monomères ont été identifiés d'après la comparaison de leur temps de rétention avec des standards chimiques ou par GC-MS. Les aires de pics obtenues en GC-FID ont servi à la quantification des monomères, après une normalisation par un standard interne et la masse de tissu délipidé. La composition de la cutine des mutants *Mpcyp73* a été analysée par GC-TOFMS à l'IBMP (cf. protocoles et méthodologies générales) à partir du même matériel végétal utilisé pour la qPCR.

Traitement à l'acide pipéronylique

P. patens (écotype Reute) a été cultivé sur milieu solide KNOP, *M. polymorpha* (écotype Tak1) et *A. agrestis* (écotype Bonn) ont été cultivés sur milieu solide GB/2 (cf. protocoles et méthodologies générales), tous supplémentés en acide pipéronylique (PA, 100 µM) à partir d'une solution stérile à 25 mM dans du DMSO. Les milieux témoin sans PA ont été supplémentés avec un volume identique de DMSO. Un gamétophore (*P. patens*), un gemmae (*M. polymorpha*) ou un morceau de thalle (*A. agrestis*) a été transféré depuis un milieu KNOP ou GB/2 normal vers les milieux pour le traitement, et les photos ont été prises huit semaines (*P. patens* et *A. agrestis*) ou six semaines (*M. polymorpha*) après repiquage.

Trans-complémentation du mutant *Atcyp73a5*

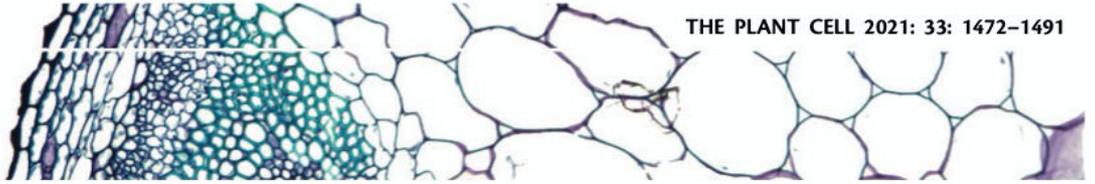
Les séquences codantes de *AtCYP73A5*, *PpCYP73A48* et *PpCYP73A49* ont d'abord été amplifiées par PCR et clonées dans le vecteur pDONR207, puis dans le vecteur pCC01061 (Weng *et al.*, 2011), respectivement par une recombinaison BP et LR (Gateway® ; ThermoFisher Scientific) selon les instructions du fabricant. Les plasmides obtenus ont été

utilisés pour transformer *A. tumefaciens* (souche C58C1) par électroporation. Une colonie unique transformée d'*A. tumefaciens* a été utilisée pour la transformation de la lignée mutante *cyp73a5-1* d'*A. thaliana* (GK_753B06 ; écotype Col-0 ; Rosso *et al.*, 2003 par la méthode du « floral dip » selon le protocole de Clough et Bent (1998). La mutation *cyp73a5-1* étant quasi-létale à l'état homozygote, des plantes *cyp73a5-1* hétérozygotes ont été transformées. Les transformants ont été sélectionnés sur la base de leur résistance à la kanamycine, puis repiqués et cultivés individuellement. Les transformants homozygotes pour l'allèle mutant *cyp73a5-1* ont été identifiés par PCR. Des plantes de génération T3 homozygotes pour l'insert et pour la mutation *cyp73a5-1* ont été utilisées pour les expériences.

**Function of the HYDROXYCINNAMOYL-CoA:SHIKIMATE
HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE is evolutionarily
conserved in embryophytes**

Cet article paru dans le journal *The Plant Cell* en janvier 2021 est issu d'une partie du travail de thèse de Lucie Kriegshauser à l'IBMP (2015-2018). J'ai contribué à ces travaux dans une première partie de ma thèse, notamment par :

- La reconstruction de voies métaboliques en levure
- Le screening exhaustif des BAHDs de *Physcomitrium patens* en levure
- La caractérisation biochimique des lignées mutantes
- La réflexion globale du projet



Function of the HYDROXYCINNAMOYL-CoA:SHIKIMATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE is evolutionarily conserved in embryophytes

Lucie Kriegshauser ¹, Samuel Knosp ¹, Etienne Grienenberger ¹, Kanade Tatsumi ¹,
Desirée D. Gütle ², Iben Sørensen ³, Laurence Herrgott ¹, Julie Zumsteg ¹, Jocelyn K.C. Rose ³,
Ralf Reski ^{2,4}, Danièle Werck-Reichhart ¹ and Hugues Renault ^{1,*†}

1 Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, University of Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

2 Plant Biotechnology, Faculty of Biology, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

3 Plant Biology Section, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

4 CIBSS—Centre for Integrative Biological Signaling Studies, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

*Author for correspondence: renault@unistra.fr

†Senior author.

L.K. and H.R. designed the research. L.K., S.K., E.G., K.T., D.G., I.S., L.H., J.Z., and H.R. performed the research. L.K. and H.R. analyzed the data. L.K. and H.R. wrote the manuscript with critical input of J.K.C.R., R.R., and D.W.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (<https://academic.oup.com/plcell>) is: Hugues Renault (renault@unistra.fr).

Abstract

The plant phenylpropanoid pathway generates a major class of specialized metabolites and precursors of essential extracellular polymers that initially appeared upon plant terrestrialization. Despite its evolutionary significance, little is known about the complexity and function of this major metabolic pathway in extant bryophytes, which represent the non-vascular stage of embryophyte evolution. Here, we report that the *HYDROXYCINNAMOYL-CoA:SHIKIMATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE* (*HCT*) gene, which plays a critical function in the phenylpropanoid pathway during seed plant development, is functionally conserved in *Physcomitrium patens* (*Physcomitrella*), in the moss lineage of bryophytes. Phylogenetic analysis indicates that *bona fide* *HCT* function emerged in the progenitor of embryophytes. *In vitro* enzyme assays, moss phenolic pathway reconstitution in yeast and *in planta* gene inactivation coupled to targeted metabolic profiling, collectively indicate that *P. patens* *HCT* (*PpHCT*), similar to tracheophyte *HCT* orthologs, uses shikimate as a native acyl acceptor to produce a *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate intermediate. Phenotypic and metabolic analyses of loss-of-function mutants show that *PpHCT* is necessary for the production of caffeate derivatives, including previously reported caffeoyl-threonate esters, and for the formation of an intact cuticle. Deep conservation of *HCT* function in embryophytes is further suggested by the ability of *HCT* genes from *P. patens* and the liverwort *Marchantia polymorpha* to complement an *Arabidopsis thaliana* CRISPR/Cas9 *hct* mutant, and by the presence of phenolic esters of shikimate in representative species of the three bryophyte lineages.

Introduction

Land colonization by plants, about 500 million years ago (Wickett et al., 2014; Puttick et al., 2018; Morris et al., 2018), was one of the most important evolutionary events associated with terraformation. Through photosynthetic activity and rock weathering, early land plants contributed to the rise of atmospheric oxygen, carbon sequestration, and the development of soils (Retallack, 1997; Lenton et al., 2016; Porada et al., 2016). Plant settlement on land therefore paved the way for the development of rich terrestrial ecosystems and the emergence of new life forms (Kenrick and Crane, 1997).

This transition from water to land exposed plants to challenging terrestrial conditions, such as drought, harmful levels of solar (UV) radiation, lack of buoyancy, extended temperature range, and novel pathogenic microorganisms (Rensing et al., 2008; de Vries and Archibald, 2018). Successful land colonization thus required specific developmental and metabolic adaptations (Reski, 2018). The formation of extracellular, or apoplastic, protective barriers was probably one of the most critical innovations of land plants, as they shield cells from damaging environmental conditions and allow the formation of specialized structures required for water and nutrient management (e.g. cuticles and vasculature). In angiosperms, such structures are essentially comprised of four canonical hydrophobic biopolymers—cutin, suberin, sporopollenin, and lignin—that reinforce and waterproof the polysaccharide-based cell wall (Nawrath et al., 2013).

Some precursors of these polymers are generated through the phenylpropanoid pathway, one of the most important branches of so-called plant specialized metabolism, which also allows the accumulation of powerful UV screens and antioxidants (Vogt, 2010; Weng and Chapple, 2010; Renault et al., 2019). The ability to synthesize phenylpropanoids evolved during the course of terrestrialization and is often regarded as a key adaptation by plants to life on land (Weng and Chapple, 2010; de Vries et al., 2017; Renault et al., 2019). The most common products generated by the phenylpropanoid pathway—flavonoids, soluble phenolic esters, and biopolymer precursors—all derive from *p*-coumaroyl-CoA (Figure 1, A). This hub molecule is produced through the activities of three essential enzymes in the initial steps of the phenylpropanoid pathway: phenylalanine ammonia-lyase; cinnamate 4-hydroxylase (C4H), which belongs to cytochrome P450 family 73 (CYP73); and 4-coumarate:CoA ligase (4CL; Figure 1, A). In flowering plants, further functionalization of the phenolic ring requires shikimate ester intermediates and a two-enzyme module involving hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT), which catalyzes transfer of the *p*-coumaroyl moiety from *p*-coumaroyl-CoA to shikimate (Hoffmann et al., 2003, 2004), and a second cytochrome P450, *p*-coumaroyl-shikimate 3'-hydroxylase (C3'H or CYP98), to generate caffeoyl-shikimate (Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002; Alber et al., 2019; Figure 1, A). HCT was shown to transfer the caffeoyl moiety back to coenzyme A

to form caffeoyl-CoA in vitro (Hoffmann et al., 2003; Vanholme et al., 2013). Later studies reported the existence of a second route toward caffeoyl-CoA in flowering plants, involving the combined action of caffeoyl shikimate esterase (CSE) and 4CL (Vanholme et al., 2013; Saleme et al., 2017; Ha et al., 2016; Figure 1, A). Recently, a bifunctional *p*-coumarate 3-hydroxylase/ascorbate peroxidase (C3H/APX) was also characterized, revealing a metabolic shunt for phenolic ring 3-hydroxylation, directly from free *p*-coumaric acid (Barros et al., 2019; Figure 1, A).

HCT belongs to clade V of the BAHD acyltransferase superfamily, which features enzymes that use coenzyme A-activated acyl donors and chemically diverse acceptors, such as organic acids, amines, or fatty acids (D'Auria, 2006). Clade V also includes the closely related enzymes hydroxycinnamoyl-CoA:quininate hydroxycinnamoyl transferases (HQT), which use quinate as a preferred acceptor, rather than shikimate. HQT is involved in the production of chlorogenic acids (caffeoyl-quinates), which are widespread among angiosperms, though absent from *Arabidopsis thaliana* (Niggeweg et al., 2004; Guo et al., 2014). Unlike caffeoyl-shikimate, caffeoyl-quininate is not considered to be a key intermediate in lignin biosynthesis, but rather involved in responses to biotic and abiotic stressors, especially UV radiation (Niggeweg et al., 2004; Clé et al., 2008). An investigation of HCT catalytic properties revealed broad acceptor substrate permissiveness, extending beyond shikimate (Hoffmann et al., 2003, 2004; Sander and Petersen, 2011; Eudes et al., 2016). However, structural studies of HCT/HQT uncovered key amino acid residues that control shikimate and/or quinate acylation, thereby specifying the two types of enzymes (Lallemant et al., 2012; Levsh et al., 2016; Chiang et al., 2018). HCT represents a pivotal step in controlling lignin biosynthesis and composition, as demonstrated by HCT silencing studies in seed plants that consistently alter lignin content and/or composition, and often lead to adverse effects on growth (Hoffmann et al., 2004; Besseau et al., 2007; Wagner et al., 2007; Gallego-Giraldo et al., 2011).

Bryophytes and charophyte algae, the embryophyte sister group, are devoid of lignin, although some of them seem to possess parts of the genetic toolkit required to synthesize phenolic intermediates (de Vries et al., 2017; Renault et al., 2019; Jiao et al., 2020). The nature and role of such early phenylpropanoid derivatives are poorly documented. We recently showed through a molecular genetic approach, targeting the *Physcomitrium patens* (Physcomitrella) CYP98 gene, that a moss phenylpropanoid pathway is involved in the synthesis of caffeate precursors necessary to support cuticular biopolymer formation and erect (3D) growth (Renault et al., 2017). The major acylated products formed by the moss were shown to be threonate esters (*p*-coumaroyl-threonate and caffeoyl-threonate), while shikimate and quinate esters were not detected (Renault et al., 2017). However, a survey of embryophyte CYP98 substrate preference in vitro showed that the moss enzyme poorly converts *p*-coumaroyl-threonates, compared with *p*-coumaroyl-

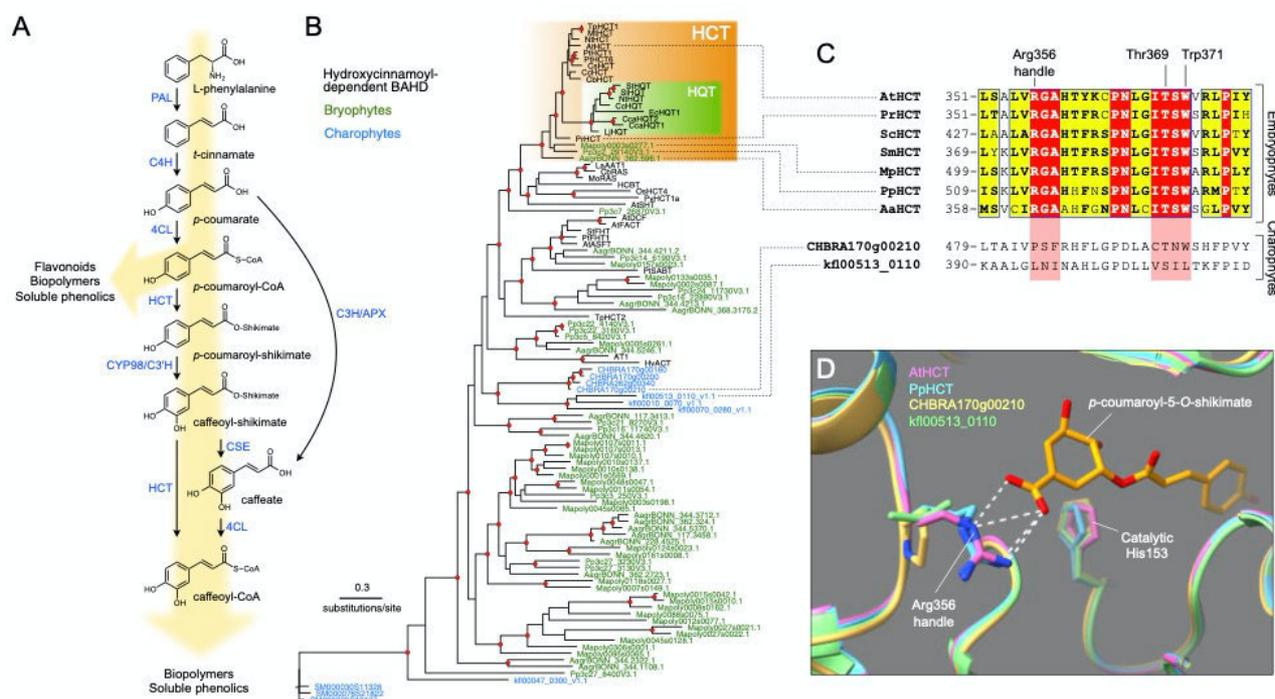


Figure 1 Evolutionary history of the HCT gene family. **A**, Schematic representation of the phenylpropanoid pathway of angiosperms leading to caffeoyl-CoA. Enzyme names are indicated in blue. PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate:CoA ligase; HCT, hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase; C3H/APX, *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase/ascorbate peroxidase; CSE, caffeoyl-shikimate esterase; CYP98/C3H, *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase/ascorbate peroxidase. **B**, Unrooted protein tree describing the phylogenetic relationships between 34 hydroxycinnamoyl-CoA-dependent BAHD acyltransferases of known biochemical function and all BAHDs from *K. nitens*, *C. braunii*, *S. muscicola*, *P. patens*, *M. polymorpha*, and *A. agrestis*. The tree is drawn to scale. Red dots indicate a maximum-likelihood ratio test branch support ≥ 0.80 . Lists of characterized and uncharacterized BAHD proteins are available in [Supplemental Tables S1, S2](#), respectively. **C**, Multiple sequence alignment highlighting the region comprising the three residues controlling shikimate acylation in selected HCT orthologs from the five major embryophyte groups. Corresponding regions from charophyte HCT homologs are displayed at the bottom for comparison. ScHCT, *Salvinia cucullata Sacu_v1.1_s0010.g004618*; SmHCT, *Selaginella moellendorffii 152997*. Red box/white character, strict identity; yellow box/black bold character, in-group similarity score > 0.7 ; blue frame/yellow box, cross-group similarity score > 0.7 . **D**, Overlay of protein three-dimensional structures depicting the Arg356 handle interaction with shikimate. Models of *P. patens* (PpHCT, Pp3c2_29140, blue), *C. braunii* (CHBRA170g00210, yellow), and *K. nitens* (klf00513_0110, green) HCT homologs were reconstructed using the crystal structure of AtHCT in complex with *p*-coumaroyl-5-O-shikimate (PDB entry: 5kju; pink). Residues are numbered according to AtHCT. White dashed lines represent predicted hydrogen bonds

shikimate (Alber et al., 2019), leaving the nature of the native pathway intermediates in the moss unclear. Here, we sought to address this question by performing a functional analysis of a candidate *P. patens* HCT gene, which encodes the enzyme generating the CYP98 substrate. Combining in silico, in vitro, and in vivo analyses, we demonstrate conservation of HCT catalytic properties and physiological function across the 500 million years of embryophyte evolution.

Results

A bona fide HCT gene emerged in an embryophyte progenitor and was subsequently conserved

We performed a search for potential HCT genes in fully sequenced charophyte and bryophyte genomes. All BAHD acyltransferase protein sequences from the charophytes *Klebsormidium nitens* (Klebsormidiophyceae), *Chara braunii* (Characeae), and *Spiroglaea muscicola*, (Zygnematophyceae) and from the bryophytes *P. patens* (moss), *Marchantia polymorpha* (liverwort), and *Anthoceros agrestis* (hornwort) were

aligned with 34 already characterized hydroxycinnamoyl-CoA-dependent BAHD transferases prior to phylogeny reconstruction (complete lists in [Supplemental Tables S1, S2](#)). The resulting protein tree structure revealed a well-supported HCT clade with single members for each bryophyte species at its root (Figure 1, B). The angiosperm-specific HQT proteins clustered as a sister group to angiosperm HCTs, suggesting they originated from HCT duplication (Figure 1, B). BAHD enzymes from the charophytes *C. braunii* and *K. nitens* were not closely associated with HCTs, but rather clustered as a sister group to characterized hydroxycinnamoyl-CoA-dependent BAHD. Proteins from the Zygnematophyceae *S. muscicola* were found to be even more divergent from characterized HCT proteins (Figure 1, B and [Supplemental Data Set S1](#)). Multiple protein alignment revealed a strict conservation in representative embryophyte HCTs of the three residues (Arg356, Thr369, and Trp371) previously shown to be critical for HCT activity (Lallemand et al., 2012; Levsh et al., 2016; Chiang et al., 2018), whereas their conservation was only partial in

charophyte homologs (Figure 1, C and Supplemental Figure S1). More particularly, the Arg356 handle was absent from charophyte BAHDs (Figure 1, C and Supplemental Figure S1). Finer details were gained through homology-modelling of HCT candidate proteins from *P. patens* (PpHCT, Pp3c2_29140), *C. braunii* (CHBRA170g00210), and *K. nitens* (kfl00513_0110) using the crystal structure of *A. thaliana* AtHCT in complex with *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate as a template. The predicted protein structures indicated that, similar to AtHCT, PpHCT binds the shikimate carboxyl group through an arginine handle (Figure 1, D). In charophyte proteins, the critical arginine residue was replaced by proline (CHBRA170g00210) or leucine (kfl00513_0110), neither of which is predicted to form hydrogen bonds with shikimate (Figure 1, D). Taken together, these data point to the emergence of *bona fide* HCT genes in the last common ancestor of embryophytes about 500 Ma, concurrently with the appearance of cuticles (Philippe et al., 2020) and prior to the capacity to produce the phenolic biopolymer lignin.

PpHCT is co-expressed with the *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase PpCYP98

We then undertook a functional study of the *P. patens* HCT candidate gene (PpHCT, Pp3c2_29140) identified in the phylogenetic analysis. First, we used publicly available co-expression data derived from the *P. patens* gene atlas project (Perroud et al., 2018). This indicated that the expression profile of PpHCT is tightly correlated with those of two genes encoding enzymes flanking the HCT step, potentially forming a core enzymatic module in the moss phenolic pathway: 4-coumarate-CoA ligase 1 (Pp4CL1; Pp3c18_6360; Silber et al., 2008) and the functionally characterized PpCYP98 (Pp3c22_19010; Renault et al., 2017; Figures 1, A and 2, A). These data were supported by our RT-qPCR analysis, which showed higher (at least four-fold) expression levels of all three genes in gametophores than in protonema (Figure 2, B). To increase the spatial resolution of the PpHCT expression analyses, we generated knock-in PpHCT:*uidA* reporter lines by homologous recombination (Supplemental Figure S2). GUS staining was restricted to the apex of both young and old gametophores (Figure 2, C), which is very similar to the previously reported PpCYP98:*uidA* GUS staining profile (Renault et al., 2017).

PpHCT demonstrates substrate permissiveness in vitro

Previous data suggested that phenolic esters of threonic acid are the most likely intermediates in the *P. patens* phenylpropanoid pathway (Renault et al., 2017). Accordingly, we hypothesized that PpHCT generates *p*-coumaroyl-threonate from *p*-coumaroyl-CoA and L-threonic acid, and we tested this with in vitro assays using recombinant PpHCT expressed in *Escherichia coli*. We observed that PpHCT produced mainly *p*-coumaroyl-4-*O*-threonate and a minor amount of *p*-coumaroyl-2-*O*-threonate in vitro, indicative of substantial regioselectivity (Figure 3, A and B). We then tested shikimic acid and quinic acids as acyl acceptors, since they are native and accepted substrates of tracheophyte HCTs, respectively

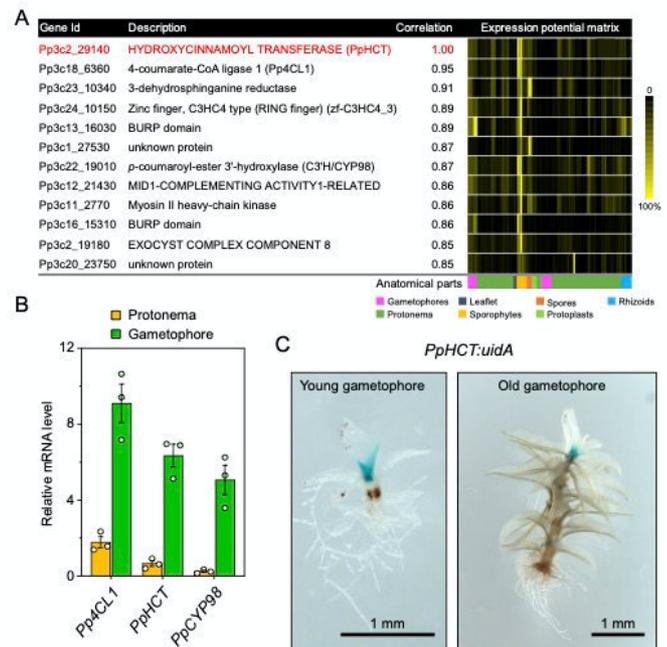


Figure 2 PpHCT co-expression network and expression pattern. A, List of genes co-expressed with PpHCT (Pp3c2_29140). Each element of the matrix represents the expression potential (% of maximum expression across the matrix) of a given gene (line) in a defined condition (column) derived from various anatomical parts. Data are retrieved from the *P. patens* gene atlas project (Perroud et al., 2018). B, RT-qPCR monitoring of Pp4CL1, PpHCT, and PpCYP98 expression in protonema and gametophore tissues. Data are the mean \pm SEM of three biological replicates derived from three independent cultures. C, GUS staining pattern in PpHCT:*uidA* lines indicating prominent expression in the apex of gametophores.

(Hoffmann et al., 2003; Chiang et al., 2018). PpHCT catalyzed the transfer of *p*-coumarate from *p*-coumaroyl-CoA to both of them (Figure 3, A). A strong regioselectivity favored the 5-position for shikimate and quinate acylation (Figure 3, A and B). We then investigated PpHCT acyl-CoA donor preference using end-point enzyme assays, testing all pairwise combinations of the donors *p*-coumaroyl-CoA, caffeoyl-CoA, and feruloyl-CoA with the acceptors threonate, shikimate, and quinate. As shown in Figure 3, C, PpHCT used all three acyl donors when shikimate was the acceptor, and the highest activity was observed with the combination of shikimate and feruloyl-CoA. PpHCT thus displayed significant donor and acceptor permissiveness. This was more pronounced with *p*-coumaroyl-CoA, the *P. patens* native acyl donor, which in addition was the only donor that coupled with threonate (Figure 3, C). A striking difference between PpHCT and orthologs from vascular plants is the presence of a 144-amino acid flexible loop joining the two main folded domains of the protein (Supplemental Figure S3). To test the effect of this loop on enzyme activity, a truncated version of PpHCT lacking the internal loop domain was produced in *E. coli* (Supplemental Figure S4). The truncation did not affect substrate preference; however, it caused a minor decrease in activity with threonate as the acceptor,

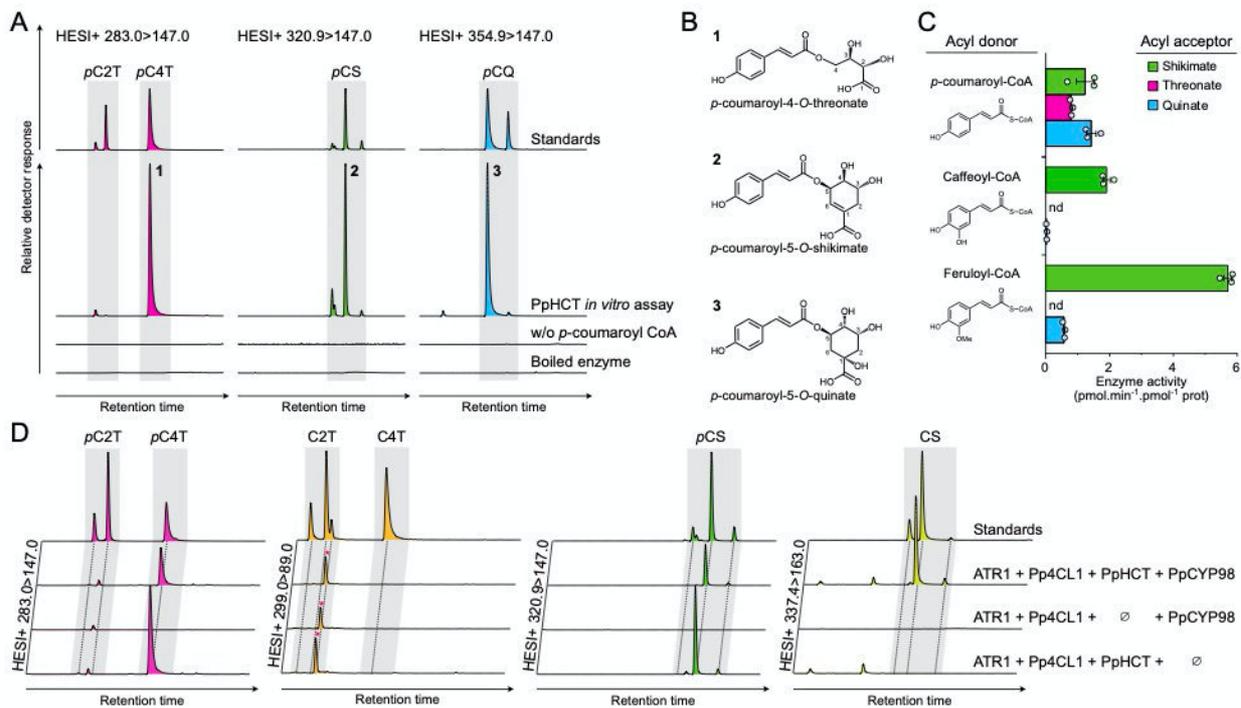


Figure 3 Investigation of recombinant PpHCT catalytic properties. A, Overlay of UHPLC–MS/MS chromatograms showing the production of *p*-coumaroyl esters by PpHCT in vitro. The recombinant protein was incubated with *p*-coumaroyl-CoA and one of the three different acyl acceptors: quinate, shikimate or threonate. Assays with boiled enzyme or without *p*-coumaroyl-CoA were used as controls. *p*C2T, *p*-coumaroyl-2-*O*-threonate; *p*C4T, *p*-coumaroyl-4-*O*-threonate; *p*CS, *p*-coumaroyl-shikimate; *p*CQ, *p*-coumaroyl-quinate. B, Structures of the main *p*-coumaroyl esters detected and numbered in (A). C, PpHCT activity for all pairwise combinations involving *p*-coumaroyl-CoA, caffeoyl-CoA and feruloyl-CoA as acyl donor, together with quinate, threonate and shikimate as an acyl acceptor. Enzyme activity was calculated based on end-point assays analyzed by HPLC–UV. Data are the mean ± SEM of three independent enzyme assays. nd, not detected. D, Overlay of UHPLC–MS/MS chromatograms showing the production of phenolic esters in whole-cell assays using engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing different combinations of *Pp4CL1*, *PpHCT*, *PpCYP98*, and *ATR1* genes. *p*-coumaroyl-threonates (*p*C2T, *p*C4T), caffeoyl-threonates (C2T, C4T), *p*-coumaroyl-shikimates (*p*CS), and caffeoyl-shikimates (CS) esters were simultaneously analyzed from yeast culture supplemented with *p*-coumarate and L-threonate using HESI + MRM methods. Y-axes of yeast extract chromatographs are linked to show each phenolic ester. For caffeoyl-threonate, a nonspecific signal was detected regardless of the gene set (red asterisks).

without altering the shikimate and quinate acylation activity (Supplemental Figure S4).

PpHCT kinetic parameters largely favor shikimate acylation

To gain deeper insights into PpHCT catalytic properties, enzyme kinetic parameters were determined from activity saturation curves and Michaelis–Menten nonlinear regression (Supplemental Figure S5). We focused the kinetic analysis on the three acyl acceptors, threonate, quinate, and shikimate, and on the native acyl donor *p*-coumaroyl-CoA. The results, summarized in Table 1, revealed an obvious preference of PpHCT for shikimate as an acyl acceptor, in terms of affinity (K_m : 0.22 mM) and velocity (k_{cat} : 5.1 s⁻¹), compared with threonate (K_m : 17.2 mM, k_{cat} : 0.16 s⁻¹). The calculated catalytic efficiency with shikimate (k_{cat}/K_m) was ~2,500-fold higher than with threonate (Table 1). PpHCT activity with quinate was mixed, exhibiting low affinity (K_m : 9.4 mM) but a rather high velocity (k_{cat} : 3.5 s⁻¹). PpHCT affinity for *p*-coumaroyl-CoA was 60 μM when shikimate was used as acceptor, a value seven times lower than when

threonate was used as an acceptor (Table 1). PpHCT kinetic parameters with shikimate were found overall to be similar to those of angiosperm orthologs (Hoffmann et al., 2003; Levsh et al., 2016).

The PpHCT kinetic parameters suggest that threonate would need to be present in much higher concentrations than shikimate in *P. patens* to be used as a substrate by PpHCT. To investigate this hypothesis, we first determined the absolute levels of the three potential acyl acceptors, (–)-shikimate, D-quinate, and L-threonate, in the gametophyte of the three bryophytes *P. patens*, *A. agrestis*, and *M. polymorpha*, and in the angiosperm *A. thaliana* by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC)–mass spectrometry (MS)/MS (see the “Materials and Methods” section). Levels of L-phenylalanine, the amino acid that initiates the phenylpropanoid pathway, and L-malate, an intermediate of the Krebs cycle, were simultaneously measured and served as metabolic benchmarks. Metabolic profiling revealed a higher level of threonate in *P. patens* than in the other species, while phenylalanine and malate levels remained similar among them (Supplemental Table S3). At

Table 1 Summary of PpHCT kinetic parameters

Substrates		K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
Fixed	Variable			
<i>p</i> -coumaroyl-CoA	Threonate	17.2 (14.9–19.9)	0.16 (0.15–0.17)	9
	Shikimate	0.22 (0.17–0.29)	5.1 (4.8–5.4)	23,005
	Quinate	9.4 (6.7–13.7)	3.5 (3.0–4.2)	368
Threonate	<i>p</i> -coumaroyl-CoA	0.43 (0.27–0.76)	0.18 (0.14–0.25)	407
Shikimate	<i>p</i> -coumaroyl-CoA	0.06 (0.03–0.10)	17.0 (14.1–20.7)	283,333

Enzyme affinity (K_m) and velocity (k_{cat}) constants were determined from PpHCT activity saturation curves, based on nonlinear Michaelis–Menten regression (see the “Materials and methods” section; Supplemental Figure S5). Results are the means of three independent enzyme reactions; 95% confidence intervals (profile likelihood) are provided within brackets.

the level of the whole *P. patens* gametophore, threonate was found to be ~250 times more abundant than shikimate; in the other species, the threonate/shikimate ratio ranged from 0.1 to 2 (Supplemental Table S3). Concentrations and ratios of these compounds might however differ in specific tissues, cell types or subcellular compartments. Quinate was not detected in any of the plant extracts, in accordance with the absence of a *bona fide* quinate dehydrogenase in the investigated species (Guo et al., 2014; Carrington et al., 2018). To test whether a 250-fold excess in threonate would shift the equilibrium from shikimate to threonate acylation, we incubated recombinant PpHCT with *p*-coumaroyl-CoA in the presence of 2.5-mM L-threonate and 10- μ M (–)-shikimate, recapitulating a 250:1 molar ratio of competing substrates in vitro. Under these conditions, PpHCT activity was 37 times higher with shikimate than with threonate as an acyl acceptor (Supplemental Figure S6). These results confirm that the catalytic properties of PpHCT favor shikimate acylation, even in the presence of a far higher concentration of threonate.

Reconstitution of the moss phenolic pathway in yeast

The in vivo functionality of PpHCT and its ability to operate with potential partner enzymes were investigated in engineered *Saccharomyces cerevisiae* co-expressing Pp4CL1, PpHCT, and PpCYP98, as well as *A. thaliana* ATR1 (At4g24520) encoding a P450 reductase to ensure sufficient electron supply to PpCYP98 (Urban et al., 1997). Since *S. cerevisiae* does not naturally synthesize phenylpropanoids or threonate, we supplemented the yeast culture media with *p*-coumarate and L-threonate 6 h after the onset of galactose-induced recombinant protein production. UHPLC–MS/MS analysis of yeast culture extracts revealed the production of *p*-coumaroyl-4-*O*-threonate but not *p*-coumaroyl-2-*O*-threonate (Figure 3, D), consistent with PpHCT having a strong regioselectivity. Notably, caffeoyl-threonate was not detected in the yeast culture extracts (Figure 3, D). *Saccharomyces cerevisiae* synthesizes shikimate as an intermediate of aromatic amino acid biosynthesis and, accordingly, we detected *p*-coumaroyl-shikimate in extracts of all PpHCT-expressing yeast strains (Figure 3, D), which confirmed PpHCT promiscuity in vivo. Caffeoyl-shikimate was

readily detected in the yeast extracts, indicating that shikimate esters were intermediates, allowing an effective coupling of PpHCT and PpCYP98 activities (Figure 3, D). The major *p*-coumaroyl ester isomers produced in yeast were similar to those predominantly generated by PpHCT in vitro (Figure 3, B). In parallel, we used the yeast platform to assess the catalytic activity of the *K. nitens* HCT homolog kfl00513_0110 (see Figure 1), and found that it did not lead to the production of detectable *p*-coumaroyl-shikimate when co-expressed with Pp4CL1, PpCYP98, and ATR1 (Supplemental Figure S7). This supports the idea that charophyte HCT homologous proteins do not act as canonical HCT enzymes.

PpHCT efficiently converts caffeoyl-5-*O*-shikimate into caffeoyl-CoA in vitro

Earlier work on recombinant proteins from *Nicotiana tabacum* and Arabidopsis showed that, in vitro, HCT catalyzes the conversion of caffeoyl-5-*O*-quininate or caffeoyl-5-*O*-shikimate into caffeoyl-CoA, using coenzyme A as acyl acceptor (Hoffmann et al., 2003; Vanholme et al., 2013)—a reaction hereafter referred to as the HCT reverse reaction (Figure 4, A). However, there has subsequently been little additional experimental support for the existence of this reaction, in particular in plant lineages other than angiosperms. We therefore tested in vitro the ability of recombinant PpHCT to catalyze the production of caffeoyl-CoA from caffeoyl esters. We first developed a sensitive HPLC–UV method that provides a linear response to caffeoyl-CoA (Figure 4, B; see the “Materials and Methods” section). We then performed in vitro assays with recombinant PpHCT, using coenzyme A as acyl acceptor and either caffeoyl-5-*O*-shikimate or caffeoyl-5-*O*-quininate as acyl donors. Caffeoyl-threonates, which are not commercially available and are not synthesized efficiently by CYP98 enzymes in vitro (Alber et al., 2019), could not be tested as substrates. HPLC–UV analysis of enzyme reaction products showed a sharp decrease of caffeoyl-5-*O*-shikimate in the PpHCT assay with a concomitant appearance of a peak that was identified as caffeoyl-CoA, based on retention time and absorbance spectrum comparison with an authentic standard (Figure 4, C and D). Minor amounts of additional caffeoyl-shikimate isomers were present in the reaction, but were not effectively metabolized by PpHCT

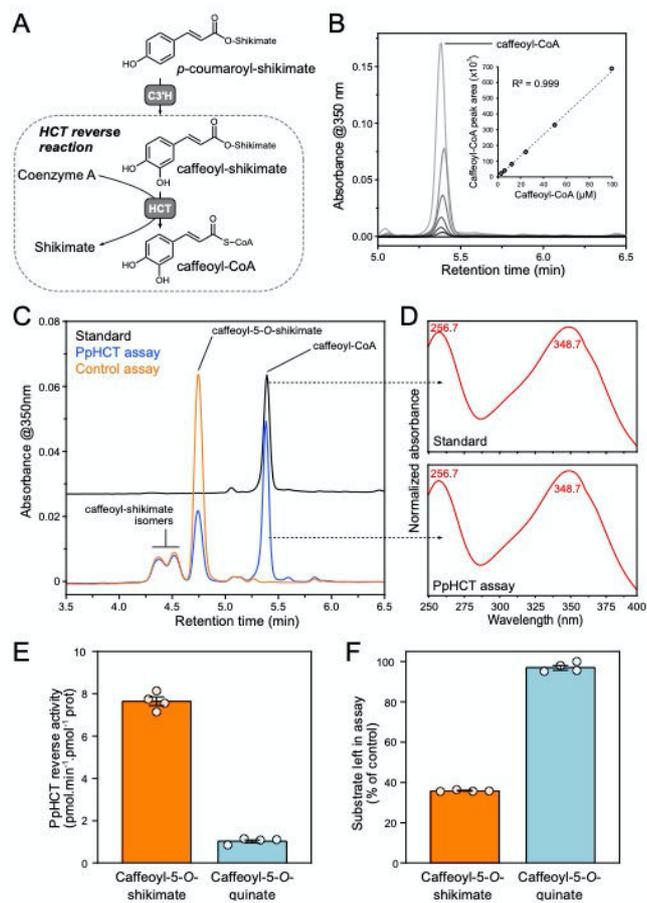


Figure 4 Investigation of the HCT reverse reaction in vitro. **A**, Scheme depicting the HCT reverse reaction that leads from caffeoyl-shikimate to caffeoyl-CoA thioester. **B**, HPLC–UV detection of authentic caffeoyl-CoA molecule at 350 nm and associated calibration curve exhibiting linearity over at least three orders of concentration. **C**, Representative HPLC–UV chromatograms showing the conversion of caffeoyl-5-*O*-shikimate into caffeoyl-CoA by PpHCT in vitro. Control assay was performed with boiled PpHCT enzyme. **D**, Absorbance spectrum from 240 to 400 nm of PpHCT assay and caffeoyl-CoA standard peaks. Wavelengths corresponding to maximum absorbance are indicated. **E**, PpHCT reverse activity with caffeoyl-5-*O*-shikimate or caffeoyl-5-*O*-quininate as acyl donor. **F**, Relative level of caffeoyl-5-*O*-shikimate and caffeoyl-5-*O*-quininate left in PpHCT assay (% of control assay). Data are the mean \pm SEM of four independent enzyme assays.

(Figure 4, C). Based on caffeoyl-CoA production, PpHCT reverse activity with caffeoyl-5-*O*-shikimate as an acyl donor was comparable to that of the conjugating activity producing *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate. However, PpHCT reverse activity using caffeoyl-5-*O*-quininate as an acyl donor was seven times lower (Figure 4, E), and this result was confirmed by the amount of caffeoyl esters remaining at the end of the enzyme assay (Figure 4, F).

PpHCT produces *p*-coumaroyl-shikimate in planta as a precursor of caffeate derivatives

Next, we generated four independent *PpHCT* deletion mutants ($\Delta PpHCT$) via homologous recombination

(Figure 5, A and Supplemental Figure S8) in order to address the in planta function of *PpHCT*. The four $\Delta PpHCT$ lines lacked full-length *PpHCT* transcripts (Figure 5, B), leading to a complete abolishment of HCT activity in gametophore protein extracts (Figure 5, C). The $\Delta PpHCT$ lines phenocopied $\Delta PpCYP98$ mutants (Renault et al., 2017) and newly reported *PpHCT* loss-of-function mutant *Ppnog2-R* (Moody et al., 2020), characterized by defective gametophore development (Figure 5, D–F and Supplemental Figure S8). UV-fingerprinting of gametophore metabolite extracts revealed the absence of major peaks in the $\Delta PpHCT$ mutant chromatogram (Figure 5, G). This low-resolution UV analysis was refined by targeted UHPLC–MS/MS analysis, which revealed both qualitative and quantitative differences in threonate esters. As expected, if *PpHCT* generates the substrate(s) of *PpCYP98*, caffeoyl-threonates were absent from $\Delta PpHCT$ (Figure 5, H). Unexpectedly, however, levels of *p*-coumaroyl-threonate esters were higher in the $\Delta PpHCT$ lines (Figure 5, H). Taken together, these data suggest that *p*-coumaroyl-threonate esters are not (i) derived from *PpHCT* activity, implying the existence of another dedicated enzyme in *P. patens* or (ii) the native substrates of *PpCYP98*, although they could be metabolized in vitro (Renault et al., 2017). We addressed the identity of this putative enzyme by testing the ability of each of the twelve full-length, expressed BAHD proteins from *P. patens* to catalyze the formation of *p*-coumaroyl-threonate in yeast. Only *PpHCT* was found to catalyze threonate acylation (Supplemental Figure S9, A). This result was corroborated by in vitro assays with protein extracts from *P. patens* gametophores, which did not yield detectable *p*-coumaroyl-4-*O*-threonate (Supplemental Figure S9, B). Next, to investigate the existence of potentially overlooked hydroxycinnamoyl intermediates, and in particular caffeoyl conjugates, gametophore extracts were submitted to acid hydrolysis to release hydroxycinnamate moieties prior to UHPLC–MS/MS analysis. Caffeate was not detected in mutant gametophore hydrolyzed extracts (Figure 5, I). This result indicates that *PpHCT* provides the only route toward caffeate derivatives in *P. patens*, in accordance with the absence of a *bona fide* *C3H/APX* gene in *P. patens* (Barros et al., 2019). A large increase in the amount of *p*-coumarate in hydrolyzed extracts (Figure 5, I) was consistent with the previously reported accumulation of *p*-coumaroyl-threonates in $\Delta PpHCT$ mutant lines (Figure 5, H). Taking advantage of the increased sensitivity and resolution provided by a new UHPLC–MS/MS analytical platform, we searched for shikimate esters in gametophore extracts in which we had not detected these compounds previously (Renault et al., 2017). To improve the detection threshold, extracts were also concentrated five-fold, and under these conditions we detected *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate in gametophore extracts from wild-type *P. patens*, but not in those from $\Delta PpHCT$ (Figure 5, J and K). The results were orthogonally validated by both retention time comparison with molecular standards and two different mass transitions in positive and negative modes (signal-to-noise ratio > 80). Taken together,

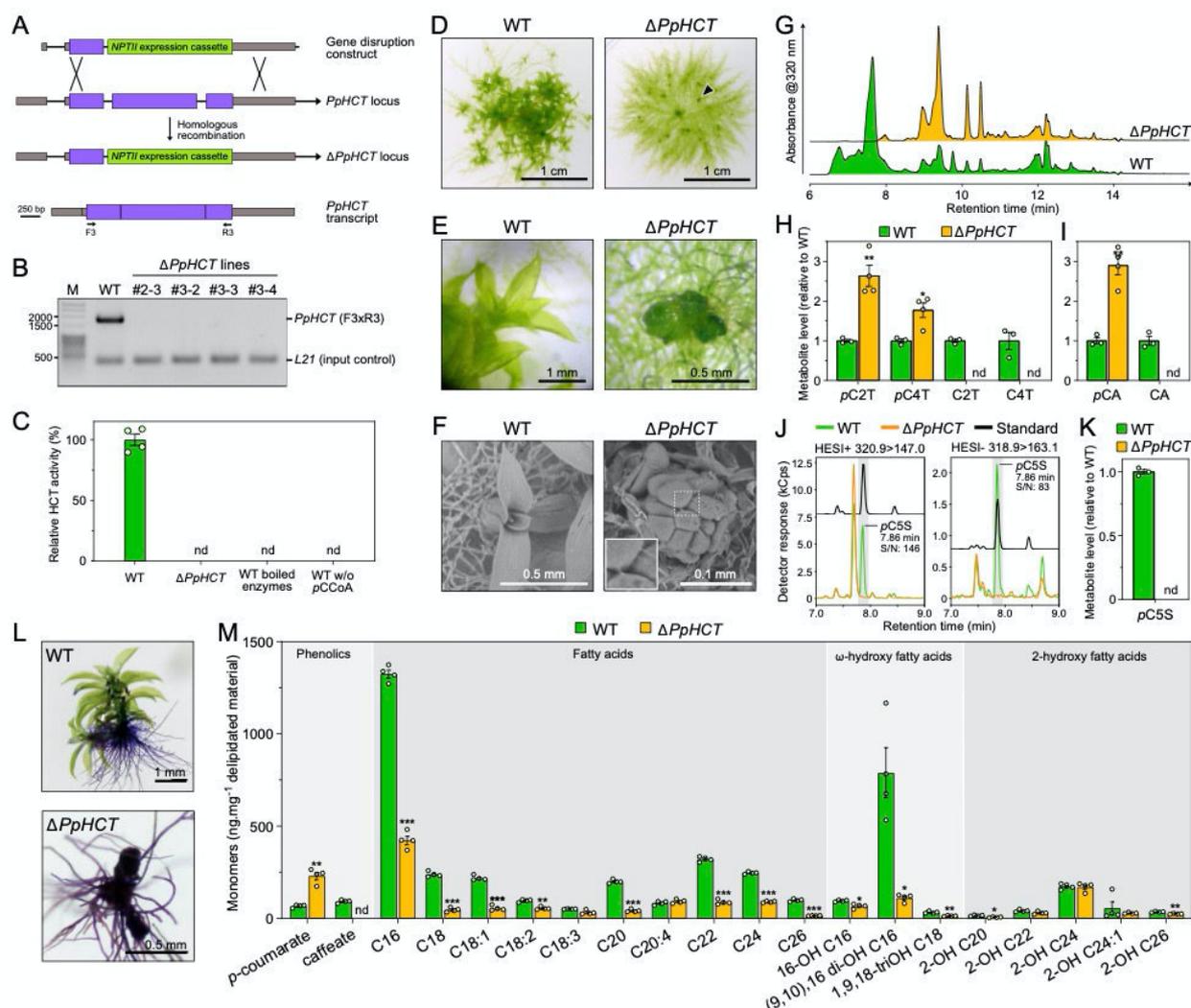


Figure 5 Investigation of *PpHCT* function *in planta*. **A**, Homologous recombination-mediated strategy for *PpHCT* gene disruption. A genomic fragment encompassing the second and third *PpHCT* exons was excised with simultaneous insertion of the *NPTII* selection cassette conferring resistance to G418. Binding sites of oligonucleotides used for characterization of the transgenic lines are shown. Gray box, UTR; black line, intron; purple box, exon. **B**, Agarose gel photograph produced from RT-PCR analysis reporting the absence of *PpHCT* transcripts in the four $\Delta PpHCT$ KO lines. M, DNA size marker. **C**, HCT activity in protein extracts from wild-type (WT) and $\Delta PpHCT$ gametophores. HCT activity was measured *in vitro* using shikimate and *p*-coumaroyl-CoA as substrates. Negative WT control assays involved boiled protein extracts or omission of *p*-coumaroyl-CoA (*pCCoA*). Results are the mean \pm SEM of four independent enzyme assays, performed with protein extracts from each of the four independent $\Delta PpHCT$ mutant lines. nd, not detected. **D**, Phenotype of 4-week-old *P. patens* WT and $\Delta PpHCT$ colonies. Arrowhead points to a $\Delta PpHCT$ gametophore. **E**, Magnified image of gametophores visible in (D). **F**, SEM micrographs of 4-week-old gametophores. For $\Delta PpHCT$, inset shows intercellular adhesive structures (enlargement of boxed region). **G**, Representative HPLC-UV chromatograms of WT and $\Delta PpHCT$ gametophore extracts. **H**, Relative levels of phenolic threonate esters in gametophore extracts. *pC2T*, *p*-coumaroyl-2-*O*-threonate; *pC4T*, *p*-coumaroyl-4-*O*-threonate; *C2T*, caffeoyl-2-*O*-threonate; *C4T*, caffeoyl-4-*O*-threonate. **I**, Relative levels of free hydroxycinnamic acids in gametophore extracts after acid hydrolysis. *pCA*, *p*-coumaric acid; *CA*, caffeic acid. **J**, Overlay of representative UHPLC-MS/MS chromatograms showing the absence of *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate (*pCSS*) in $\Delta PpHCT$ gametophore extracts. Gray shaded regions highlight relevant elution time windows. **K**, Relative levels of *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate (*pCSS*) in gametophore extracts. Results are the mean \pm SEM of three independent WT biological replicates and four independent $\Delta PpHCT$ mutant lines. **L**, Toluidine blue staining of WT and a $\Delta PpHCT$ mutant. Protonema and rhizoids do not have a cuticle, and so are readily stained. **M**, Compositional analysis of WT and $\Delta PpHCT$ gametophore cuticular biopolymers. Data are the mean \pm SEM of four WT biological replicates and four independent $\Delta PpHCT$ mutant lines. WT versus mutant *t* test adjusted *P*-value: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

the metabolic analysis of the $\Delta PpHCT$ mutants confirmed that HCT has a key function in the production of caffeate derivatives in *P. patens* via the formation of a *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate intermediate and did not support the existence of alternative pathways.

PpHCT deficiency impairs cuticle development

A previous analysis of a $\Delta PpCYP98$ mutant led us to conclude that the availability of caffeate, or a derivative, is required for normal *P. patens* gametophore development and cuticle formation (Renault et al., 2017). Since $\Delta PpHCT$ lines

essentially phenocopied $\Delta PpCYP98$ at macroscopic and metabolic levels, we tested tissue surface permeability of mutant and WT gametophores using a toluidine blue staining assay, to assess for similar cuticle defects. The strong blue staining of the $\Delta PpHCT$ lines confirmed their increased surface permeability compared to WT (Figure 5, L and Supplemental Figure S8), consistent with reduced cuticle barrier properties associated with the $PpHCT$ deletion. We also characterized the monomeric composition of the cuticular biopolymer from the $\Delta PpHCT$ gametophore and found differences in aliphatic or phenolic components compared with WT (Figure 5, M). The $\Delta PpHCT$ cuticle appeared to be devoid of caffeate residues, but showed a three-fold increase in *p*-coumarate units compared with WT, consistent with the analysis of soluble phenolic compounds (Figure 5, H and I). This change in phenolic composition was accompanied by a substantial decrease in long-chain fatty acids (LCFAs) and ω -hydroxylated LCFA, especially in the two most abundant monomers, palmitic acid (C16) and (9,10),16 dihydroxypalmitic acid. A minor decrease in the total amounts of 2-OH-VLCFA (very-LCFAs), derived from membrane sphingolipids (Molina et al., 2006) indicated that plasma membranes were only slightly affected, in contrast to the cuticular biopolymer (Figure 5, M).

Conservation of HCT properties between bryophytes and angiosperms

Functional analysis of $PpHCT$ suggested that *HCT* function was conserved over the ~500 million years that span embryophyte evolution. To test this hypothesis, we first investigated in vitro the acyl acceptor permissiveness of recombinant *HCT* from *M. polymorpha* ($MpHCT$), which belongs to another major bryophyte group, and *A. thaliana* ($AtHCT$; Figure 6, A). In contrast to $PpHCT$ and $MpHCT$, $AtHCT$ activity using threonate as an acyl acceptor was barely detectable (Figure 6, A). However, all three proteins had in common a preference for shikimate or quinate as an acceptor, indicative of conservation of *HCT* enzyme properties in embryophytes (Figure 6, A). To further assess the functional conservation of *HCT* genes across embryophyte evolution, we conducted transcomplementation experiments. The first step was to generate an *A. thaliana hct* null mutant since only RNA-interference lines, with residual *HCT* expression, were available. Following a CRISPR/Cas9-mediated strategy, we isolated a mutant allele characterized by a deletion of seven nucleotides in the $AtHCT$ first exon, hereafter termed the hct^{D7} mutant (Figure 6, B), which introduces a frameshift leading to a premature stop codon.

We then transformed heterozygous $hct^{D7+/-}$ plants with $AtHCT$, $PpHCT$, and $MpHCT$ coding sequences under control of the *A. thaliana C4H* promoter, which efficiently drives gene expression in phenylpropanoid-accumulating tissues (Weng et al., 2008, 2011; Sibout et al., 2016; Alber et al., 2019), and selected plants homozygous for both hct^{D7} allele and complementation constructs (Figure 6, B). The $AtHCT$ null mutation led to reduced growth (Figure 6, C and D),

similar to previous observations of *HCT*-RNAi lines (Besseau et al., 2007; Li et al., 2010a), but this abnormal phenotype was entirely abolished by introducing an *HCT* coding sequence from *A. thaliana*, and almost completely in the case of $PpHCT$ or $MpHCT$ (Figure 6, C and D). Similar to *P. patens*, disruption of *HCT* function in Arabidopsis led to an increased permeability of aerial tissues to toluidine blue (Supplemental Figure S10). The *HCT* null mutation resulted in obvious changes in UV chromatograms (Supplemental Figure S11), which was confirmed by targeted analysis of diagnostic phenylpropanoid molecules. The targeted profiling revealed an 80-fold accumulation of *p*-coumaroyl-glucose in the hct^{D7} mutant compared with WT, while *p*-coumaroyl and caffeoyl esters of shikimate were absent from the mutant (Figure 6, E). Residual levels of sinapoyl-malate, the main soluble phenolic ester in *A. thaliana* leaves, were detected in hct^{D7} (~10% of wild-type level), possibly due to the alternative C3H/APX pathway using free *p*-coumarate, or promiscuous activities of C3H on accumulating *p*-coumaroyl esters (e.g. *p*-coumaroyl-glucose; Figure 6, F). The level of the main *A. thaliana* leaf flavonoid, the flavonol kaempferol 3-*O*-rhamnoside 7-*O*-rhamnoside (Li et al., 2010a; Yin et al., 2014), was slightly reduced in hct^{D7} compared with WT (Figure 6, E). This result does not match data from previous analyses of RNAi-*HCT* lines (Besseau et al., 2007; Li et al., 2010a), but is corroborated by HPLC-UV analysis indicating that no other phenylpropanoids, including flavonoids, overaccumulated in the hct^{D7} null mutant to levels similar to wild-type sinapoyl-malate under our growth conditions (Supplemental Figure S11). All hct^{D7} plant metabolic defects were, at least partially, complemented by transformation with $AtHCT$, $PpHCT$, or $MpHCT$ under the control of the $AtC4H$ promoter (Figure 6, E). In particular, the ability to synthesize *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate and caffeoyl-5-*O*-shikimate was restored in all the *HCT*-complemented lines (Figure 6, E), consistent with functional conservation of bryophyte and angiosperm *HCT* genes. Threonate esters were not detected in any of the investigated Arabidopsis genotypes. To further establish phenolic shikimate esters as conserved metabolic intermediates during embryophyte evolution, we checked for their presence in representative species of the three major bryophyte lineages. In addition to *P. patens* and *A. thaliana* (Figure 6, E and F and Supplemental Figure S12), targeted analysis revealed the presence of *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate in the liverwort *M. polymorpha* and the hornwort *A. agrestis* (Figure 6, F and Supplemental Figure S12). With the exception of *P. patens*, the 3'-hydroxylated form of *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate, caffeoyl-5-*O*-shikimate, was detected in all plant samples. The results were consistently confirmed by both retention time comparison with molecular standards and simultaneous MS/MS analysis in positive and negative modes (Figure 6, F and Supplemental Figure S12). Parallel profiling of threonate esters in the same plant extracts suggested a lineage-specific pattern, since they were detected only in *P. patens* extracts (Supplemental Figure S13).

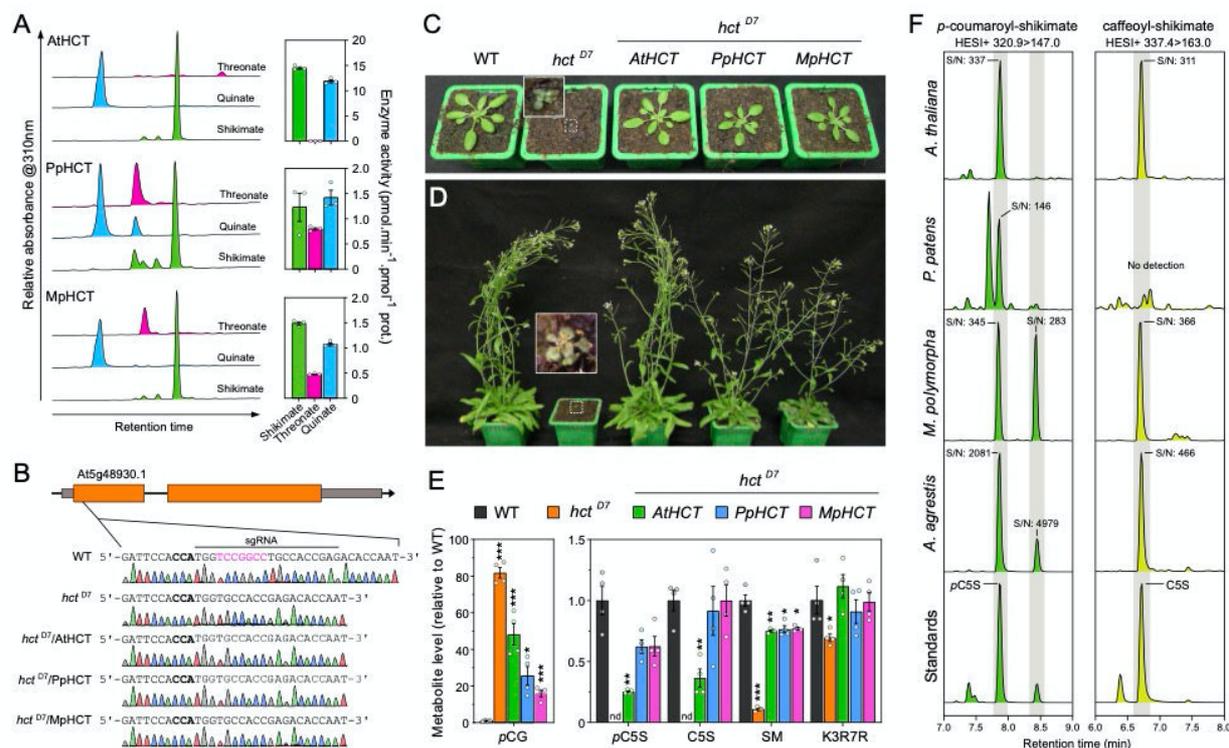


Figure 6 Evolutionary conservation of HCT function in embryophytes. A, AtHCT, PpHCT, and MpHCT acyl acceptor permissiveness was investigated using threonate, quinate, or shikimate, and *p*-coumaroyl-CoA as an acyl donor in in vitro end-point assays. Representative HPLC-UV chromatograms (left) and corresponding HCT activity (right) are shown for the different acyl acceptors. Results are the mean \pm SEM of three independent enzyme assays. Note that the results for PpHCT are the same as those reported in Figure 3, C. B, Schematic representation of the *AtHCT* locus and sequence of the CRISPR/Cas9 target site. Gray box, UTR; black line, intron; orange box, exon. The protospacer adjacent motif (NGG) is highlighted in bold. Sanger sequencing chromatograms of wild-type (WT) and the homozygous *hct*^{D7} mutant transformed, or not, with *AtHCT*, *PpHCT*, or *MpHCT* show the seven-nucleotide (in pink) deletion in the *HCT* gene of *hct*^{D7} plants. C, D, Phenotypes of 3-week-old (C) and 60-day-old (D) *A. thaliana* WT and the *hct*^{D7} null mutant transformed, or not, with *AtHCT*, *PpHCT*, or *MpHCT* genes. E, Relative levels of the phenolic esters *p*-coumaroyl-glucose (*pCG*), *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate (*pCSS*), caffeoyl-5-*O*-shikimate (*CSS*) and sinapoyl-malate (*SM*), and of the flavonol kaempferol 3-*O*-rhamnoside 7-*O*-rhamnoside (*K3R7R*) in the rosettes of 3-week-old plants. Results are the means \pm SEM of four independent biological replicates. WT versus mutant *t* test adjusted *P*-value: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. F, Representative UHPLC-MS/MS chromatograms reporting the search for *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate and caffeoyl-5-*O*-shikimate in the bryophytes *P. patens*, *M. polymorpha* and *A. agrestis*, and the angiosperm *A. thaliana*. Additional positional isomers of *p*-coumaroyl-shikimate may occur in *M. polymorpha* and *A. agrestis*. S/N, signal-to-noise ratio. Gray shaded regions highlight relevant elution time windows.

Discussion

The silencing of *HYDROXYCINNAMOYL-CoA:SHIKIMATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE* in seed plants typically results in a strong reduction in the abundance, and/or compositional modification, of the biopolymer lignin, and is usually associated with stunted growth (Hoffmann et al., 2004; Chen et al., 2006; Wagner et al., 2007; Besseau et al., 2007; Gallego-Giraldo et al., 2011). Parallel in vitro and structural studies showed that tracheophyte HCTs consistently use shikimate as a preferred acyl acceptor to form *p*-coumaroyl-shikimate esters (Hoffmann et al., 2003; Lallemand et al., 2012; Levsh et al., 2016; Chiang et al., 2018), which in turn serve as substrates for C3'H enzymes (Schoch et al., 2001; Alber et al., 2019). Taken together, these data suggested a deep evolutionary conservation of HCT function in vascular plants. Here, through a multidisciplinary study of the bryophyte model *P. patens*, we are able to extend HCT

functional conservation throughout the entirety of embryophyte evolution, pointing to an emergence in the last common ancestor of land plants, approximately 500 Ma (Figure 7, A). New methodologies have allowed us to refine our previous studies (Renault et al., 2017) and we conclude, based on new evidence, that shikimate esters are the native intermediates for phenolic ring 3-hydroxylation in *P. patens* (Figure 7, B). The absence of a *bona fide* C3H/APX gene and the presence of only distantly-related CSE homologs in *P. patens* (Ha et al., 2016; Barros et al., 2019) further supports a pivotal function of HCT in the moss phenylpropanoid pathway, for both producing and deconjugating shikimate esters (Figure 7, B).

Our data also highlight a previously unappreciated complexity in the bryophyte phenylpropanoid pathway, which in *P. patens* produces both soluble esters and precursors of a hydrophobic apoplastic biopolymer. This metabolic typology

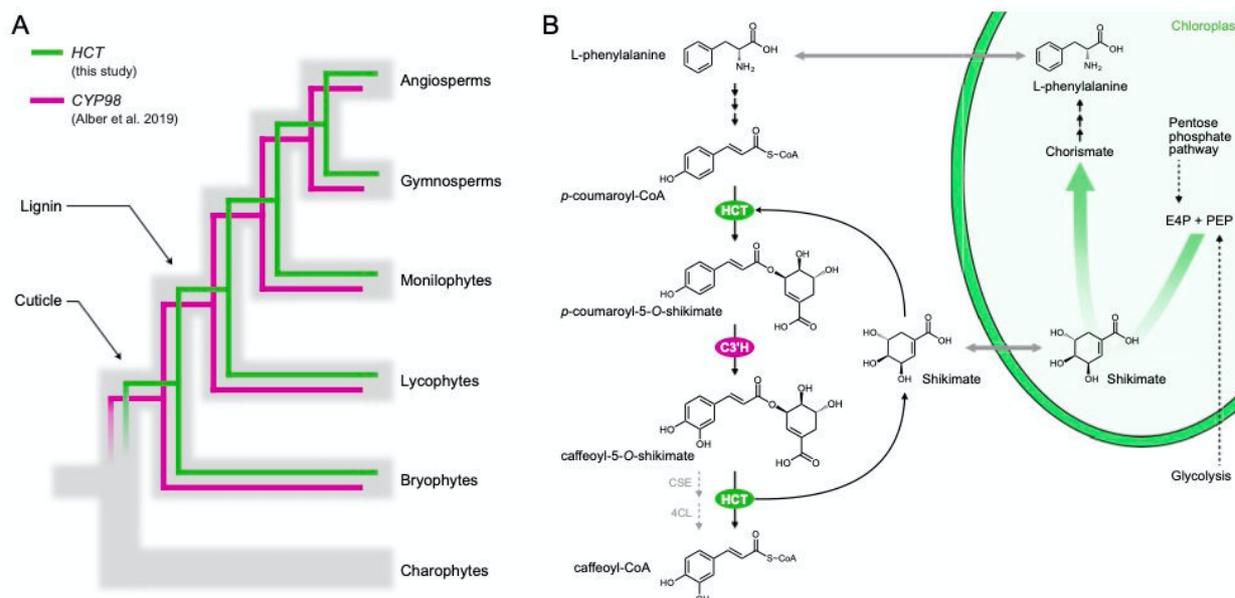


Figure 7 Evolutionary and metabolic models of HCT function. **A**, Evolutionary model for the conservation of the *HCT/CYP98* pair in embryophytes. Gray branches represent organismal evolution of species. Green and cyan branches represent *HCT* (this study) and *CYP98* (Alber et al., 2019) gene evolutions, respectively. *CYP98* encodes *p*-coumaroyl 3′hydroxylase (C3′H). **B**, Metabolic model of *P. patens* phenylpropanoid pathway. HCT plays a pivotal role in controlling the formation and deconjugation of shikimate esters, the evolutionarily conserved intermediates for phenolic ring functionalization by C3′H enzyme. Shikimate partly derives from the pentose phosphate pathway and is a precursor of L-phenylalanine, potentially establishing a regulatory control of photosynthetic carbon allocation to the phenylpropanoid pathway through two critical steps. The occurrence of a CSE/4CL alternative route toward caffeoyl-CoA in *P. patens* remains an open question. E4P, D-erythrose 4-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate.

is akin to that of flowering plants, which often produce lineage-specific soluble phenolic esters (e.g. sinapoyl-malate or chlorogenic acids), as well as essential precursors of biopolymers, such as monolignols. Soluble esters act as UV screens and antioxidants (Lehfeldt et al., 2000; Clé et al., 2008) and, as such, may be advantageous in particular ecological niches (Li et al., 2010b). We propose that threonate esters, which we found only in *P. patens*, are specialized stress-mitigating molecules, while the shikimate esters are evolutionarily conserved intermediates involved in phenolic ring functionalization. Threonate originates from the degradation of the plant-specific antioxidant ascorbate, possibly in the cell wall (Green and Fry, 2005), suggesting a connection between *P. patens* threonate ester biosynthesis and stress acclimation. Despite our efforts, we failed to identify the enzyme(s) responsible for threonate ester production in *P. patens*. Our preliminary data suggest that this neither involves a BAHD acyl transferase, nor a coenzyme A thio-ester acyl donor. In this respect, serine carboxypeptidase-like enzymes would be good candidates for catalyzing such a reaction using glucose esters as acyl donors, as is the case for sinapoyl-malate biosynthesis (Lehfeldt et al., 2000). On the other hand, evolutionary selection has led to the coupling of phenol-containing biopolymer biosynthesis with shikimate, a widespread molecule found in plants, bacteria, and fungi. In plants, shikimate partly derives from the pentose phosphate pathway and is a precursor of aromatic amino acids,

including L-phenylalanine (Maeda and Dudareva, 2012; Figure 7, B). Cellular concentrations of shikimate are assumed to be lower than the K_m of HCT enzymes for shikimate. It was therefore proposed that shikimate availability might serve as a biochemical mechanism to regulate photosynthetic carbon allocation to phenylpropanoid production, with HCT playing a key role in such a mechanism (Schoch et al., 2006; Adams et al., 2019; Figure 7, B).

Here, we provide evidence that the *HCT* gene, and the associated shikimate-mediated regulation of the plant phenolic metabolism, appeared during plant terrestrialization in the last common ancestor of embryophytes, concomitant with the occurrence of a cuticle, but prior to lignin evolution (Figure 7, A). This evolutionary pattern matches that of *CYP98*, which encodes the downstream C3′H enzyme (Alber et al., 2019). A complex evolutionary interplay therefore likely shaped *HCT* and *CYP98* macro-evolutions and established the *HCT/CYP98* pairing as a core metabolic module within the phenylpropanoid pathway, deeply rooted in land plant evolution (Figure 7, A). The tight relationships between the two enzymes is further evidenced by their ability to physically interact and to form a supramolecular complex in *A. thaliana* (Bassard et al., 2012), a mechanism by which intermediate channeling could occur. Whether the phenylpropanoid pathway in *P. patens* is also organized at a supramolecular level however remains an open question. The *CYP98/HCT* pair also features lower scale evolutionary patterns, as illustrated by

recurrent, independent duplications of the core *HCT* and *CYP98* genes, which led to the emergence of specialized phenolic compounds, such as rosmarinic acid and phenolamides (Matsuno et al., 2009; Liu et al., 2016; Levsh et al., 2019).

Both *PpCYP98* (Renault et al., 2017) and *PpHCT* knock-out mutants show stunted gametophore growth and organ fusion phenotypes, associated with a complete loss of cuticular caffeate units. Cuticles are essential to control water permeability, and provide plant protection against drought (Kosma et al., 2009; Lü et al., 2012) and other environmental stresses, including UV-B radiation (Krauss et al., 1997; Yeats and Rose, 2013). Thus, emergence of a cuticle with properties that enabled plant terrestrialization may have been dependent on the presence of a primordial phenylpropanoid pathway. The severe developmental defects of the $\Delta PpHCT$ and $\Delta PpCYP98$ mutants unfortunately prevent meaningful evaluation of their stress tolerance. Although found in substantial amounts in the cuticle of some tracheophytes, such as the leaf cuticle of *Solanum lycopersicum* (Bolger et al., 2014), hydroxycinnamic acids usually represent small proportions of the cuticle of vascular plants (Fich et al., 2016). The presence of large amounts of hydroxycinnamic acids might therefore be a typical, and possibly essential, feature of bryophyte lineages (Caldicott and Eglinton, 1976; Buda et al., 2013; Kong et al., 2020). Hydroxycinnamic acids might play an important role, since they are covalently attached to fatty acid monomers (Riley and Kolattukudy, 1975). We show here that the absence of caffeate in *P. patens* prevents the formation of the cuticle and cuticular biopolymer polymerization, as evidenced by the large decreases in the major cutin monomers C16 FA and (9,10),16 di-OH C16 FA in the $\Delta PpHCT$ lines, as was previously shown in the *PpCYP98* deletion mutants (Renault et al., 2017). A straightforward interpretation is that caffeate anchors, or shapes, the cuticle lipidic scaffold of *P. patens*. Such a function is apparently not fulfilled by *p*-coumarate, which accumulates in the $\Delta PpHCT$ cuticle. This might indicate an important role of phenolic ring functionalization for biopolymer formation, as is the case in natural plant lignins, which are predominantly derived from di- or tri-substituted phenolic precursors (Ralph et al., 2019). Whether the structural function of phenolic compounds in the cuticle is specific to bryophytes, or even *P. patens*, remains to be clarified. It was indeed shown that the absence of ferulate from *A. thaliana* cuticles did not noticeably reduce cuticle integrity (Rautengarten et al., 2012), while we report here an increased permeability to toluidine blue of the aerial tissues of the *Arabidopsis hct*^{D7} mutant. The enrichment of the *P. patens* cuticle with phenolic compounds potentially contributes various functional attributes, including UV protection, water/gas management, tissue scaffolding for erect growth and organ determination (i.e. organ fusion avoidance). We hypothesize that reduction of this bryophyte property was linked to the emergence of specialized biopolymers in tracheophytes, such as canonical lignin and suberin, which assumed some of the functions mediated by the phenol-enriched cuticle of bryophytes.

Materials and methods

Phylogenetic analysis

All BAHD sequences from *P. patens* (moss, bryophyte), *M. polymorpha* (liverwort, bryophyte), *A. agrestis* (hornwort, bryophyte), *S. muscicola* (Zygnematophyceae, charophyte), *C. braunii* (Charophyceae, charophyte), and *K. nitens* (Klebsormidiophyceae, charophyte) were retrieved by BLASTp search using AtHCT (At5g48930.1) as query (*E*-value < 0.01). Truncated proteins with less than 420 residues were discarded. Obtained bryophyte and charophyte BAHDs were aligned with 34 functionally characterized BAHD protein (full list in Supplemental Tables S1, S2) using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004; alignment file available as Supplemental Data Set S1). Ambiguous sites of the alignment were masked applying the Gblocks method (Castresana, 2000). Phylogenetic relationships were reconstructed with a maximum-likelihood approach using PhyML3.0 (Guindon et al., 2010). Selection of an evolution model that best fits the dataset was guided by the SMS software; the tree was ultimately inferred from the LG + G + I + F model (Le and Gascuel, 2008). Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying the BioNJ algorithm, and by selecting the topology with superior log likelihood value. Best of nearest neighbor interchange and subtree pruning and regrafting methods were used for improving the tree. Branch tree supports were calculated with the approximate likelihood ratio test (Anisimova and Gascuel, 2006). The tree file is available as supplemental material (Supplemental Data Set S2). Sequence manipulation was performed with Seaview 4 software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>) and phylogenetic analysis on the PhyML server (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>).

Homology modeling of proteins

3D models of *P. patens* (Pp3c2_29140), *C. braunii* (CHBRA170g00210), and *K. nitens* (kfl00513_0110) proteins were generated using the Modeler comparative module (Sali and Blundell, 1993) embedded in ChimeraX v1.0 software (Goddard et al., 2018) using *A. thaliana* HCT in complex with *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate (pdb entry: 5kju) as template. Prior to modeling, target proteins were aligned with embryophyte representative HCTs visible in Figure 1, B with the MUSCLE algorithm (alignment file available as Supplemental Data Set S3). Five models were automatically generated for each target protein; 3D models with the best GA341 and zDOPE scores were kept for subsequent analyses. Potential hydrogen bonds linking protein residues and *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate were predicted with the ChimeraX FindHBond tool. Overlay and visualization of 3D protein models were performed with ChimeraX.

Plant growth conditions

Physcomitrium patens (Physcomitrella; Hedw.) Bruch & Schimp., strain Gransden (IMSC acc. no. 40001; Lang et al., 2018) was cultured in liquid or on solid Knop medium (Reski and Abel, 1985) supplemented with 50- $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

H_3BO_3 , $50\text{-}\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnSO_4 , $15\text{-}\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnSO_4 , $2.5\text{-}\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI , $0.5\text{-}\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 , $0.05\text{-}\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 , and $0.05\text{-}\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 . Medium was solidified with $12\text{-g}\cdot\text{L}^{-1}$ purified agar. *Physcomitrium patens* gametophores were propagated on agar plates or in liquid cultures established by soft tissue disruption (~ 15 s). Liquid cultures were subcultured weekly and kept under constant agitation (130 rpm) for proper aeration. *Marchantia polymorpha* Tak-1 accession and *A. agrestis* Oxford accession were grown on half-strength Gamborg B5 medium solidified with $12\text{-g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar. Bryophytes were kept at 23°C under 16/8 h day/night cycle, with light intensity set to $70\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Osram BIOLUX L 36W/965). *Arabidopsis thaliana* plants (Col-0 background) were grown on soil, kept under a $22/18^\circ\text{C}$, 16-h/8-h light/dark regime ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity; Philips LEDtube 20W/840 white cool) and watered from the bottom every 2 days with tap water.

Determination of gene expression by RT-qPCR

Total RNA was isolated from 10 mg of lyophilized tissue with 1 ml of TriReagent (Sigma–Aldrich). Samples were agitated for 5 min at room temperature prior to centrifugation for 15 min at $13,000\text{ g}$, 4°C . After transfer of the supernatant to a new microtube, an equal volume of chloroform was added and samples were thoroughly vortexed and centrifuged for 15 min at $13,000\text{ g}$, 4°C to induce phase separation. The clear upper phase was recovered and transferred to a new microtube. Total RNA was precipitated by adding 0.1 volume of sodium acetate (NaOAc , 3 M, pH 5.2) and 2.5 volumes of absolute ethanol. After incubation at -20°C for 2 h, RNA was spun down by centrifugation for 30 min at $13,000\text{ g}$, 4°C . Supernatant were discarded, the RNA pellet was washed with 1 ml of 70% ethanol, and then dried at room temperature for 10 min. Total RNA was finally resuspended in DEPC-treated water. Twenty micrograms of RNA was treated with 5 U of RQ1 DNaseI (Promega) and subsequently purified using phenol–chloroform (50/50, v/v) and precipitation by NaOAc/EtOH . One microgram of DNaseI-treated RNA was reverse-transcribed with oligo(dT) and the Superscript III enzyme (Thermo Scientific) in 20 μL reaction. RT-qPCR reactions consisted of 10 ng cDNA, 500 nM of each primer, and 5 μL of $2\times$ LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) in a 10- μL final volume. Reactions were run in triplicate on a LightCycler 480 II device (Roche). The amplification program was 95°C for 10 min and 40 cycles (95°C denaturation for 10 s, annealing at 60°C for 15 s, extension at 72°C for 15 s), followed by a melting curve analysis from 55°C to 95°C to check for transcript specificity. Crossing points (Cp) were determined using the manufacturer's software. Cp values were corrected according to primer pair PCR efficiency computed with the LinReg PCR method (Ruijter et al., 2009). *Pp3c19_1800* and *Pp3c27_3270* genes were used as internal reference for expression normalization. List of qPCR primers is available in Supplemental Table S4.

GUS staining

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

Recombinant protein production

Cloning of the AtHCT (*At5g48930*) coding sequence into the pGEX-KG vector and purification of the corresponding recombinant protein were performed as previously described (Hoffmann et al., 2003; Besseau et al., 2007). Coding sequences of PpHCT (*Pp3c2_29140*) and MpHCT (*Mapoly0003s0277*) were PCR-amplified from *P. patens* Gransden and *M. polymorpha* Tak-1 cDNA, respectively, using Gateway-compatible primers (Supplemental Table S4). The truncated PpHCT coding sequence, shown in Supplemental Figure S4, A, was ordered as double-stranded gBlock (Integrated DNA Technologies) with Gateway compatible extensions. CDS were cloned into the pDONR207 vector by the BP Clonase reaction, and then shuttled to the pHGWA expression vector by the LR clonase reaction, allowing N-terminal fusion of the protein with hexahistidine tag. *Escherichia coli* Rosetta2pLyS strain was transformed with recombinant pHGWA plasmids and cultivated in ZYP-5052 autoinducible medium. Recombinant proteins were purified by immobilized metal affinity chromatography using an AKTA Pure 25 system equipped with HisTrap HP 1-mL column and submitted to gel filtration using a Superdex 200 increase 10/300 GL column (GE Healthcare). Purified recombinant proteins were conserved at -80°C in $1\times$ PBS solution containing 10% glycerol.

In vitro enzyme assays

Five millimolar stock solutions of *p*-coumaroyl-CoA, caffeoyl-CoA, and feruloyl-CoA (PlantMetaChem or MicroCombiChem) were prepared in H_2O . Eighty millimolar stock solution of L-threonic acid was prepared from its hemicalcium salt (Sigma–Aldrich) in H_2O containing 40-mM EDTA to chelate calcium and improve solubility. Forty millimolar stock solutions of shikimate and D-quinic acid (Sigma–Aldrich) were prepared in H_2O . Standard in vitro HCT assays were performed in 100 μL containing 50-mM potassium phosphate buffer pH 7.4, 1 mM dithiothreitol (DTT), 5 μg recombinant HCT protein, 5 mM acyl acceptor [(–)-shikimate, D-quinic acid, or L-threonate; Sigma–Aldrich] and 200 μM acyl-CoA. Reactions were initiated by the addition of acyl-CoA, incubated at 30°C for 25 min and stopped by addition of 100 μL acetonitrile. To determine PpHCT kinetic parameters, substrate and enzyme concentrations were optimized for each tested substrate. For shikimate, 50 ng protein, 200 μM *p*-coumaroyl-CoA, and 0.125–8 mM (–)-shikimate were used. For quinate, 100 ng protein, 200 μM *p*-coumaroyl-CoA, and 0.312–20 mM D-quinic acid were used. For threonate, 2 μg protein, 200 μM *p*-coumaroyl-CoA, and 4–32 mM L-threonate were used. For *p*-coumaroyl-CoA,

50 ng protein, 8 mM shikimate, and 12.5–400 μM *p*-coumaroyl-CoA, or 2 μg protein, 32 mM L-threonate, and 12.5–600 μM *p*-coumaroyl-CoA were used. Reactions were initiated by addition of the saturating substrate, incubated at 30°C for 10 min and stopped by the addition of 100 μL acetonitrile. Relative quantification of reaction products was performed by UHPLC–MS/MS. Absolute quantification of phenolic esters was performed on HPLC–UV with external calibration curves of corresponding free hydroxycinnamic acid (i.e. *p*-coumarate, caffeate, and ferulate; Sigma–Aldrich). Kinetic parameters were calculated with nonlinear Michealis–Menten regression using the GraphPad Prism v4.8 software (Supplemental Figure S5). Threonate/shikimate competition assays were performed in 50 μL containing 50-mM potassium phosphate buffer pH 7.4, 1-mM DTT, 100-ng recombinant PpHCT, 2.5-mM L-threonic acid, 10 μM (–)-shikimic acid, and 200- μM *p*-coumaroyl-CoA. Reactions were initiated by addition of *p*-coumaroyl-CoA from 5 mM stock solution, incubated for 15 min at 30°C and stopped with 50 μL methanol. Under these conditions, shikimate consumption was kept below 30%. Because of the complex nature of the competition assay, absolute quantification of reaction products *p*-coumaroyl-4-*O*-threonate and *p*-coumaroyl-5-*O*-shikimate was performed by UHPLC–MS/MS with external calibration curves of standard molecules. To test the PpHCT reverse reaction, in vitro assays were performed in 50 μL containing 50-mM potassium phosphate buffer pH 7.4, 1-mM DTT, 1- μg recombinant PpHCT, 250- μM coenzyme A (Sigma–Aldrich), and 100- μM caffeoyl ester. Reactions were initiated by addition of the coenzyme A from 5-mM stock solution, incubated for 30 min at 30°C and stopped with 50- μL methanol. Absolute quantification of the reaction product caffeoyl-CoA was performed by HPLC–UV using an external calibration curve of the authentic molecule.

Yeast metabolic engineering

For *P. patens* phenolic pathway reconstitution, *Pp4CL1*, *PpHCT*, and *PpCYP98* coding sequences were PCR-amplified from Gransden cDNA using Gateway-compatible primers (Supplemental Table S4) and shuttled by LR recombination to yeast galactose-inducible expression vectors pAG424GAL, pAG423GAL and pAG425GAL (Alberti et al., 2007), respectively; *A. thaliana* *ATR1* coding sequence was PCR-amplified from Col-0 cDNA and transferred to pAG426GAL yeast expression vector. Recombined vectors were introduced in INVSc1 *S. cerevisiae* yeast strain (ThermoFisher Scientific) following the lithium acetate/polyethylene glycol method. Yeast transformants were selected on SC- media lacking relevant molecule(s) (6.7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ yeast nitrogen base without amino acids, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose, appropriate concentration of relevant Yeast Synthetic Drop-out Medium; Sigma–Aldrich) and incubated for 3 days at 30°C. For the whole-cell metabolic assay, a 2.5-mL SC-liquid culture was inoculated with a yeast colony and incubated overnight at 180 rpm and 30°C. Cultures were centrifuged for 5 min at 3,000 g, room temperature, and cell pellets were washed in 25-mL sterile ultra-

pure water and centrifuged again for 5 min at 3,000 g. Cells were resuspended in 2.5 mL of liquid SC-medium supplemented with galactose instead of glucose to induce gene expression and incubated at 30°C, 180 rpm. Six hours after induction, yeast cultures were supplemented with 25 μL of 100-mM sterile *p*-coumarate solution in DMSO and 50 μL of 50-mM sterile L-threonic acid solution in water (5-mM final concentration each). Following substrate addition, cultures were incubated for 24 h at 30°C, 180 rpm. Metabolites were extracted from whole yeast cultures by adding one volume of methanol followed by thorough vortexing. Extracts were centrifuged at 16,000 g for 10 min to spin down yeasts. Supernatants were recovered, dried in vacuo, and resuspended in 50% methanol in one-fifth of the initial volume. Concentrated extracts were analyzed by UHPLC–MS/MS.

Generation of *P. patens* transgenic lines

ΔPpHCT knock-out mutants were generated by protoplast transfection with a genetic disruption construct allowing introduction of the *NPTII* expression cassette into the *PpHCT* locus by homologous recombination. The genetic construct was made by assembling two 750-bp genomic regions PCR-amplified from *P. patens* genomic DNA with the *NPTII* selection cassette by GIBSON cloning. The assembled fragment was then PCR-amplified and blunt-end cloned into the pTA2 vector using the pJET1.2 cloning kit (ThermoFisher Scientific). The *PpHCT* disruption construct was excised from the vector backbone by *EcoRI* digestion, using restriction sites introduced by PCR. Final sterile DNA solution used for PEG-mediated protoplast transfection contained 45 μg of excised fragment in 0.1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Protoplast isolation, transfection and regeneration were performed according to (Hohe et al., 2004). Transformants were selected on Knop plates supplemented with 25- $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ geneticin (G418). For *PpHCT:uidA* reporter lines, two genomic regions for homologous recombination framing the *PpHCT* STOP codon were PCR-amplified from genomic DNA and assembled with the *uidA* reporter gene following the same procedures as described above. A linker sequence was introduced by PCR to limit GUS protein hindrance on PpHCT activity. The *PpHCT:uidA* construct was excised from vector backbone by *NheI* digestion. Fifty micrograms of excised fragment was used for protoplast transfection. Since *PpHCT:uidA* does not contain a selection marker, it was co-transfected with the pRT101 plasmid (Girke et al., 1998) containing the *NPTII* selection cassette. Transformants were selected on Knop plates supplemented with 25- $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ geneticin (G418).

Molecular characterization of *P. patens* transgenic lines

Proper genomic integration of DNA construct was assessed using a tailored PCR strategy (Supplemental Figures S2, S8) with primers listed in Supplemental Table S4. Genomic DNA was extracted with DNA extraction buffer (75-mM Tris pH 8.8, 20-mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and 0.01% Tween 20) during 15 min incubation at 45°C under agitation (1,400 rpm). Two microliters was used for direct PCR using Phire II DNA

polymerase (Thermo Scientific) in a final volume of 20 μL . $\Delta PpHCT$ mutant lines with seamless 5' and 3' integration of the genetic construct at the desired locus were checked for the absence of full-length transcript. Total RNA was isolated and retrotranscribed as described above. *PpHCT* transcripts were amplified from two microliters of cDNA using the Phire II DNA polymerase (Thermo Scientific). The constitutively expressed *L21* gene (*Pp3c13_2360*), encoding a 60S ribosomal protein, was used as reference. Primers used for RT-PCR are listed in Supplemental Table S4. Four transgenic lines with complete absence of *HCT* transcripts were selected for subsequent investigations. The MassRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific) was used as DNA size marker.

Determination of HCT activity in *P. patens* protein extracts

Proteins were extracted from 3-month-old WT and $\Delta PpHCT$ gametophores in 2-mL microtubes containing five volumes of extraction buffer (100-mM Tris-HCl pH 7.4, 10% glycerol, 2-mM DTT, cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail). Samples were homogenized using 5 mm steel beads and a TissueLyser II (Qiagen) operated at 30 Hz for 5 min. Following a centrifugation step (20,000 g, 4°C, 40 min), supernatants were recovered and transferred to a 50-mL conical tube. Proteins were precipitated by slow addition to samples of ammonium sulfate up to 0.5 g·mL⁻¹ under constant agitation. Once ammonium sulfate was fully solubilized, samples were centrifuged for 20 min at 16,000 g and 4°C, supernatants discarded and protein pellets resuspended in 5 mL of extraction buffer. A second round of precipitation and centrifugation was performed to fully remove plant endogenous metabolites. Protein pellets were resuspended in 500 μL of extraction buffer. Next, samples were centrifuged (5 min, 18,000 g, 4°C) to pellet non-protein material, and supernatants were transferred to new microtubes. Protein concentration was assessed with the Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) and adjusted to 200 ng· μL^{-1} with extraction buffer. All steps were performed at 4°C and samples were kept on ice. HCT activity in total protein preparations was evaluated from 50- μL end-point enzyme assays containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 2.5 μg total proteins, 1 mM DTT, 200 μM *p*-coumaroyl-CoA, and 5 mM shikimate or threonate. Reactions were initiated by the addition of *p*-coumaroyl-CoA, incubated at 30°C and stopped after 1 h by the addition of 50 μL acetonitrile. Production of *p*-coumaroyl-shikimate was monitored by UHPLC-MS/MS. Relative HCT activity was computed from *p*-coumaroyl-shikimate peak area and expressed as a percentage of WT.

Plant tissue collection and metabolite extraction

Liquid cultured gametophores were harvested 5 weeks after the last tissue disruption, and 1 week after nutrient medium change. Plant material was collected by filtration on a 100- μm pore size sieve, quickly blotted on paper towel and snap-frozen in liquid nitrogen. For *M. polymorpha* and *A.*

agrestis, 1-month-old thalli were harvested from Petri plates and snap-frozen in liquid nitrogen. For *A. thaliana*, whole 3-week-old rosettes were harvested from soil-grown plants and snap-frozen in liquid nitrogen. Samples were lyophilized for 2 days; dry material was homogenized using 5-mm steel beads and a TissueLyser II (Qiagen) for 1 min at 30 Hz. Metabolites were extracted from 8-mg dry plant powder following a methanol:chloroform:water protocol as described previously (Renault et al., 2017), except that 500 μL methanol, 250 μL chloroform, and 500 μL water were used. For shikimate ester detection in *P. patens*, 250 μL of metabolic extracts was dried in vacuo, and dry residues were resuspended in 50 μL 50% methanol before analysis. Acid hydrolysis of metabolic extract was conducted as reported before (Renault et al., 2017).

HPLC-UV chromatography

Metabolite separation and detection were carried out on a high-performance liquid chromatography system (Alliance 2695; Waters) coupled to a photodiode array detector (PDA 2996; Waters). Ten to twenty microliters of metabolite extract was injected onto Kinetex Core-Shell C18 column (100 \times 4.6 mm, 2.6- μm particle size, or 150 \times 4.6 mm, 5- μm particle size; Phenomenex). Needle and injection loops were successively washed with weak (95% water/5% acetonitrile) and strong (20% water/80% acetonitrile) solvents. For phenolics, the mobile phase consisted of a mix of HPLC grade water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid. The elution program was as follows: 0.0 min, 95% A; 15.0 min, 5% A (curve 8); 17.0 min, 5% A (curve 6); 18.0 min, 95% A (curve 6); 20.0 min, 95% A. The flow was set to 1 mL·min⁻¹ and column temperature to 35°C. For acyl-CoA analysis, the mobile phase consisted of a mix of 20 mM sodium phosphate pH 5.3 prepared in HPLC grade water (A) and acetonitrile (B). The elution program was as follows: 0.0 min, 95% A; 1.0 min, 95% A; 9.0 min, 50% A; 10 min, 40% A; 10.5 min, 5% A; 12.0 min, 5% A. The flow was set to 1 mL·min⁻¹ and column temperature to 35°C, and the absorbance was recorded between 250 and 400 nm. Data were processed with the Empower 3 Software (Waters).

Targeted metabolic profiling by UHPLC-MS/MS

Metabolites were separated and detected on a Dionex UltiMate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific) system coupled to an EvoQ Elite LC-TQ (MS/MS) mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization source (HESI; Bruker). Nitrogen was used as the drying (30-L·h⁻¹ flow rate) and nebulizing (35 L·h⁻¹ flow rate) gas. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 300°C. The capillary voltage was set to 3.5 kV both for positive and negative ionization modes. MS data acquisition and LC piloting were performed with the Bruker MS Workstation 8 and Compass Hystar 4.1 SR1 softwares, respectively. Metabolites were ionized in either positive or negative modes and detected using specific MRM methods (Supplemental Table S5). Bruker MS Data Review software was used to integrate peaks and report corresponding areas.

For phenolic molecules, 3 μL of sample was injected onto a C18 Cortecs UPLC T3 column ($150 \times 2.1 \text{ mm}$, $1.6 \mu\text{m}$; Waters) and eluted with a mix of LC–MS grade water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid to keep molecules in the protonated form. After each injection, the needle and injection loop were washed with 25% acetonitrile solution. The elution program was as follows: 0.0 min, 5% B; 1.0 min, 5% B; 11.5 min, 100% B (curve 8); 13.0 min, 100% B; 14.0 min, 5% B; 15.0 min, 5% B; total run time: 15 min. Flow was set to $0.400 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and column temperature to 35°C . Metabolite peak area was normalized to plant dry weight; metabolite level was expressed relative to WT. For central polar metabolites, 2 μL of the same plant extracts used for phenolics analysis was injected onto an Acquity UPLC HSS PFP column ($150 \times 2.1 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$; Waters) and eluted with a mix of LC–MS grade water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid. After each injection, the needle and injection loop were washed with 25% acetonitrile solution. The elution program was as follows: 0.0 min, % B; 2.0 min, 0% B; 5.0 min, 25% B; 10.0 min, 35% B; 10.5 min, 95% B; 12.5 min, 95% B; 12.6 min, 0% B; 15.0 min, 0% B; total run time: 15 min. Flow was set to $0.250 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and column temperature to 40°C . The absolute level of polar central metabolites was calculated according to plant dry weight and external calibration curves of authentic molecules and expressed as μmoles of compound per g of plant dry weight ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$).

Cuticular biopolymer compositional analysis

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

Permeability assay

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

Production and complementation of an Arabidopsis *hct* null mutant

We generated an *hct* null mutant by CRISPR/Cas9-mediated gene inactivation as described earlier (DiGennaro et al., 2018). Briefly, *BbsI* restriction enzyme was used to introduce a double strand fragment resulting from 5'-GATTGCTCGG TGGCAGGCCGGACCA and 5'-AAACTGGTCCGGCCTGC CACCGAGC oligonucleotide annealing, which targets the *HCT* region CTCGGTGGCAGGCCGGACCATGG, into the *At-psgR/GW* plasmid. *At-psgR/GW* with *HCT* genomic target was transferred into the pEarleyGate 301 vector by the LR Clonase reaction (ThermoFisher Scientific). The recombinated pEarleyGate 301 vector was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 and used to transform Arabidopsis Col-0 by the floral dip method (Clough and Bent, 1998). Genotyping of T1 and T2 plants was performed by PCR amplification of the genomic sequence spanning the *HCT* target site using 5'-CCTTCTGAGAGAGTTGGTTCGAC and 5'-CTAGCTCGGAGGAGTGTTCG oligonucleotides, followed by *Avall* restriction digestion and run on an agarose gel to assess restriction site loss. The loss of the *At-psgR/GW* cassette at T2 or subsequent generation was assessed by sensitivity to selective agent (glyphosate). A line, free of the *AtpsgR/GW* cassette and harboring a 7-bp deletion 28 bp after the initiation codon, was isolated for this study and named *hct*^{D7}. Mutation at the desired locus was confirmed by Sanger sequencing using the PCR fragment generated with 5'-CCTTCTGAGAGAGTTGGTTCGAC and 5'-CTAGCTCGGAGGAGTGTTCG oligonucleotides. *hct*^{D7} was subsequently used for transcomplementation assays with *AtHCT*, *PpHCT*, and *MpHCT* coding sequences. To this end, Gateway pENTRY vectors harboring coding sequences were recombined with the binary pCC0996 vector that contains a 2,977-bp promoter fragment from the *A. thaliana* *C4H* gene (Weng et al., 2011). Resulting plant expression vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 and used to transform heterozygous *hct*^{D7} plants by the floral dip method. Transformants were selected with BASTA and the *hct*^{D7} allele was monitored along the selection process as described above. Experiments were performed with T3 plants homozygous for both the mutant allele and the transcomplementation construct.

Replication and statistical analyses

Unless otherwise noted, independent biological replicates correspond to pooled plants from an independent container. For *P. patens*, one replicate was derived from plants grown in one flask; for *M. polymorpha* and *A. agrestis*, one replicate was derived from plants grown in one Petri plate; for *A. thaliana*, one replicate was derived from plants grown in one pot. All statistical analyses were performed with GraphPad v8 software. For enzyme catalytic parameters, 95% confidence intervals were computed from nonlinear regression curves based on three independent enzyme assays. For metabolic profiling data, multiple two-tailed unpaired Student's *t* test were performed to compare wild-type and mutant means; *P*-values were corrected using the Holm–

Šídák method. Results from statistical analyses are shown in Supplemental Tables S6–S9.

Accession numbers

DNA and derived protein sequence data from this article are available in the Phytozome database (phytozome.jgi.doe.gov) under the following accession numbers: PpHCT (Pp3c2_29140); AtHCT (At5g48930); MpHCT (Mapoly0003s0277); Pp4CL1 (Pp3c18_6360); PpCYP98 (Pp3c22_19010); ATR1 (At4g24520).

Supplemental data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Multiple sequence alignment of protein region containing residues critical for HCT activity.

Supplemental Figure S2. Molecular characterization of *PpHCT:uidA* reporter lines.

Supplemental Figure S3. Multiple sequence alignment of representative embryophyte HCTs.

Supplemental Figure S4. Sequence, multiple sequence alignment and catalytic properties of a truncated PpHCT protein.

Supplemental Figure S5. Saturation curves of PpHCT activity used to infer kinetic parameters.

Supplemental Figure S6. In vitro threonate/shikimate competition assay.

Supplemental Figure S7. Assessment of the catalytic function *K. nitens* HCT homologous protein kf00513_0110 in yeast.

Supplemental Figure S8. Molecular and phenotypic characterization of Δ PpHCT mutant lines.

Supplemental Figure S9. Search for *P. patens* enzymes able to produce *p*-coumaroyl-threonate from *p*-coumaroyl-CoA.

Supplemental Figure S10. Toluidine blue staining assay of *Arabidopsis hct^{D7}* mutant.

Supplemental Figure S11. UV fingerprinting of metabolic extracts from *hct^{D7}* lines.

Supplemental Figure S12. Shikimate ester occurrence in bryophytes as evidenced by HESI UHPLC–MS/MS analysis in negative mode.

Supplemental Figure S13. Threonate esters occur in *P. patens* only as evidenced by HESI+ UHPLC–MS/MS analysis.

Supplemental Table S1. List of functionally characterized hydroxycinnamoyl-CoA-dependent BAHD acyltransferases used for the phylogenetic analysis.

Supplemental Table S2. List of uncharacterized BAHD acyltransferases used for the phylogenetic analysis.

Supplemental Table S3. Absolute level of L-phenylalanine, L-malate, D-quinic acid, L-threonate, and (–)-shikimate in plant tissues.

Supplemental Table S4. List of oligonucleotides used in the study.

Supplemental Table S5. List of multiple reaction monitoring methods used for metabolite analysis.

Supplemental Table S6. Results of *t* test from Figure 5, H.

Supplemental Table S7. Results of *t* test from Figure 5, I.

Supplemental Table S8. Results of *t* test from Figure 5, M.

Supplemental Table S9. Results of *t* test from Figure 6, E

Supplemental Data Set S1. Multiple protein alignment of BAHD protein sequences used for phylogeny reconstruction.

Supplemental Data Set S2. BAHD phylogenetic tree file.

Supplemental Data Set S3. Multiple protein alignment used to reconstruct HCT tridimensional models.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pr. Takayuki Kohchi (Kyoto University) and Dr. Isabel Monte (University of Zürich) for providing *M. polymorpha* and *A. agrestis* plants, respectively. They are grateful to Annette Alber who performed initial in vitro PpHCT enzyme assays.

Funding

This work received support from the initiative of excellence IDEX-Unistra (ANR-10-IDEX-0002-02, H.R.), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE20-0017, H.R.), the grant-in-aid “Diversity of Biological Mechanisms” from the Institut des Sciences Biologiques—CNRS (DBM2020, H.R.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany’s Excellence Strategy (EXC-2189—Project ID: 390939984, R.R.), the National Science Foundation (NSF-1517546, J.K.C.R.), and the Agriculture and Food Research Initiative of the United States Department of Agriculture (2016-67013-24732, J.K.C.R.).

Conflict of interest statement. None declared.

References

- Adams ZP, Ehling J, Edwards R (2019) The regulatory role of shikimate in plant phenylalanine metabolism. *J Theor Biol* **462**: 158–170
- Alber AV, Renault H, Basilio-Lopes A, Bassard J-E, Liu Z, Ullmann P, Lesot A, Bihel F, Schmitt M, Werck-Reichhart D, et al. (2019) Evolution of coumaroyl conjugate 3-hydroxylases in land plants: lignin biosynthesis and defense. *Plant J* **99**: 924–936
- Alberti S, Gitler AD, Lindquist S (2007) A suite of Gateway[®] cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**: 913–919
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* **55**: 539–552
- Barros J, Escamilla-Trevino L, Song L, Rao X, Serrani-Yarce JC, Palacios MD, Engle N, Choudhury FK, Tschaplinski TJ, Venables BJ, et al. (2019) 4-Coumarate 3-hydroxylase in the lignin biosynthesis pathway is a cytosolic ascorbate peroxidase. *Nat Commun* **10**: 1–11
- Bassard J-E, Richert L, Geerinck J, Renault H, Duval F, Ullmann P, Schmitt M, Meyer E, Mutterer J, Boerjan W, et al. (2012) Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway. *Plant Cell* **24**: 4465–4482
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2007) Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell* **19**: 148–162
- Bolger A, Scossa F, Bolger ME, Lanz C, Maumus F, Tohge T, Quesneville H, Alseikh S, Sorensen I, Lichtenstein G, et al.

- (2014) The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nat Genet* **46**: 1034–1038
- Buda GJ, Barnes WJ, Fich EA, Park S, Yeats TH, Zhao L, Domozych DS, Rose JK** (2013) An ATP binding cassette transporter is required for cuticular wax deposition and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **25**: 4000–4013
- Caldicott AB, Eglinton G** (1976) Cutin acids from bryophytes: an ω -1 hydroxy alkanolic acid in two liverwort species. *Phytochemistry* **15**: 1139–1143
- Carrington Y, Guo J, Le CH, Fillo A, Kwon J, Tran LT, Ehlting J** (2018) Evolution of a secondary metabolic pathway from primary metabolism: shikimate and quinate biosynthesis in plants. *Plant J* **95**: 823–833
- Castresana J** (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540–552
- Chen F, Srinivasa Reddy MS, Temple S, Jackson L, Shadle G, Dixon RA** (2006) Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant J* **48**: 113–124
- Chiang Y-C, Levsh O, Lam CK, Weng J-K, Wang Y** (2018) Structural and dynamic basis of substrate permissiveness in hydroxycinnamoyltransferase (HCT). *PLoS Comput Biol* **14**: e1006511
- Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y, Prinsen E, Jansen MAK** (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* **69**: 2149–2156
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 735–743
- de Vries J, Archibald JM** (2018) Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytol* **217**: 1428–1434
- de Vries J, de Vries S, Slamovits CH, Rose LE, Archibald JM** (2017) How embryophytic is the biosynthesis of phenylpropanoids and their derivatives in streptophyte algae? *Plant Cell Physiol* **58**: 934–945
- D'Auria JC** (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 331–340
- DiGennaro P, Grienberger E, Dao TQ, Jun JH, Fletcher JC** (2018) Peptide signaling molecules CLE5 and CLE6 affect Arabidopsis leaf shape downstream of leaf patterning transcription factors and auxin. *Plant Direct* **2**: e00103
- Edgar RC** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792–1797
- Eudes A, Pereira JH, Yogiswara S, Wang G, Teixeira Benites V, Baidoo EEK, Lee TS, Adams PD, Keasling JD, Loqué D** (2016) Exploiting the substrate promiscuity of Hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimate Hydroxycinnamoyl Transferase to reduce lignin. *Plant Cell Physiol* **57**: 568–579
- Fich EA, Segerson NA, Rose JK** (2016) The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annu Rev Plant Biol* **67**: 207–233
- Franke R, Humphreys JM, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Cusumano JC, Chapple C** (2002) The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* **30**: 33–45
- Gallego-Giraldo L, Jikumar Y, Kamiya Y, Tang Y, Dixon RA** (2011) Selective lignin downregulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *New Phytol* **190**: 627–639
- Girke T, Schmidt H, Zahringer U, Reski R, Heinz E** (1998) Identification of a novel delta 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J* **15**: 39–48
- Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE** (2018) UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci* **27**: 14–25
- Green MA, Fry SC** (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**: 83–87
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O** (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**: 307–321
- Guo J, Carrington Y, Alber A, Ehlting J** (2014) Molecular characterization of quinate and shikimate metabolism in populus trichocarpa. *J Biol Chem* **289**: 23846–23858
- Ha CM, Escamilla-Trevino L, Yance JCS, Kim H, Ralph J, Chen F, Dixon RA** (2016) An essential role of caffeoyl shikimate esterase in monolignol biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* **86**: 363–375
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M** (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinatyl hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 1446–1465
- Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, Legrand M** (2003) Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **278**: 95–103
- Hohe A, Egener T, Lucht JM, Holtorf H, Reinhard C, Schween G, Reski R** (2004) An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss, *Physcomitrella patens*. *Curr Genet* **44**: 339–347
- Jiao C, Sorensen I, Sun X, Behar H, Alseikh S, Philippe G, Lopez KP, Sun L, Reed R, Jeon S, et al.** (2020) The *Penium margaritaceum* genome: hallmarks of the origins of land plants. *Cell* **181**: 1097–1111
- Kenrick P, Crane PR** (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**: 33–39
- Kong L, Liu Y, Zhi P, Wang X, Xu B, Gong Z, Chang C** (2020) Origins and evolution of cuticle biosynthetic machinery in land plants. *Plant Physiol* **184**: 1998–2010
- Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lü S, Joubès J, Jenks MA** (2009) The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. *Plant Physiol* **151**: 1918–1929
- Krauss P, Markstadter C, Riederer M** (1997) Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant Cell Environ* **20**: 1079–1085
- Lallemand LA, Zubieta C, Lee SG, Wang Y, Acajjaoui S, Timmins J, McSweeney S, Jez JM, McCarthy JG, McCarthy AA** (2012) A structural basis for the biosynthesis of the major chlorogenic acids found in coffee. *Plant Physiol* **160**: 249–260
- Lang D, Ullrich KK, Murat F, Fuchs J, Jenkins JW, Haas FB, Piednoel M, Gundlach H, Van Bel M, Meyberg R, et al.** (2018) The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *Plant J* **93**: 515–533
- Le SQ, Gascuel O** (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* **25**: 1307–1320
- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C** (2000) Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12**: 1295–1306
- Lenton TM, Dahl TW, Daines SJ, Mills BJ, Ozaki K, Saltzman MR, Porada P** (2016) Earliest land plants created modern levels of atmospheric oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 9704–9709
- Levsh O, Chiang YC, Tung CF, Noel JP, Wang Y, Weng JK** (2016) Dynamic conformational states dictate selectivity toward the native substrate in a substrate-permissive acyltransferase. *Biochemistry* **55**: 6314–6326
- Levsh O, Pluskal T, Carballo V, Mitchell AJ, Weng JK** (2019) Independent evolution of rosmarinic acid biosynthesis in two sister families under the Lamiids clade of flowering plants. *J Biol Chem* **294**: 15193–15205

- Li X, Bonawitz ND, Weng JK, Chapple C (2010a) The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids. *Plant Cell* **22**: 1620–1632
- Li X, Bergelson J, Chapple C (2010b) The *Arabidopsis* accession Pna-10 is a naturally occurring *sng1* deletion mutant. *Mol Plant* **3**: 91–100
- Liu Z, Tavares R, Forsythe ES, Andre F, Lugan R, Jonasson G, Boutet-Mercey S, Tohge T, Beilstein MA, Werck-Reichhart D, et al. (2016) Evolutionary interplay between sister cytochrome P450 genes shapes plasticity in plant metabolism. *Nat Commun* **7**: 13026
- Lü S, Zhao H, Des Marais DL, Parsons EP, Wen X, Xu X, Bangarusamy DK, Wang G, Rowland O, Juenger T, et al. (2012) *Arabidopsis* ECERIFERUM9 involvement in cuticle formation and maintenance of plant water status. *Plant Physiol* **159**: 930–944
- Maeda H, Dudareva N (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 73–105
- Matsuno M, Compagnon V, Schoch GA, Schmitt M, Debayle D, Bassard J-E, Pollet B, Hehn A, Heintz D, Pascaline U, et al. (2009) Evolution of a novel phenolic pathway for pollen development. *Science* **325**: 1688–1692
- Molina I, Bonaventure G, Ohlrogge J, Pollard M (2006) The lipid polyester composition of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* seeds. *Phytochemistry* **67**: 2597–2610
- Moody LA, Kelly S, Clayton R, Weeks Z, Emms DM, Langdale JA (2020) NO GAMETOPHORES 2 is a novel regulator of the 2D to 3D growth transition in the moss *Physcomitrella patens*. *Curr Biol* **31**: 1–9
- Morris JL, Puttick MN, Clark JW, Edwards D, Kenrick P, Pressel S, Wellman CH, Yang Z, Schneider H, Donoghue PCJ (2018) The timescale of early land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 201719588
- Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L (2013) Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. *Arab B* **11**: e0167
- Niggeweg R, Michael AJ, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat Biotechnol* **22**: 746–754
- Perroud P-F, Haas FB, Hiss M, Ullrich KK, Alboresi A, Amirebrahimi M, Barry K, Bassi R, Bonhomme S, Chen H, et al. (2018) The *Physcomitrella patens* gene atlas project: large-scale RNA-seq based expression data. *Plant J* **95**: 168–182
- Philippe G, Sørensen I, Jiao C, Sun X, Fei Z, Domozych DS, Rose JK (2020) Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. *Curr Opin Plant Biol* **55**: 11–20
- Porada P, Lenton TM, Pohl A, Weber B, Mander L, Donnadieu Y, Beer C, Poschl U, Kleidon A (2016) High potential for weathering and climate effects of non-vascular vegetation in the Late Ordovician. *Nat Commun* **7**: 12113
- Puttick MN, Morris JL, Williams TA, Cox CJ, Edwards D, Kenrick P, Pressel S, Wellman CH, Schneider H, Pisani D, et al. (2018) The interrelationships of land plants and the nature of the ancestral embryophyte. *Curr Biol* **28**: 733–745
- Ralph J, Lapierre C, Boerjan W (2019) Lignin structure and its engineering. *Curr Opin Biotechnol* **56**: 240–249
- Rautengarten C, Ebert B, Ouellet M, Nafisi M, Baidoo EE, Benke P, Stranne M, Mukhopadhyay A, Keasling JD, Sakuragi Y, et al. (2012) *Arabidopsis* deficient in cutin ferulate encodes a transferase required for feruloylation of ω -hydroxy fatty acids in cutin polyester. *Plant Physiol* **158**: 654–665
- Renault H, Alber A, Horst NA, Basilio Lopes A, Fich EA, Kriegshausner L, Wiedemann G, Ullmann P, Herrgott L, Erhardt M, et al. (2017) A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nat Commun* **8**: 14713
- Renault H, Werck-Reichhart D, Weng J-K (2019) Harnessing lignin evolution for biotechnological applications. *Curr Opin Biotechnol* **56**: 105–111
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud P-F, Lindquist EA, Kamisugi Y, et al. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**: 64–69
- Reski R (2018) Enabling the water-to-land transition. *Nat Plants* **4**: 67–68
- Reski R, Abel WO (1985) Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopen-tenyladenine. *Planta* **165**: 354–358
- Retallack GJ (1997) Early forest soils and their role in devonian global change. *Science* **276**: 583–585
- Riley RG, Kolattukudy PE (1975) Evidence for covalently attached p-coumaric acid and ferulic acid in cutins and suberins. *Plant Physiol* **56**: 650–654
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **37**: e45
- Saleme MdLS, Cesarino I, Vargas L, Kim H, Vanholme R, Goeminne G, Van Acker R, Fonseca FCdA, Pallidis A, Voorend W, et al. (2017) Silencing CAFFEYOYL SHIKIMATE ESTERASE affects lignification and improves saccharification in poplar. *Plant Physiol* **175**: 1040–1057
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779–815
- Sander M, Petersen M (2011) Distinct substrate specificities and unusual substrate flexibilities of two hydroxycinnamoyltransferases, rosmarinic acid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl-transferase, from *Coleus blumei* Benth. *Planta* **233**: 1157–1171
- Schoch G, Goepfert S, Morant M, Hehn A, Meyer D, Ullmann P, Werck-Reichhart D (2001) CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem* **276**: 36566–36574
- Schoch GA, Morant M, Abdulrazzak N, Asnagli C, Goepfert S, Petersen M, Ullmann P, Werck-Reichhart D (2006) The meta-hydroxylation step in the phenylpropanoid pathway: a new level of complexity in the pathway and its regulation. *Environ Chem Lett* **4**: 127–136
- Sibout R, Le Bris P, Legee F, Cezard L, Renault H, Lapierre C (2016) Structural redesigning *Arabidopsis* lignins into alkali-soluble lignins through the expression of p-coumaroyl-CoA:Monolignol Transferase PMT. *Plant Physiol* **170**: 1358–1366
- Silber MV, Meimberg H, Ebel J (2008) Identification of a 4-coumarate:CoA ligase gene family in the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* **69**: 2449–2456
- Urban P, Mignotte C, Kazmaier M, Delorme F, Pompon D (1997) Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J Biol Chem* **272**: 19176–19186
- Vanholme R, Cesarino I, Rataj K, Xiao Y, Sundin L, Goeminne G, Kim H, Cross J, Morreel K, Araujo P, et al. (2013) Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Science* **341**: 1103–1106
- Vogt T (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* **3**: 2–20
- Wagner A, Ralph J, Akiyama T, Flint H, Phillips L, Torr K, Nanayakkara B, Te Kiri L (2007) Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase in *Pinus radiata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11856–11861
- Weng JK, Akiyama T, Ralph J, Chapple C (2011) Independent recruitment of an O-methyltransferase for syringyl lignin biosynthesis in *Selaginella moellendorffii*. *Plant Cell* **23**: 2708–2724

- Weng JK, Chapple C** (2010) The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* **187**: 273–285
- Weng JK, Li X, Stout J, Chapple C** (2008) Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 7887–7892
- Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, Warnow T, Carpenter E, Matasci N, Ayyampalayam S, Barker MS, Burleigh JG, Gitzendanner MA, et al.** (2014) Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E4859–E4868
- Yeats TH, Rose JKC** (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol* **163**: 5–20
- Yin R, Han K, Heller W, Albert A, Dobrev PI, Zajímalová E, Schäffner AR** (2014) Kaempferol 3-O-rhamnoside-7-O-rhamnoside is an endogenous flavonol inhibitor of polar auxin transport in *Arabidopsis* shoots. *New Phytol* **201**: 466–475

L'enzyme PpFHT connecte la voie des phénylpropanoïdes et le métabolisme lipidique dans la biosynthèse de la cutine

Introduction

L'étude de la voie des phénylpropanoïdes chez les bryophytes a montré l'importance de cette voie métabolique dans la synthèse de précurseurs phénoliques du polymère de cutine. Chez *P. patens*, l'étude fonctionnelle des gènes *PpCYP73s*, *PpHCT* et *PpCYP98* a permis de connaître la composition de la cutine de cette espèce, et d'appréhender la manière dont le polymère est structuré. La cutine de *P. patens* contient deux monomères phénoliques, le *p*-coumarate et le caféate. Les autres monomères majoritaires sont le glycérol, le C16:0, le diOH-C16 et le triOH-C18 (fig. 15D). Ces monomères sont reliés par des liaisons ester formées entre leurs fonctions acides carboxyliques et hydroxyles. Toutefois, si la composition du polymère est connue, une grande diversité de structures macromoléculaires sont théoriquement possibles. Les mutants *hct* et *cyp98*, affectés dans la synthèse de caféate mais pas du *p*-coumarate, montrent que le caféate a une position centrale dans la synthèse et la structure de l'ensemble du polymère (Kriegshauser *et al.*, 2021 ; Renault *et al.*, 2017a). Il existe donc une connexion métabolique entre la voie des phénylpropanoïdes et celles des acides gras pour la biosynthèse de la cutine.

Chez les plantes vasculaires, plusieurs enzymes sont connues pour former des liaisons ester entre les monomères phénoliques et aliphatiques de la cutine ou de la subérine. Toutes ces enzymes sont des hydroxycinnamoyl-transférases, et appartiennent à la famille des BAHDs. Les BAHDs sont des acyl-transférases cytosoliques impliquées dans de nombreuses réactions, qui catalysent l'estérification d'un substrat donneur activé par du coenzyme-A sur la fonction hydroxyle ou amine d'un substrat accepteur (D'Auria, 2006). Les BAHDs sont subdivisées en cinq clades. Le clade V regroupe toutes les BAHDs caractérisées pour leur activité hydroxycinnamoyl-transférase, dont les enzymes HCTs (Molina et Kosma, 2015). D'autres BAHDs du clade V estérifient un hydroxycinnamoyl-CoA avec un alcool gras ou un acide gras hydroxylé. L'enzyme AtDCF (pour « déficient in cutin ferulate ») est une FERULOYL-CoA:HYDROXPALMITIC ACID FERULOYL TRANSFERASE, qui catalyse le transfert du férulate du féruloyl-CoA sur le ω OH-C16 (fig. 18). La faible teneur en férulate de la cutine d'*A. thaliana* est réduite de 88% dans le mutant *Atdcf*, sans que la composition du polymère

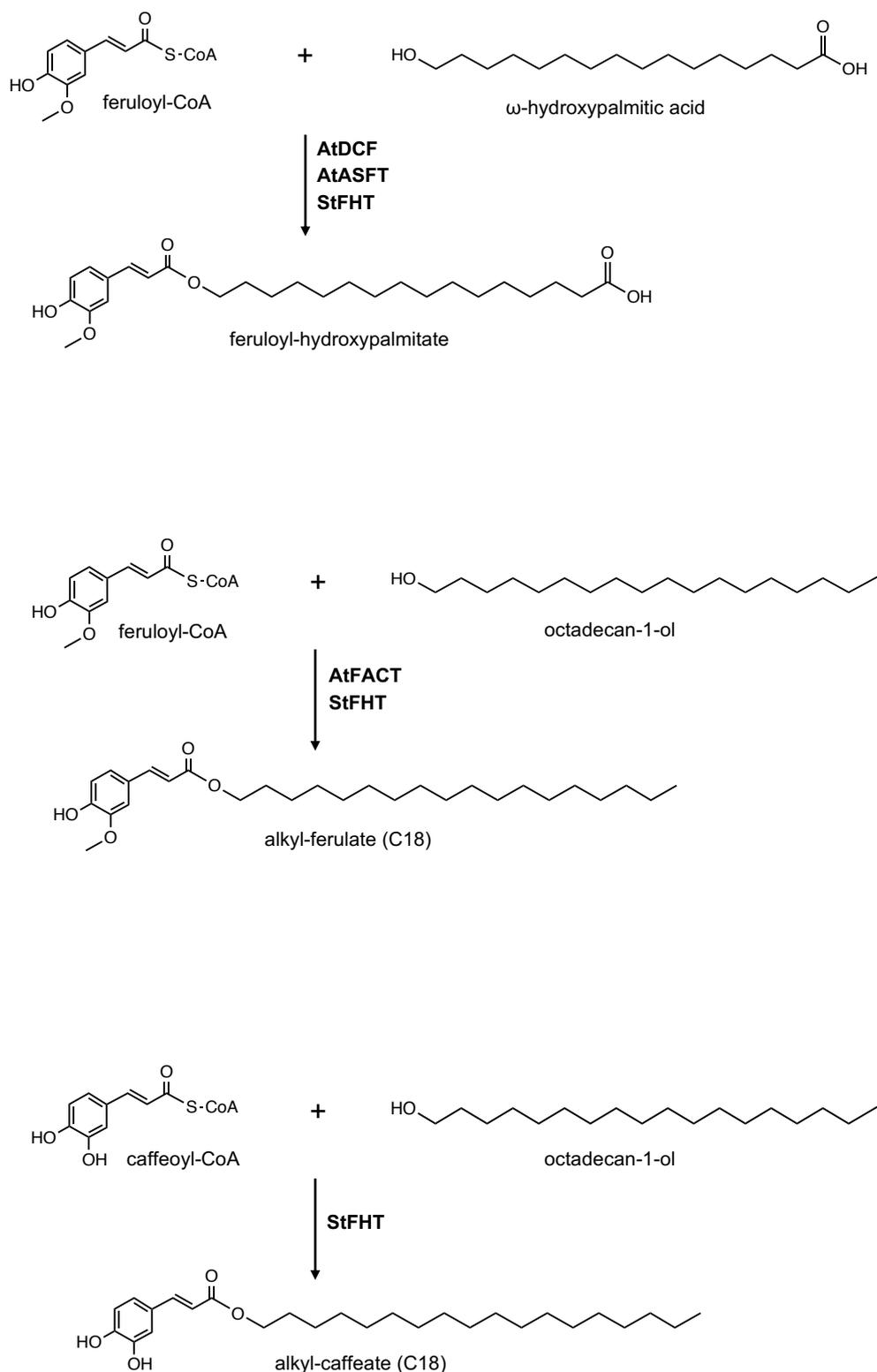


Figure 18 : Exemples de BAHDs hydroxycinnamoyl-transférases utilisant des accepteurs lipidiques.

Les protéines AtDCF, AtASFT, AtFACT et StFHT ont été caractérisées biochimiquement et fonctionnellement pour leur rôle dans l'incorporation d'acides hydroxycinnamiques dans la cutine ou la subérine. Ces enzymes ont une activité HYDROXYCINNAMOYL-CoA: ω -HYDROXYACID O-HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE (HHT) ou HYDROXYCINNAMOYL-CoA:FATTY ALCOHOL O-HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE (HFAT). Les exemples montrés correspondent à des activités identifiées *in vitro* et/ou *in planta*. Pour les activités HFAT, les réactions ont été démontrées *in vitro* avec des alcools gras à chaîne courte, mais l'activité biologique implique vraisemblablement des alcools gras à longue chaîne, comme l'octadecan-1-ol représenté ici. D'après Rautengarten *et al.* (2012), Molina *et al.* (2007), Gou *et al.* (2009), Serra *et al.* (2010), Cheng *et al.* (2013) et Molina et Kosma (2015).

soit d'une autre manière altérée. Les propriétés de la cuticule ne semblent également pas affectées, puisque la diminution de la teneur en férulate n'impacte pas la perméabilité de la cuticule, ni la sensibilité de la plante aux agents pathogènes et aux herbivores (Rautengarten *et al.*, 2012). L'enzyme AtASFT (ALIPHATIC SUBERIN FERULOYL TRANSFERASE) possède la même activité enzymatique que AtDCF (fig. 18). La subérine des racines et des graines du mutant *Atasft* contient moins d'acides gras hydroxylés et ne contient presque pas de férulate en comparaison au WT. La quantité totale de subérine reste similaire grâce à une teneur plus élevée en acides dicarboxyliques, mais les racines et les graines sont plus perméables et le mutant est plus sensible au stress salin (Molina *et al.*, 2007 ; Gou *et al.*, 2009). L'enzyme AtFACT (FATTY ALCOHOL: CAFFEOYL-CoA CAFFEOYL TRANSFERASE) estérifie le caféoyl-CoA au dodécan-1-ol. L'enzyme catalyse vraisemblablement la même réaction avec les alcools primaires C18, C20 et C22 comme accepteur *in planta*, mais ces réactions sont difficilement testables *in vitro* à cause de l'insolubilité des substrats (fig. 18 ; Molina et Kosma, 2015). Les cires non polymérisées de la subérine racinaire du mutant *Atfact* contiennent moins d'alkyl-caféates (C18, C20 et C22) et plus d'alkyl-coumarates (C18, C20 et C22) ; la composition de la subérine elle-même est par ailleurs peu affectée. L'enzyme semble donc être spécifiquement responsable de la formation des alkyl-caféates des cires, sans qu'une fonction biologique associée ait été identifiée (Kosma *et al.*, 2012). De manière similaire, l'enzyme StFHT (ω -HYDROXYACID/FATTY ALCOHOL HYDROXYCINAMOYL TRANSFERASE), caractérisée chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) peut transférer du férulate sur le ω OH-C16, le dodécan-1-ol et le tétradécan-1-ol en utilisant du féruloyl-CoA (fig. 18). Des lignées RNAi *FHT* accumulent moins de férulate dans la subérine, et moins d'alkyl-férulates (C18→C31) dans les cires de la subérine des tubercules. Bien que la quantité totale de subérine soit similaire, les tubercules de ces lignées sont 15 fois plus perméables que les tubercules WT (Serra *et al.*, 2010). Enfin, l'enzyme PtFHT1 caractérisée chez le peuplier (*Populus trichocarpa*) catalyse les mêmes réactions que StFHT, avec une spécificité de substrat plus grande : l'enzyme accepte le féruloyl-CoA et le *p*-coumaroyl-CoA comme donneur, et le ω OH-C16 ainsi que les alcools primaires C6→C14 comme accepteur (fig. 18). La surexpression constitutive de *PtFHT* dans *A. thaliana* provoque une augmentation de la teneur en férulate dans la subérine des graines et des racines, ainsi que dans la cutine des feuilles (Cheng *et al.*, 2013).

Plusieurs enzymes ont ainsi été caractérisées biochimiquement et fonctionnellement pour leur rôle dans l'incorporation d'acides hydroxycinnamiques dans la cutine et la subérine. Leur activité peut être liée à la synthèse de la cutine et/ou de la subérine et/ou des cires, et est

plus ou moins importante dans la structure et la fonction des polymères apoplastiques. Les réactions enzymatiques catalysées par ces BAHDs sont similaires voire identiques : il s'agit d'activités $\text{HYDROXYCINNAMOYL-CoA}:\omega\text{-HYDROXYACID O-HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE}$ (HHT), ou $\text{HYDROXYCINNAMOYL-CoA:FATTY ALCOHOL O-HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE}$ (HFAT). Il semble donc exister un mécanisme conservé chez les plantes vasculaires pour l'estérification des acides hydroxycinnamiques aux polymères apoplastiques. Ces exemples soulèvent la question de l'existence d'un tel mécanisme également chez les bryophytes. Lors de sa thèse au laboratoire, Lucie Kriegshauser a recherché l'existence chez les bryophytes de gènes homologues aux hydroxycinnamoyl transférases caractérisées chez les trachéophytes. Son travail a permis de caractériser l'enzyme PpFHT, une BAHD impliquée dans la synthèse d'un précurseur de cutine chez *P. patens*, par un mécanisme analogue aux autres BAHDs de classe V (Kriegshauser, 2018). Au cours de ma thèse, j'ai pu poursuivre ce travail, notamment par l'approfondissement de la caractérisation du mutant *Ppfht* et des propriétés enzymatiques de PpFHT.

Résultats

Un clade de BAHD de classe V a une origine commune chez les embryophytes

La présence d'homologues chez les bryophytes des hydroxycinnamoyl transférases caractérisées chez les trachéophytes a été recherchée grâce à l'analyse phylogénétique de la famille BAHD, réalisée pour identifier des homologues d'HCT chez les bryophytes et les charophytes (fig. 19). L'arbre phylogénétique montre l'existence d'un clade sœur d'HCT qui regroupe l'ensemble des BAHDs caractérisées pour être des hydroxycinnamoyl transférases responsables de l'intégration des acides hydroxycinnamiques dans la cutine ou la subérine. Nous avons nommé ce clade « FHT » en référence aux protéines du même nom. Le clade FHT comporte trois protéines des trois espèces représentatives des clades bryophytes, mais aucune protéine d'une espèce charophyte. La relation phylogénétique des séquences de ce clade reflète par ailleurs la séparation des bryophytes et des trachéophytes, et donc l'histoire évolutive des embryophytes. Le clade FHT possède donc une origine commune, dont l'émergence remonte à un ancêtre commun des embryophytes. L'étude fonctionnelle et/ou biochimique de AtDCF, AtASFT, AtFACT, StFHT et PtFHT1 suggère une activité et un rôle relativement conservés de cette sous-famille de BAHDs au sein des trachéophytes. Si des duplications du gène ancestral ont pu avoir lieu au cours de l'évolution chez les trachéophytes, tel chez *A. thaliana*, les trois espèces bryophytes séquencées possèdent une seule copie du gène. L'étude fonctionnelle

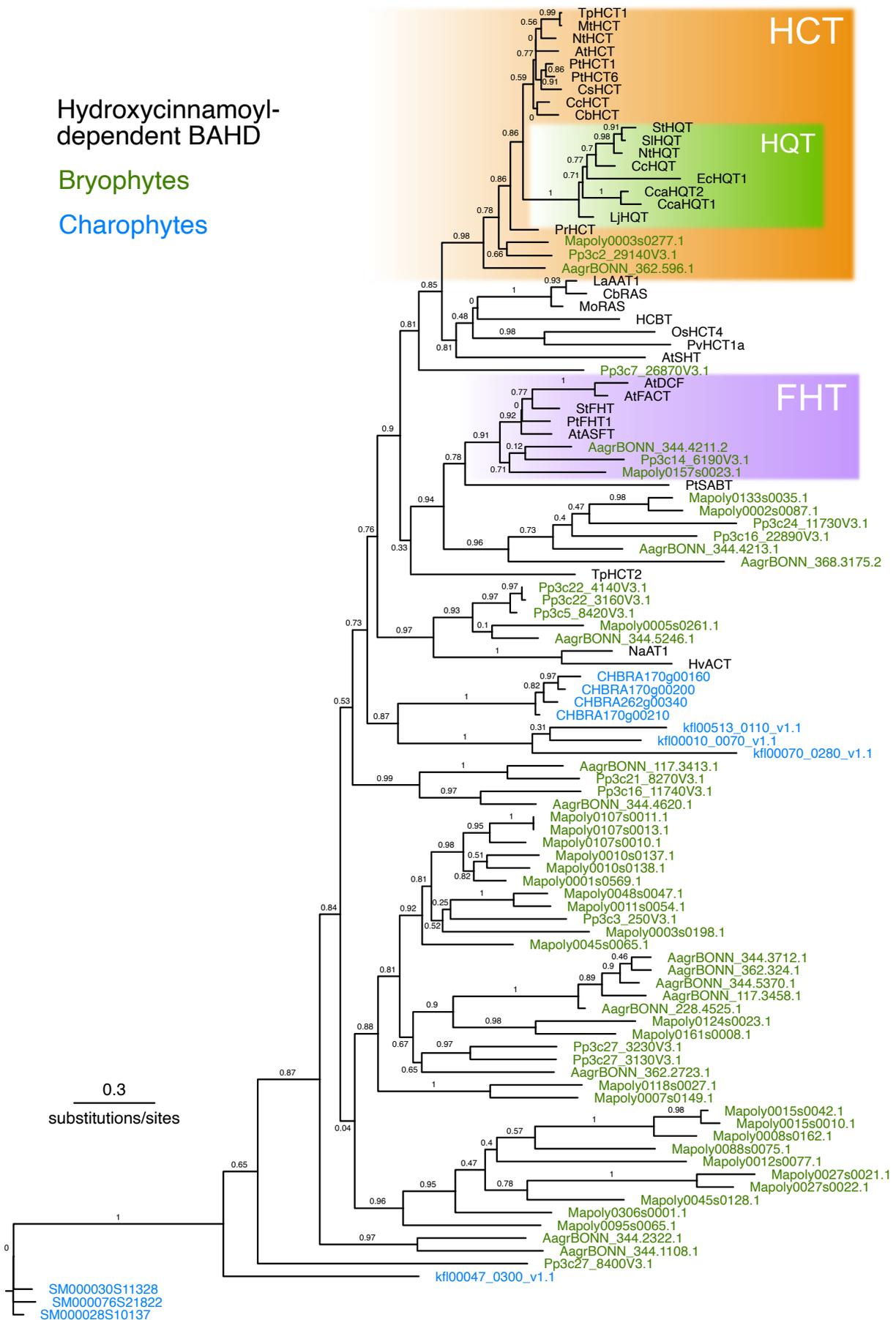


Figure 19 : Histoire évolutive des BAHDs hydroxycinnamoyl-transférases.

L'arbre phylogénétique non enraciné a été réalisé à partir d'un alignement de séquences protéiques de BAHDs hydroxycinnamoyl-transférases caractérisées chez les trachéophytes, et de toutes les BAHDs d'espèces bryophytes (*P. patens*, *M. polymorpha*, *A. agrestis*) et charophytes (*K. nitens*, *C. braunii*, *S. muscicola*). Un clade sœur du clade HCT/HQT regroupe toutes les BAHDs hydroxycinnamoyl-transférases caractérisées pour leur rôle dans la synthèse de la cutine ou de la subérine. Ce clade « FHT » comporte un membre unique pour chaque espèce bryophyte, et aucun membre charophyte, suggérant ainsi une apparition dans l'ancêtre commun des embryophytes. D'après Kriegshauser *et al.* (2021).

de ce gène chez les bryophytes permet ainsi d'étudier la conservation et l'évolution de ce clade au sein des plantes terrestres. Cette démarche a été réalisée sur le gène de *P. patens*, *Pp3c14_6190*, appelé *PpFHT* en raison de sa position phylogénétique dans le clade du même nom (fig. 19).

Le mutant *Ppfht* est affecté dans la biosynthèse de cutine

Un mutant KO *Ppfht* ont été obtenu par CRISPR/Cas9 afin d'étudier la fonction du gène *PpFHT*. Quatre lignées génétiquement indépendantes ont été générées (Kriegshauser, 2018). Le phénotype macroscopique de ces lignées est similaire aux phénotypes observés chez les mutants *cyp73a48/a49*, *hct* et *cyp98* de *P. patens* : le développement des gamétophores est presque entièrement inhibé, la formation de ces organes aériens étant stoppée dès leur apparition depuis le protonema. Néanmoins, ce phénotype est légèrement moins fort chez le mutant *fht*, dont les gamétophores possèdent quelques courtes phyllides. Les gamétophores sont également entièrement perméables au bleu de toluidine, témoignant d'une forte altération des propriétés de la cuticule (fig. 20A). Une observation de la cuticule des gamétophores par microscopie électronique à transmission montre effectivement une déstructuration de la cuticule du mutant *fht*. A l'inverse de la cuticule des gamétophores de plantes WT, dans laquelle il est possible d'identifier le « cuticle layer » et le « cuticle proper » au-dessus de la paroi, il est impossible d'identifier une telle structure dans la cuticule du mutant *fht*. D'autre part, la cuticule de ce mutant est plus fine et irrégulière que la cuticule de plantes WT (fig. 20B). Pour comprendre si cette forte altération de la cuticule est liée à une modification de la composition de la cutine, la cutine des gamétophores WT et *fht* a été analysée par GC-FID. La composition de la cutine du mutant *fht* est fortement altérée par la diminution drastique de la teneur de la plupart des monomères par rapport aux teneurs mesurées dans la cutine des plantes WT. Notamment, la teneur en caféate est 2,5 fois inférieure. L'ensemble des acides gras non hydroxylés, ainsi que le triOH-C18, voient aussi leur teneur fortement diminuée. Le diOH-C16 est le monomère le plus affecté, avec une baisse de 96%, alors que la teneur en ω OH-C16 n'est pas impactée. La teneur en glycérol n'est en revanche pas significativement inférieure (fig. 20C). Ainsi, le phénotype macroscopique caractéristique d'un défaut de cuticule du mutant *fht* peut être relié à une forte altération de la structure de la cuticule et de la composition de la cutine.

PpFHT a une activité HHT

PpFHT appartient à un clade de BAHDs dont les membres caractérisés possèdent une activité HHT ou HFAT. Ces enzymes utilisent un hydroxycinnamoyl-CoA en donneur, et un

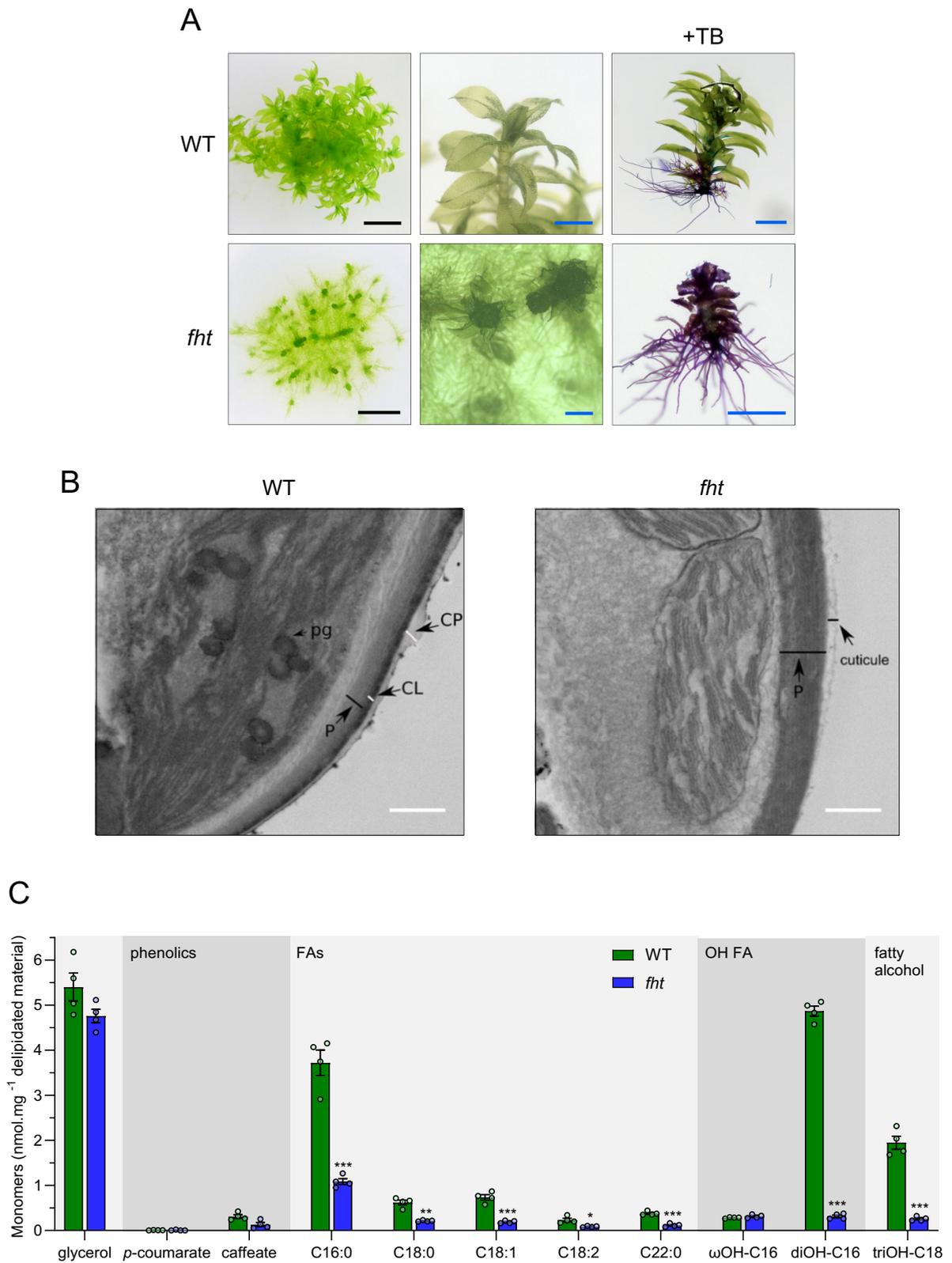


Figure 20 : Investigation de la fonction biologique de PpFHT.

A : Phénotypes des colonies et gamétophores des lignées sauvages et mutantes. Les gamétophores du mutant *fht* sont perméable au bleu de toluidine (TB). Échelles : noire 5 mm ; bleue 1 mm. **B** : Structure de la cuticule observée par microscopie électronique à balayage, sur des coupes transversales de phyllides de *P. patens* WT et *fht*. P : paroi ; CL : couche cuticulaire ou « cuticule layer » ; CP : cuticule à proprement dit ou « cuticule proper » ; pg : plastoglobules chloroplastiques. Échelle : 400 nm. D'après Kriegshauser (2018). **C** : Composition du polymère cuticulaire des plantes WT et *fht*, établi par GC-MS après purification et dépolymérisation de la cutine (collaboration avec Bénédicte Bakan, INRAe Nantes). Les données représentent la moyenne de quatre lignées indépendantes \pm l'erreur standard. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

acide gras hydroxylé et/ou un alcool gras en accepteur. Si PpFHT possède une activité similaire impliquée dans la synthèse de cutine, cette activité peut être inférée d'après la composition de la cutine des plantes WT et *fht*. Les deux donneurs potentiels sont le *p*-coumaroyl-CoA et le caféoyl-CoA, les hydroxycinnamoyl-CoA correspondant au *p*-coumarate et au caféate, respectivement. Les accepteurs potentiels d'une telle réaction enzymatique sont les deux acides gras hydroxylés et l'unique alcool gras de la cutine de *P. patens* : le ω OH-C16, le diOH-C16 et le triOH-C18. Les différences des teneurs de ces monomères entre la cutine des plantes WT et *fht* suggèrent davantage que l'activité biologique de *P. patens* utiliserait le caféoyl-CoA en donneur, et le diOH-16 et/ou le triOH-C18 en accepteur. Comme un standard chimique du triOH-C18 n'est pas disponible commercialement, l'activité de PpFHT a été testée avec le *p*-coumaroyl-CoA et le caféoyl-CoA comme donneur, et le ω OH-C16 et le diOH-C16 comme donneur, soit quatre réactions théoriques au total (fig. 21). Le diOH-C16, non disponible commercialement, a été purifié à partir de cutine de tomate par l'équipe de Bénédicte Bakan à l'INRAe de Nantes. La protéine recombinante PpFHT a été produite et purifiée à partir d'une souche d'*E. coli* transformée pour exprimer la séquence codante de *PpFHT*. Les produits des réactions enzymatiques ont été analysés par UPLC-MS/MS. Les produits attendus des réactions enzymatiques ne sont pas disponibles en tant que standards chimiques, et sont imaginés théoriquement d'après la nature des substrats fournis à l'enzyme : *p*-coumaroyl-palmitate, *p*-coumaroyl-hydroxypalmitate, caféoyl-palmitate et caféoyl-hydroxypalmitate (fig. 21). Pour identifier ces molécules potentielles, des méthodes MRM ont été développées à l'issue des réactions enzymatiques. Les produits des réactions enzymatiques ont dans un premier temps été extraits et infusés directement dans le spectromètre de masse. Le développement des méthodes MRM consiste à cibler le *m/z* théorique de chaque produit théorique, et rechercher sans a priori les conditions de fragmentation qui génèrent des fragments caractéristiques à partir d'ion moléculaire. Les produits des réactions enzymatiques ont ensuite été analysés par UHPLC-MS/MS avec les mêmes méthodes MRM. Pour chacune des quatre réactions enzymatiques, le *m/z* théorique de l'ion moléculaire attendu a été détecté. La fragmentation de ces ions moléculaires forme systématiquement des ions fils dont les *m/z* correspondent à l'acide hydroxycinamique issu du clivage des liaisons ester des molécules attendues (fig. 22A). La fragmentation spécifique de ces molécules et le développement des méthodes MRM a effectivement permis leur identification par UHPLC-MS/MS à partir des produits des réactions enzymatiques (fig. 22B). La différence des temps de rétention des quatre molécules est par ailleurs cohérente avec leur polarité (caféoyl-hydroxypalmitate < caféoyl-palmitate < *p*-coumaroyl-hydroxypalmitate < *p*-coumaroyl-palmitate). Bien que nous ne disposions pas de

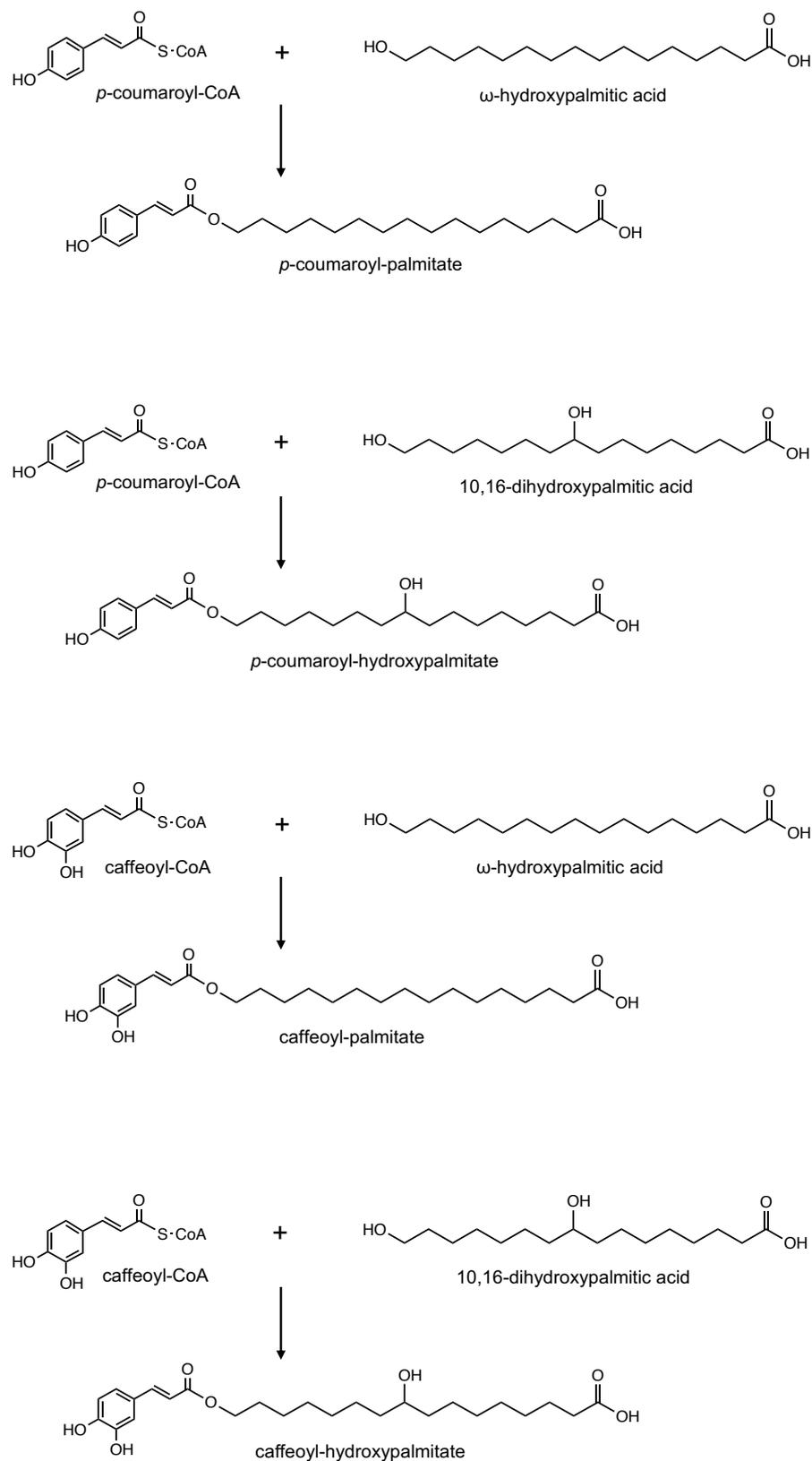


Figure 21 : Activités potentielles de PpFHT.

Quatre activités enzymatiques potentielles ont été testées avec la protéine recombinante PpFHT. Deux donneurs – le *p*-coumaroyl-CoA et le caféoyl-CoA – et deux accepteurs – l'acide ω -hydroxypalmitique et l'acide 10,16-dihydroxypalmitique – ont été testés, formant quatre produits théoriques : le *p*-coumaroyl-palmitate, le *p*-coumaroyl-hydroxypalmitate, le caféoyl-palmitate et le caféoyl-hydroxypalmitate.

A

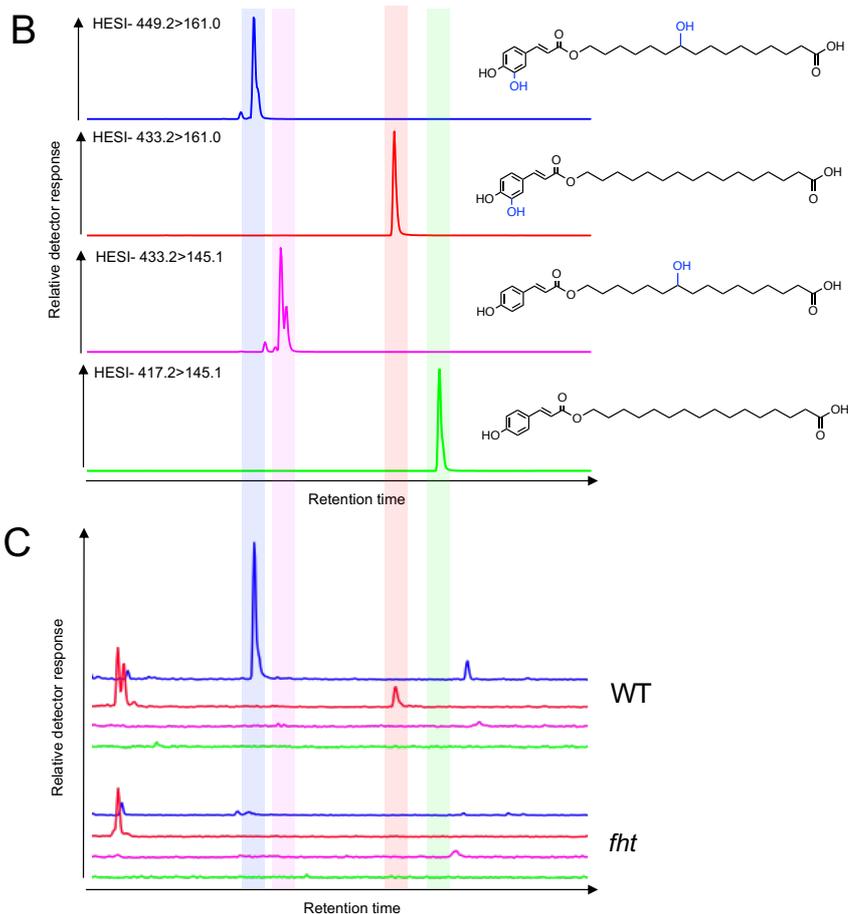
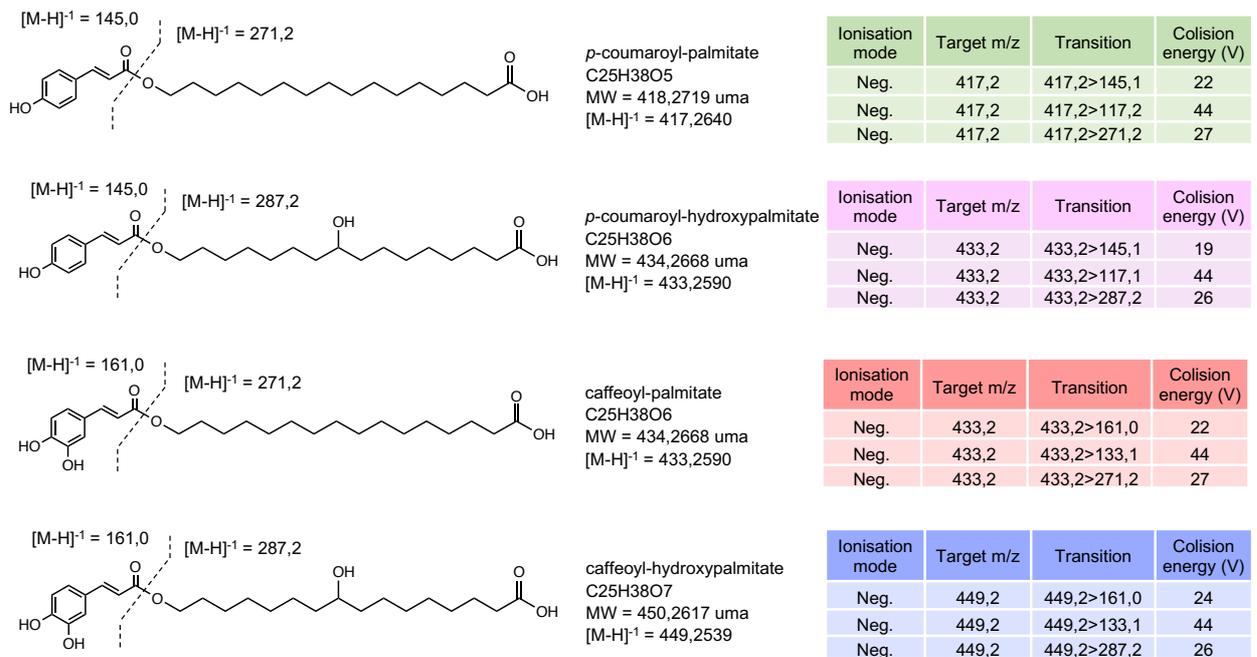


Figure 22 : Identification des produits enzymatiques de PpFHT.

A : Fragmentation théorique et expérimentales des produits enzymatiques de PpFHT. Pour chacun des couples de substrats testés, l'analyse des produits enzymatiques par HESI(-)-MS/MS permet la détection d'un ion parent dont le m/z correspond à l'ion moléculaire $[M-H]^-$, et dont la fragmentation forme des ions fils aux m/z attendus d'après le clivage de la liaison ester. **B** : L'analyse des produits enzymatiques de PpFHT par UHPLC-MS/MS permet la détection spécifique des molécules identifiées par spectrométrie de masse. **C** : Parmi les quatre produits enzymatiques de PpFHT, seuls le caféoyl-hydroxypalmitate et, dans une moindre mesure, le caféoyl-palmitate sont identifiés par UHPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores WT. Ces deux molécules sont absentes des extraits du mutant *fht*.

standards chimiques de ces quatre molécules, leur identification est permise grâce au fait qu'elles soient produites par des réactions enzymatiques avec des couples de substrats connus, et que leur comportement en UPLC-MS/MS soit cohérent avec leur structure. PpFHT a donc une activité HHT à partir de plusieurs substrats donneur et accepteur *in vitro*.

PpFHT catalyse la formation du caféoyl-hydroxypalmitate, un intermédiaire de la cutine de *P. patens*

La nature de l'activité enzymatique de PpFHT a été postulée d'après la composition de la cutine de *P. patens*, puis a été démontrée *in vitro*. L'identification des quatre produits de l'activité de l'enzyme *in vitro* a permis de rechercher leur présence *in planta* par l'analyse d'extraits de gamétophores WT et *fht* en utilisant les mêmes méthodes UHPLC-MS/MS. Parmi les quatre produits recherchés, seuls le caféoyl-hydroxypalmitate et dans une moindre mesure le caféoyl-palmitate sont identifiés dans les extraits de gamétophores WT. Aucune des molécules n'est en revanche détectée dans les extraits de gamétophores du mutant *fht* (fig. 22C). Ainsi, le caféoyl-hydroxypalmitate et le caféoyl-palmitate sont synthétisés par *P. patens*, mais ne sont pas synthétisés ou accumulés dans le mutant *fht*. Il est possible que le *p*-coumaroyl-palmitate et le *p*-coumaroyl-hydroxypalmitate soient également synthétisés par *P. patens*, mais que leur accumulation soit trop faible pour être détectée dans nos conditions analytiques. Au vu de ces résultats et de l'activité enzymatique de PpFHT, nous en déduisons que PpFHT synthétise le caféoyl-hydroxypalmitate et le caféoyl-palmitate *in planta*. La différence de composition de la cutine entre les plantes WT et *fht* nous amènent à penser que le caféoyl-hydroxypalmitate est le principal produit biologique de PpFHT. L'absence de cette étape enzymatique empêche l'intégration de la plupart du caféate et du diOH-C16 dans le polymère de cutine. Le caféoyl-hydroxypalmitate est donc un intermédiaire crucial dans la voie de biosynthèse de la cutine de *P. patens*.

Discussion

Le clade FHT a une origine commune et une fonction conservée chez les embryophytes

L'analyse phylogénétique réalisée montre l'existence d'un clade unique de BAHD regroupant l'ensemble des protéines HHTs ou HFATs caractérisées à ce jour, ainsi que PpFHT et deux homologues uniques de *M. polymorpha* et *A. agrestis* (fig. 19). Ce clade a ainsi une origine commune chez les embryophytes. Nous avons pu caractériser biochimiquement et

fonctionnellement PpFHT, et montré que cette BAHD possède également une activité HHT liée à la biosynthèse de cutine. Bien que les substrats métabolisés par les BAHDs de ce clade puissent être différents, il s'agit toujours d'une réaction dont les deux substrats sont un hydroxycinnamoyl-CoA et un acide gras hydroxylé ou un alcool gras. L'activité HHT/HFAT est donc conservée au sein de cette famille. Par ailleurs, l'analyse fonctionnelle de ces protéines montre que toutes ces BAHDs sont impliquées dans l'incorporation d'une partie des acides hydroxycinnamiques dans un polymère apoplastique (cutine ou subérine) ou dans les cires enchâssées dans ces mêmes polymères. L'activité et la fonction des gènes de ce clade sont donc conservées au sens large. L'évolution des gènes du clade FHT, accompagnée d'évènements de duplications chez les plantes vasculaires, a conduit à une certaine variabilité des activités enzymatiques et des fonctions biologiques. L'analyse fonctionnelle de PpFHT, présent en copie unique chez *P. patens*, éclaire davantage la manière dont le clade FHT a pu apparaître et évoluer chez les embryophytes.

PpFHT connecte le métabolisme phénolique et lipidique dans la biosynthèse de la cutine

Chez *P. patens*, PpFHT est impliquée dans l'incorporation des acides hydroxycinnamiques dans le polymère de cutine, notamment le caféate. L'absence d'activité FHT et la diminution de la teneur en caféate dans la cutine du mutant *fht* entraînent des conséquences directes ou indirectes majeures sur la composition de la cutine, la structure de la cuticule et le développement de la plante. En plus de la différence de teneur en caféate entre la cutine des plantes WT et *fht*, les teneurs des monomère aliphatiques majoritaires sont très inférieures dans la cutine du mutant *fht*, notamment le C16, le diOH-C16 et le triOH-C18 (fig. 20C). Cet impact sur la composition du polymère déstructure l'organisation macromoléculaire de la cuticule, qui est constituée d'une couche unique et discontinue dans les gamétophores du mutant *fht* (fig. 20B). Ce défaut de cuticule provoque une perméabilité des gamétophores et empêche leur développement (fig. 20A). Ce phénotype à l'échelle moléculaire, microscopique et macroscopique, est semblable aux phénotypes des mutants *cyp73a48/a49*, *hct* (Kriegshauser *et al.*, 2021) et *cyp98* (Renault *et al.*, 2017a), affectés dans la voie des phénylpropanoïdes, en amont du caféoyl-CoA (fig. 11). L'analyse fonctionnelle de ces mutants a montré que la biosynthèse du caféoyl-CoA est nécessaire à la synthèse et à la présence de caféate dans la cutine, et que ce monomère joue un rôle central dans l'ensemble de la synthèse et de la structure du polymère. PpFHT étant responsable de la synthèse *in vivo* du caféoyl-hydroxypalmitate à partir du caféoyl-CoA et du diOH-C16, l'enzyme connecte la voie des phénylpropanoïdes

caractérisée jusqu'à présent, avec le métabolisme des acides gras hydroxylés, dans la voie de biosynthèse de la cutine. Cette connexion démontre une nouvelle fois l'importance de la voie des phénylpropanoïdes dans la biosynthèse de cutine. Les phénotypes redondants des mutants affectés dans cette voie sont liés à un défaut de cuticule, mais il est possible qu'affecter la voie métabolique dans son ensemble ait d'autres conséquences, telle que l'altération d'une voie de signalisation inconnue, et affecte d'une autre manière le développement des gamétophores. L'activité enzymatique de PpFHT suggère un rôle de la protéine uniquement lié à la biosynthèse de la cutine. Le phénotype fort du mutant *fht* n'est donc à priori pas lié à l'altération d'autres fonctions du métabolisme phénolique, et affirme le rôle central de cette voie métabolique dans la biosynthèse de la cutine et le développement de *P. patens*.

L'activité PpFHT conditionne l'incorporation des monomères aliphatiques de la cutine

La caractérisation de PpFHT apporte de nouvelles informations quant à la biosynthèse de la cutine de *P. patens*. L'enzyme synthétise un précurseur central de la cutine : le caféoyl-hydroxypalmitate. Cette molécule peut être le précurseur direct du caféate et du diOH-C16 présents dans la cutine. La teneur de ces deux monomères est d'ailleurs drastiquement réduite dans la cutine du mutant *fht* (fig. 20C). Cependant, il est notable que leur proportion relative dans le polymère n'est pas stœchiométrique : la cutine des gamétophores WT contient 15 fois plus de diOH-C16 que de caféate. De même, la diminution des teneurs de ces deux monomères dans la cutine du mutant *fht* ne suit pas un ratio stœchiométrique : la cutine du mutant contient 15,4 nmol.mg⁻¹ de diOH-C16 et 2,3 nmol.mg⁻¹ de caféate de moins en comparaison au WT (fig. 20C). Si le caféoyl-hydroxypalmitate était l'unique précurseur direct du caféate et du diOH-C16, leur teneur dans le polymère et leur diminution dans la cutine du mutant *fht* seraient théoriquement équivalentes. S'il est possible que le caféoyl-hydroxypalmitate soit bien le précurseur direct de l'incorporation du caféate dans le polymère de cutine, d'autres mécanismes sont responsables de la plus grande estérification du diOH-C16 dans le polymère. Plusieurs scénarii sont alors envisageables. Le caféoyl-hydroxypalmitate peut ainsi être le précurseur direct et unique du diOH-C16, après le clivage de la liaison ester et estérification du diOH-C16 uniquement au polymère. Alternativement, une proportion de diOH-C16 égale à la quantité de caféate provient du caféoyl-hydroxypalmitate, et l'excès de diOH-C16 provient d'un autre mécanisme inconnu, impliquant d'autres enzymes. Dans les deux hypothèses, l'activité PpFHT et la synthèse de caféoyl-hydroxypalmitate sont également nécessaires à l'estérification des autres monomères aliphatiques dont les teneurs dans la cutine du mutant *fht* sont aussi réduites

par rapport WT, exception faite du ω OH-C16 (fig. 20C). Les acides gras saturés non hydroxylés, qui représentent 30% de la cutine (en molarité), forment nécessairement des liaisons ester avec la fonction hydroxyle d'autres monomères du polymère. A l'inverse, le diOH-C16 peut former un polyester entre ses propres fonctions hydroxyles et acides carboxyliques. Le ω OH-C16 et le triOH-C18 peuvent aussi être estérifiés avec le diOH-C16 et former un polymère hétérogène. La composition de la cutine de *P. patens* suggère fortement l'existence d'un tel type de polymère, au vu de la place principale du diOH-C16 et du triOH-C18. Quelle que soit la structure macromoléculaire du polyester de cutine de *P. patens*, la présence du diOH-C16 fournit un excès de fonctions hydroxyles libres, qui sont disponibles pour la formation de liaisons ester avec d'autres monomères. La diminution simultanée des teneurs en diOH-C16 et acides gras non hydroxylés dans la cutine du mutant *fht* suggère ainsi que la présence de diOH-C16 soit nécessaire à l'estérification des acides gras non hydroxylés, en rendant chimiquement possible la création de liaisons ester entre ces deux types de monomères aliphatiques. De même, la présence de diOH-C16 est vraisemblablement nécessaire à l'estérification du triOH-C18, qui ne peut pas former un polyester seul ou avec les acides gras non hydroxylés. De façon intéressante, la teneur en glycérol est similaire dans la cutine des gamétophores WT et *fht*. Son incorporation au polymère n'est donc pas impactée par l'absence d'activité FHT ni par la modification de la composition du polymère. Ainsi, si le caféoyl-hydroxypalmitate peut être un précurseur direct ou indirect de l'estérification du caféate et du diOH-C16 dans la cutine, sa synthèse est aussi indirectement nécessaire à l'incorporation des autres monomères aliphatiques dans le polymère. L'activité PpFHT semble donc se situer à une étape précoce de la synthèse ou de l'assemblage final de la cutine de *P. patens*.

Le mutant *fht* suggère un rôle séquentiel de l'assemblage des monomères phénoliques et aliphatiques

L'étude de la voie des phénylpropanoïdes chez les bryophytes et en particulier chez *P. patens* a montré le rôle crucial de la synthèse d'acides hydroxycinnamiques dans la synthèse de la cutine. La caractérisation de PpFHT a permis l'identification d'un lien métabolique important entre la voie des phénylpropanoïdes et la voie des acides gras hydroxylés. Plus précisément, cette connexion s'opère à priori sur les produits finaux des deux voies métaboliques. En effet, la voie des phénylpropanoïdes *stricto sensu* de *P. patens* semble s'arrêter au caféoyl-CoA (fig. 11), puisqu'aucun acide hydroxycinnamique en aval du caféoyl-CoA n'est détecté chez cette espèce, de manière soluble ou dans le polymère de cutine. De même, si des monomères en amont de la synthèse du diOH-C16 sont présents dans la cutine (le C16 et le ω OH-C16), la

cutine ne contient pas de monomère en aval de cette voie métabolique. L'étape enzymatique assurée par PpFHT semble donc être la première réaction qui relie les deux voies métaboliques dans la biosynthèse de la cutine. Le phénotype moléculaire et macroscopique du mutant *fht* suggère que cette étape se situe en amont de l'estérification d'une proportion majeure des monomères aliphatiques. L'activité biochimique de PpFHT et la diminution du caféate dans la cutine du mutant *fht* proposent que PpFHT soit directement responsable de l'estérification du caféate au polymère de cutine, via la synthèse du caféoyl-hydroxypalmitate. En revanche, la diminution drastique de la teneur en diOH-C16 dans la cutine du mutant est probablement une conséquence secondaire de l'absence d'activité FHT, car la valeur absolue de cette diminution est bien plus importante que la diminution de la teneur en caféate. Tel que discuté dans le chapitre suivant, le caféoyl-hydroxypalmitate pourrait être un substrat à la polymérisation du diOH-C16. D'autre part, nous proposons au vu de la nature chimique des différents monomères aliphatiques, que la diminution de la teneur en acides gras non hydroxylés et en triOH-C18 dans la cutine du mutant *fht* soit une conséquence de la diminution de la teneur en diOH-C16, et donc de la moindre disponibilité de fonctions hydroxyles libres pour la formation de liaisons ester. Ainsi, l'analyse fonctionnelle et métabolique du mutant *fht* nous amène à proposer un modèle séquentiel de l'assemblage des monomères du polymère de cutine chez *P. patens*. L'établissement de liaisons ester entre le caféate et le diOH-C16 via l'activité FHT initierait la formation du polymère. Dans un second temps, le diOH-C16 serait polymérisé. L'estérification des acides gras non hydroxylés et du triOH-C18 auraient lieu en parallèle ou après l'incorporation des acides gras hydroxylés, mais nécessite la présence des acides gras hydroxylés. Ce modèle général ne permet pas d'inférer précisément la structure macromoléculaire du polymère, ni de connaître par quel mécanisme le glycérol est estérifié, mais propose que l'intégration des monomères phénoliques précède celle des monomères aliphatiques lors de l'assemblage du polymère de cutine. Cette caractéristique a été observée à plusieurs reprises lors de la synthèse de la subérine chez les plantes vasculaires, qui contient davantage de monomères phénoliques que la cutine (Pollard *et al.*, 2008). En effet, au cours de la synthèse de subérine dans les tubercules de pomme de terre suite à une blessure, le domaine poly-aromatique se forme avant le domaine poly-aliphatique (Lulai et Corsini, 1998 ; Yang et Bernards, 2007). De manière similaire, lors de la synthèse de la subérine des téguments des graines de colza (*Brassica napus*), l'incorporation des monomères aliphatiques se poursuit après que la quantité totale de férulate ait été déposée (Molina *et al.*, 2007). Les structures macromoléculaires de la cutine et de la subérine sont encore en grande partie énigmatiques, d'autant plus lorsque leur composition est hétérogène (Fernández *et al.*, 2016 ; Graça, 2015).

La subérine des plantes vasculaires et la cutine des bryophytes sont riches en monomères phénoliques. L'analyse fine de leur composition au cours de leur biosynthèse ou dans des mutants KO suggère à travers plusieurs exemples que la polymérisation des monomères phénoliques précède et est nécessaire à la polymérisation des monomères aliphatiques. Cette caractéristique semble conservée et pourrait témoigner d'une origine commune des deux polymères.

La fonction conservée du clade FHT suggère une origine commune entre cutine et subérine

L'investigation de PpFHT a montré une origine commune du clade FHT, dont l'activité et la fonction sont conservées. Tout comme les BAHDs caractérisées du même clade chez les plantes vasculaires, PpFHT est une hydroxycinnamoyl-transférase responsable de l'incorporation d'acides hydroxycinnamiques dans un polymère apoplastique. Bien que l'activité et la fonction au sens large de la famille FHT soient conservées au sein des embryophytes, l'analyse détaillée des différents mutants révèle une importance contrastée de cette famille dans la synthèse des polymères concernés et dans la physiologie de la plante. Le mutant *Atdcf* d'*A. thaliana* a par exemple pour seul phénotype une diminution de la teneur en férulate dans la cutine, sans modification autre de la composition du polymère et sans conséquence physiologique observée (Rautengarten *et al.*, 2012). Chez la même espèce, la subérine du mutant *Atasft* présente une diminution stœchiométrique de la quantité en férulate et en acides gras hydroxylés. La subérine de ce mutant devient perméable et les plantes sont plus sensibles au stress salin (Molina *et al.*, 2009 ; Gou *et al.*, 2009). En comparaison au rôle de DCF dans la synthèse de la cutine, l'activité de ASFT a donc un rôle plus important dans la synthèse et les propriétés de la subérine. Chez *P. patens*, la composition de la cutine est affectée bien au-delà de la seule diminution du caféate. Le rôle de PpFHT est d'autant plus important dans la synthèse et les propriétés de la cutine, et dans le développement de la plante. Au vu de ces exemples, l'importance de l'activité des FHTs dans la synthèse de cutine ou de subérine semble être corrélée à la proportion d'unités phénoliques du polymère. Le clade FHT est apparu chez les embryophytes au cours de la terrestrialisation. L'émergence de ce clade a vraisemblablement joué un rôle dans l'adaptation des plantes sur terre, en contribuant à la voie de biosynthèse d'un polymère apoplastique aliphatique et phénolique. Au cours de l'évolution des embryophytes, de nouveaux polymères apoplastiques sont apparus, en parallèle de la complexification de l'anatomie des plantes. Des événements de duplication du gène FHT ont eu lieu, et plusieurs copies ont été maintenues dans les génomes de plantes vasculaires, telle *A.*

thaliana. (fig. 19). Ces différentes copies du clade FHT sont impliquées dans la biosynthèse de la cutine ou de la subérine, à travers leur activité commune HHT et/ou HFAT. Le fait que la surexpression de *PtFHT1* dans *A. thaliana* provoque une augmentation de la quantité en férulate dans la cutine et dans la subérine, suggère d'ailleurs que le profil d'expression des gènes *FHTs* conditionne leur rôle biologique, davantage que l'activité enzymatique des protéines (Cheng *et al.*, 2013). L'activité FHT semble ainsi être partagée dans la biosynthèse de la cutine et de la subérine. Ces deux voies de biosynthèse partagent par ailleurs de nombreuses étapes enzymatiques identiques ou similaires, catalysées par des enzymes de mêmes familles. La similarité des deux polymères en termes de biosynthèse et de composition a amené Philippe *et al.* (2020b) à proposer une origine commune des deux polymères. La conservation fonctionnelle du clade FHT chez les embryophytes appuie cette idée, et la caractérisation de la copie unique *PpFHT* chez *P. patens* illustre la fonction essentielle de cette activité dans la synthèse de l'unique polyester apoplastique des espèces bryophytes. Au cours de l'évolution des embryophytes, l'activité FHT a été maintenue dans la biosynthèse de la cutine et de la subérine, avec une importance relative selon la proportion en monomères phénoliques des polymères.

Conclusions et perspectives

La caractérisation fonctionnelle de *PpFHT* a mis en avant l'apparition et la conservation fonctionnelle de cette famille chez les embryophytes. L'histoire évolutive du clade FHT et la comparaison des différents mutants affectés dans cette voie montrent l'origine commune de cette étape enzymatique dans la biosynthèse de la cutine et de la subérine, et appuient l'idée d'une origine commune globale des deux polymères. Par leur activité HHT et/ou HFAT, les protéines FHTs connectent la voie des phénylpropanoïdes et des acides gras hydroxylés, et sont en partie responsables de l'intégration des acides hydroxycinnamiques dans les polyesters aliphatiques. Cette connexion métabolique est primordiale dans la synthèse du polymère cuticulaire de *P. patens*. L'analyse du mutant *Ppfmt* a confirmé l'importance cruciale et spécifique de la voie des phénylpropanoïdes dans la biosynthèse de la cutine, et a apporté de nouvelles informations sur la synthèse de ce polymère. Notamment, l'estérification des monomères phénoliques semble précéder et être nécessaire à l'incorporation successive des monomères aliphatiques. Le produit majeur de *PpFHT*, le caféoyl-hydroxypalmitate, est dans cette voie un précurseur central du polymère. Néanmoins, la structure macromoléculaire du polymère et la manière précise dont il est polymérisé restent encore largement inconnues. Au cours de ma thèse, j'ai donc souhaité rechercher et étudier les mécanismes de polymérisation et

d'assemblage de la cutine de *P. patens*, à partir du caféoyl-hydroxypalmitate ou d'autres précurseurs. Je pense que poursuivre l'étude de cette voie métabolique chez les bryophytes, en prenant en considération les connaissances accumulées chez les plantes vasculaires, permet d'apporter de nouvelles informations quant à la compréhension de l'apparition et de l'évolution des différents polymères apoplastiques hydrophobes des plantes.

Pour compléter ce travail sur le clade FHT et renforcer nos conclusions, plusieurs expérimentations complémentaires sont à considérer. Il serait pertinent de rechercher de manière plus exhaustive la présence de séquences homologues dans les génomes de plantes séquencés, au-delà des gènes caractérisés. Une analyse phylogénétique plus complète pourrait alors être réalisée, pour observer plus précisément l'évolution du clade FHT chez les embryophytes. Les génomes d'espèces bryophytes possédant une copie unique de FHT, l'étude fonctionnelle du gène pourrait être conduite chez *M. polymorpha* et/ou *A. agrestis* pour élargir l'étude de cette famille et savoir dans quelle mesure sa fonction est conservée au sein des plantes non-vasculaires. Enfin, pour confirmer la conservation fonctionnelle de FHT chez l'ensemble des embryophytes, des expériences de trans-complémentation peuvent être menées entre deux espèces phylogénétiquement représentatives des embryophytes. De manière similaire à l'expérience de trans-complémentation du mutant *Atcyp73a5* par *PpCYP73A48* et *PpCYP73A49*, il est possible d'exprimer PpFHT dans les mutants *dcf*, *asft* et *fact* d'*A. thaliana*, en aval d'un promoteur adapté, et d'observer si le phénotype moléculaire sauvage est restauré. Alternativement, le mutant *Ppfht* peut être trans-complémenté par recombinaison homologue, en remplaçant la séquence codante de PpFHT mutée par CRISPR/Cas9, par la séquence codante d'un gène *FHT* caractérisé (par exemple *AtDCF*, *AtASFT* ou *AtFACT*). La restauration du phénotype WT de *P. patens* signifierait là aussi une conservation fonctionnelle de l'activité et de la fonction du clade FHT chez les embryophytes.

Matériels et méthodes

Génération et caractérisation des lignées génétiquement modifiées

L'obtention des lignées KO *Ppfht*, leur caractérisation moléculaire et phénotypique ont été réalisées au cours de la thèse de Lucie Kriegshauser à l'IBMP (2015-2018). Les lignées KO ont été générées par transfection de protoplastes avec des constructions génétiques nécessaires à la mutation du gène cible par CRISPR/Cas9. La protéine recombinante PpFHT a été produite par Laurence Herrgott à la plateforme de production et purification de protéines de l'IBMP. L'analyse de la cuticule en microscopie électronique a été réalisée par Mathieu Erhardt à la

plateforme de microscopie de l'IBMP. L'analyse de la composition de la cutine a été réalisée par GC-FID par Dr. Bénédicte Bakan à l'INRAe de Nantes, par une adaptation du protocole décrit par Renault et al. (2017a).

Activités enzymatiques de PpFHT et identification des produits par UHPLC-MS/MS

L'activité enzymatique *in vitro* de la protéine recombinante PpFHT a été évaluée à partir des quatre couples de substrats présentés fig. 21. Les réactions ont été conduites dans un volume de 50 μ L contenant 50 mM de tampon phosphate de potassium (KPi ; pH 7,4), 1 mM de dithiothréitol (DTT), 200 μ M de substrat donneur (p-coumaroyl-CoA ou caféoyl-CoA) provenant de solutions stock à 5 mM dans l'eau, 5 mM de substrat accepteur (ω OH-C16 ou diOH-C16) provenant de solutions stock à 40 mM dans l'éthanol, et 1 μ g de protéine recombinante. Les réactions ont été initiées par l'ajout du substrat donneur, incubées 20 min à 40°C, et arrêtées par l'ajout de 50 μ L d'acétonitrile. Parallèlement, des réactions contrôles ont été réalisées avec des enzymes préalablement incubées 5 min à 98°C. Après 5 min de centrifugation à 15 000 g à 4°C, 80 μ L de surnageant ont été prélevés pour la détermination des transitions MRM par infusion directe, ou leur détection par UHPLC-MS/MS. Le substrat diOH-C16 a été purifié à partir de drèches industrielles de tomate par Dr. Bénédicte Bakan à l'INRAe de Nantes.

Les produits enzymatiques ont dans un premier temps été infusés à l'aide d'une pompe à seringue (Kd Scientific) réglée à 300 μ L/h, dans un spectromètre de masse en tandem EvoQ Elite LC-TQ (Bruker) équipé d'une source d'ionisation électrospray (HESI ; Bruker). L'azote était le gaz de désolvatation (20 L/h) et de nébulisation (10 L/h). Les températures d'interface et de sources étaient respectivement de 350°C et 300°C. La tension capillaire était de 4 kV en mode positif et 3,5 kV en mode négatif. L'identification des transitions MRM et l'optimisation des paramètres de fragmentation ont été réalisées par la méthode « MRM builder » du logiciel MS Workstation 8 (Bruker), à partir du *m/z* estimé des quatre produits enzymatiques théoriques présentés fig. 21, en mode positif et négatif. Les transitions MRM retenues ont été utilisées pour l'analyse des mêmes produits enzymatiques par UHPLC-MS/MS, selon la méthode chromatographique des molécules aliphatiques (cf. protocoles et méthodologies générales). Les produits enzymatiques de PpFHT identifiés *in vitro* ont été recherchés selon la même méthode UHPLC-MS/MS, dans des extraits métaboliques concentrés (cf. protocoles et méthodologies générales) obtenus à partir du même matériel que pour l'analyse de la cutine (cf. Kriegshauser, 2018).

Chapitre 2 :

Polymérisation de la cutine chez les bryophytes

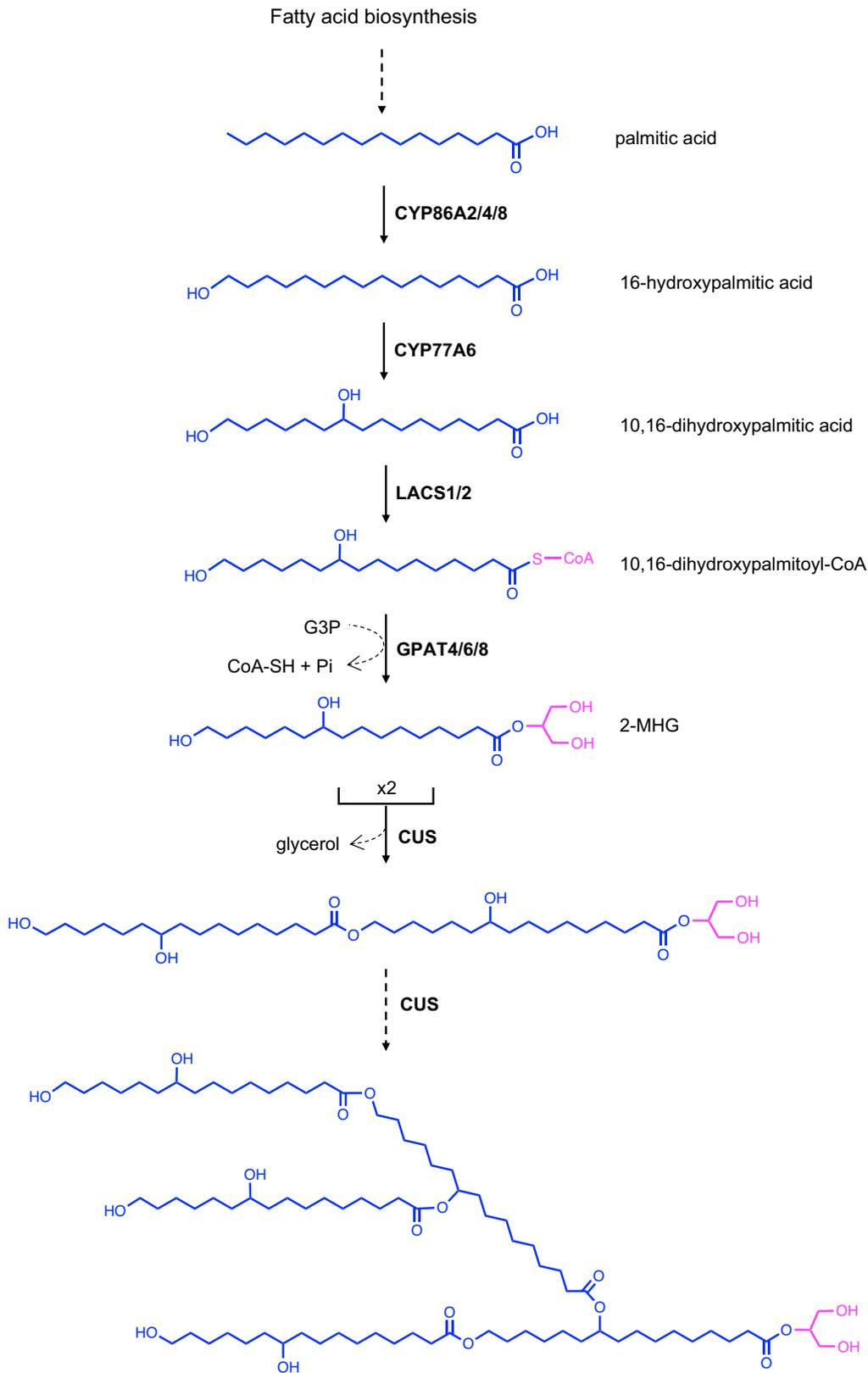


Figure 23 : Voie de biosynthèse de la cutine.

Les étapes enzymatiques représentées décrivent uniquement la voie de biosynthèse et de polymérisation de l'acide 10,16-dihydroxypalmitique, monomère majoritaire chez *P. patens*. Les enzymes indiquées ont été caractérisées chez *A. thaliana*. L'activité CUS a été caractérisée chez *S. lycopersicum*, *A. thaliana* et *P. patens*. Les protéines CUS catalysent *in vitro* la formation d'un polymère linéaire, mais l'analyse de mutants *cus* de tomate montre qu'un polymère réticulé est formé *in planta* (Philippe *et al.*, 2016). LACS : long-chain acyl-CoA synthetase ; GPAT : glycerol-3-phosphate-O-acyltransférase ; CUS : cutine synthase.

Biosynthèse de la cutine et polymérisation des polymères apoplastiques

Biosynthèse et polymérisation de la cutine

Biosynthèse des monomères aliphatiques

La voie de biosynthèse de la cutine a principalement été étudiée chez les plantes vasculaires, notamment chez *A. thaliana* et *S. lycopersicum*, en raison de leur intérêt scientifique et agronomique. La synthèse des monomères aliphatiques et phénoliques (discutée dans le chapitre précédent) est relativement bien connue. Bien que plusieurs mécanismes de transport et de polymérisation des précurseurs de cutine soient décrits ou suspectés, beaucoup d'éléments restent encore à découvrir.

Les monomères aliphatiques de la cutine sont des acides gras à longue chaîne (majoritairement C16 et C18), dont la biosynthèse a lieu dans les chloroplastes. Après exportation dans le cytosol, les acides gras sont hydroxylés par des CYP enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Plusieurs CYPs de la famille CYP86A catalysent l'hydroxylation en bout de chaîne : AtCYP86A2, AtCYP86A4 et AtCYP86A8 chez *A. thaliana* (Xiao *et al.*, 2004 ; Li-Beisson *et al.*, 2009 ; Wellesen *et al.*, 2001 ; fig. 23). AtCYP77A6 est l'unique CYP responsable de l'hydroxylation en milieu de chaîne des acides gras précurseurs de la cutine (fig. 23), notamment le diOH-C16 qui représente 80% de la cutine des fleurs, et dont l'absence ou la diminution provoquent la fusion des pièces florales et/ou la disparition des crêtes cuticulaires (Li-Beisson *et al.*, 2009). Les acides gras peuvent également subir une époxydation par d'autres CYP77s (AtCYP77A4, AtCYP77B1), ainsi qu'une époxygénation par une époxyde hydrolase (AtEH1), menant à la synthèse d'acides gras époxydés ou polyhydroxylés en milieu de chaîne (Sauveplane *et al.*, 2009 ; Pineau *et al.*, 2021 ; Pineau *et al.*, 2017). Enfin, les acides gras ω -hydroxylés peuvent être oxydés davantage, en partie par l'enzyme HOTREAD et former des α,ω -diFAs, majoritaires dans la cutine des feuilles d'*A. thaliana* (Kurdyukov *et al.*, 2006). Les acides non-, mono- ou poly-hydroxylés sont ensuite activés avec du coenzyme A par des LONG-CHAIN ACYL-CoA SYNTHETASES (LACS), dont AtLACS1 et AtLACS2 ont été caractérisées et ont des fonctions partiellement redondantes (Schnurr *et al.*, 2004 ; Lü *et al.*, 2009). Les acides gras activés sont ensuite estérifiés à une molécule de glycérol en position *sn*-2 par des GLYCEROL-3-PHOSPHATE O-ACYLTRANSFERASE (GPAT ; fig. 23). A l'inverse des GPATs impliquées dans la synthèse

des lipides membranaires ou de stockage, les GPATs impliquées dans la synthèse de cutine sont bifonctionnelles : elles possèdent une activité acyl-transférase qui catalyse l'estérification de l'acide gras au glycérol en position *sn*-2, et une activité phosphatase (Yang *et al.*, 2012). Les produits des GPATs sont ainsi des 2-monoacylglycérol (2-MAG), qui sont des précurseurs directs de la cutine (Yeats *et al.*, 2012). Les enzymes AtGPAT4, AtGPAT6 et AtGPAT8 ont été caractérisées chez *A. thaliana*, montrant que leurs fonctions sont partiellement redondantes en termes d'expression et de substrat (Yang *et al.*, 2010 et 2012 ; Li *et al.*, 2007 ; Li-Beisson *et al.*, 2009). Plusieurs données enzymatiques et génétiques convergent vers l'idée que l'hydroxylation des acides gras précède l'activité LACS et GPAT (Yang *et al.*, 2012 ; Li-Beisson *et al.*, 2009), bien que l'ordre exact des différentes réactions menant à la synthèse de 2-MAG reste sujet à discussion (Molina et Kosma, 2015).

Transport des précurseurs

La cutine étant déposée dans l'apoplaste au-delà de la paroi secondaire, l'assemblage apoplastique du polymère nécessite le transport en amont de ses précurseurs à travers la membrane plasmique et la paroi. Plusieurs mécanismes de transport sont décrits ou suspectés. Des transporteurs transmembranaires de type ABC (pour « ATP-Binding Cassette ») de la famille G (ABCG) ont notamment été caractérisés pour leur rôle dans le transport des précurseurs de cutine et/ou des cires cuticulaires. Les transporteurs AtABCG11, AtABCG13 et AtABCG32 ont été identifiés chez *A. thaliana* grâce à des mutants KO, sans que leurs propriétés biochimiques n'aient pu être décrites (Panikashvii *et al.*, 2010 et 2011 ; Bessire *et al.*, 2011). Récemment, les propriétés des transporteurs AtABCG11 et AtABCG32, ainsi que du transporteur SlABCG42 de tomate, ont pu être démontrées *in vivo*. Ces transporteurs sont capables d'exporter le ω OH-C16, le C16 α,ω -diFA, ainsi que le diOH-C16-2-glycerol (2-MHG), un précurseur des cutine synthases (cf. paragraphe suivant), à l'exception de AtABCG11 qui n'exporte pas le C16 α,ω -diFA (Elejalde-Palmett *et al.*, 2021). La diversité des monomères et précurseurs transportés suggèrent une pluralité des mécanismes de polymérisation apoplastique.

Le transport des monomères dans la paroi pourrait être facilité par des « Lipid Transfer Proteins » (LTPs), qui possèdent une poche hydrophobe pouvant lier des acides gras (Salminen *et al.*, 2018). Le profil d'expression de protéines LTPs exprimées spécifiquement dans l'épiderme, et co-exprimées avec des gènes de biosynthèse de cutine, suggère fortement le rôle de cette famille dans le transport des monomères de cutine, sans que cette hypothèse n'ait pu être démontrée expérimentalement (Salminen *et al.*, 2018 ; Xin et Herburger, 2021 ; Yeats et

Rose, 2008). D'autres auteurs proposent sur la base d'expériences *in vitro* que les monomères de cutine peuvent migrer à travers la paroi via une séparation de phase, en fonction de l'hétérogénéité de composition et d'hydrophobicité de la paroi (MacDougall *et al.*, 1997 ; Gabarayeva *et al.*, 2020).

Polymérisation de la cutine

Les cutine synthases

Un seul mécanisme enzymatique a été démontré à ce jour permettant la polymérisation de la cutine. Il implique des protéines « cutine synthase » (CUS), appartenant à la famille des GDSLs (Yeats *et al.*, 2012). Il s'agit d'une famille multigénique, dont le nombre de gènes excède souvent 100 chez les espèces angiospermes (Ding *et al.*, 2019). Les GDSLs sont généralement qualifiées en tant que lipase/estérase, et leur activité est souvent liée au métabolisme lipidique (Akoh *et al.*, 2004). Les GDSLs ont toutefois des propriétés et des fonctions très diverses, et peuvent aussi être impliquées dans des processus variés tels que la dégradation des polysaccharides (Mølgaard *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2017), la résistance aux agents pathogènes via des voies de signalisation hormonales (Kim *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2009), ou via la dégradation de phytoanticipines (Zhang *et al.*, 2006). La localisation subcellulaire et les substrats métabolisés par ces protéines sont également très variés. L'activité estérase des GDSLs est conférée par le site actif GxSx(G) situé dans la séquence conservée caractéristique GDS(L)G, proche de l'extrémité N-ter (Lai *et al.*, 2017). En plus de l'activité estérase, certaines GDSLs ont aussi une activité acyl-transférase, et forment une nouvelle liaison ester après le clivage du substrat donneur. C'est par exemple le cas de l'enzyme TcGLIP caractérisée chez *Tanacetum cinerariifolium* qui a une activité CHRYSANTHEMOYL-CoA: PYRETHROLONE O-CHRYSANTHEMOYL TRANSFERASE dans la voie de biosynthèse des pyréthrinoïdes (Kikuta *et al.*, 2012). Chez la tomate, l'enzyme SICGT forme du caféoyl-glucarate en clivant une molécule d'acide chlorogénique (ou acide 5-O-caféoyl-quinique), pour ensuite estérifier l'acide quinique et l'acide glutarique (Teutschbein *et al.*, 2010). L'acide chlorogénique est également le substrat donneur, mais aussi accepteur de l'enzyme IbICS caractérisée chez *Ipomoea batatas*, qui catalyse la synthèse de 3,5-dicaféoyl-quinique à partir de deux molécules d'acide 5-O-caféoyl-quinique (Miguel *et al.*, 2020).

Les enzymes CUS ont aussi une activité acyl-transférase, dans un premier temps à partir d'un donneur et d'un accepteur identiques. L'activité biochimique décrite des enzymes CUSs caractérisées utilise comme substrat le 2-mono(10,16-dihydroxyhexadecanoyl)glycerol, ou 2-MHG. L'activité estérase clive la liaison ester entre le diOH-C16 et le glycérol, puis l'activité

acyl-transférase forme une nouvelle liaison ester entre la fonction acide carboxylique du diOH-C16 et une fonction hydroxyle d'une autre molécule de 2-MHG. La même réaction se poursuit avec toujours le 2-MHG comme donneur et le polymère grandissant comme accepteur, libérant une molécule de glycérol à chaque étape. Après plusieurs réactions, un polymère est formé, contenant une seule unité glycérol en bout de chaîne (fig. 23 ; Yeats *et al.*, 2012). La première enzyme CUS a été identifiée et caractérisée chez la tomate, grâce au mutant *cd1* (pour « cutin déficient ») dont les fruits sont plus sensibles à la perte passive d'eau et à l'infection par des agents pathogènes. Ce phénotype est relié à un défaut de cuticule, qui contient 90 à 95% de cutine en moins par rapport aux fruits de plantes WT. La localisation apoplastique dans la cuticule de la protéine CD1 a par ailleurs été démontrée. (Yeats *et al.*, 2012 ; Girard *et al.*, 2012). La caractérisation par RMN des produits enzymatiques de SICD1 (ou SICUS1) montre que l'enzyme forme *in vitro* un polymère linéaire, dont les liaisons ester impliquent uniquement les fonctions hydroxyles en bout de chaîne (Yeats *et al.*, 2012) ; mais l'analyse de la structure de la cutine de fruits WT ou *cd1* montre que l'enzyme crée des liaisons ester avec les fonctions hydroxyles en bout et en milieu de chaîne, et forme donc *in planta* un polymère ramifié (Philippe *et al.*, 2016). Au sein de la famille des GDSLs, la sous-famille CUS est multigénique et est spécifique des embryophytes. Il existe par exemple quatre et cinq gènes *CUS* chez *A. thaliana* et *L. lycopersicum*, respectivement (Yeats *et al.*, 2014). Chez *A. thaliana*, seul les gènes *AtCUS1* et *AtCUS2* ont été étudiés. La surexpression de *AtCUS1* (ou *AtLTL1*) confère une meilleure tolérance des plantes au stress salin (Naranjo *et al.*, 2006). L'analyse du mutant *cus2* a révélé le rôle de *CUS2* dans le maintien des crêtes cuticulaires de la cuticule des sépales (Hong *et al.*, 2017). Chez la tomate, l'analyse d'autres mutants simples *cus* montre un rôle similaire des différentes copies *CUSs* : les mutants *cd1*, *cd2* et *cd3* ont des phénotypes proches quant à la diminution de la quantité de cutine, la perte passive en eau et la sensibilité aux agents pathogènes. Toutefois, la structure et la composition de la cutine de ces mutants présentent des différences, ce qui suggère un rôle à la fois redondant et aussi spécialisé des différentes protéines *CUSs*, phénomène probablement sous-tendu par des différences de préférence de substrat (Isaacson *et al.*, 2009). Les teneurs en acides gras mono- et poly-hydroxylés, ainsi qu'en α,ω -diFAs (C16 et C18), sont notamment affectées dans la cutine de ces mutants, alors que la quantité d'acides gras non hydroxylés est peu affectée. Ces données suggèrent, en accord avec le mécanisme enzymatique décrit, que l'activité CUS est responsable de la polymérisation

des acides gras hydroxylés et des α,ω -diFAs¹. L'activité enzymatique CUS à partir du 2-MHG a d'ailleurs aussi été démontrée chez *A. thaliana* et *P. patens*, par les protéines AtCUS1 et PpCUS1, respectivement (Yeats *et al.*, 2014). Cette activité a uniquement pu être démontrée à partir du 2-MHG canonique contenant du diOH-C16, mais il est proposé que les enzymes CUSs catalysent le même type de réactions à partir d'autres substrats de type 2-mono-hydroxyacylglycérol, contenant les autres monomères hydroxylés (Isaacson *et al.*, 2009 ; Philippe *et al.*, 2016).

Le mécanisme de polymérisation de la cutine par les enzymes CUSs a un rôle majeur dans l'assemblage extracellulaire des monomères de cutine. Toutefois, nous disposons d'un nombre limité de mutants simples affectés dans la voie CUS. La fonction des différentes copies CUSs d'une espèce semblant en partie redondante, en l'absence de mutants multiples affectés dans l'ensemble de la voie, il est impossible de connaître dans quelle mesure l'activité CUS participe exactement à la synthèse de la cutine. En particulier, si l'assemblage des monomères phénoliques a déjà été discuté, l'estérification des acides gras non hydroxylés s'opère vraisemblablement par d'autres mécanismes encore inconnus.

De manière intéressante, la cutine peut être dégradée de manière endogène par des cutinases qui appartiennent également à la famille des GDSLs. La surexpression constitutive d'AtCDEF1 (pour « cuticle destructing factor 1 ») dans *A. thaliana* provoque un fort phénotype de fusion d'organes et de perméabilité des feuilles (Takahashi *et al.*, 2010), un phénotype aussi observé par la surexpression d'une cutinase fongique (Sieber *et al.*, 2000). Une autre cutinase potentielle, AtEXL4, est nécessaire à l'hydratation des grains de pollen, probablement via la dégradation de la cuticule du stigmate (Updegraff *et al.*, 2009). A l'inverse des CUSs, ces GDSLs cutinases ne possèdent pas d'activité acyl-transférase (Yeats *et al.*, 2014).

Autres mécanismes de polymérisation de la cutine

Plusieurs mutants ont été identifiés et caractérisés chez *A. thaliana* pour leur défaut de cuticule qui semble être lié à l'assemblage du polymère plus qu'à la synthèse de ses précurseurs. Le mutant *bodyguard* (ou *bdg*) a un défaut de cuticule caractéristique (fusion d'organe, perméabilité des feuilles), alors que la cuticule du mutant contient davantage de cires et de cutine, avec une composition relative en monomères proche du WT. La structure de la cuticule est par ailleurs désorganisée, et ne contient pas de « cuticule proper » (Kurdyukov *et al.*, 2006). La protéine BDG est une α/β -hydrolase, localisée dans la paroi des cellules épidermiques. Cette

¹ Contrairement aux acides gras mono- ou poly-hydroxylés, les α,ω -diFAs seuls ne permettent pas de former un polyester. Seule leur association avec les acides gras poly-hydroxylés qui fournissent un excès de fonctions hydroxyles permettent l'établissement des liaisons esters.

famille regroupe des protéines aux fonctions variées : estérase, époxyde hydrolase, acyl-transférase etc. Il semble donc que la protéine BDG soit impliquée dans la polymérisation extracellulaire des monomères de cutine, qui s'accumulent dans la paroi du mutant *bdg*. Il est proposé que l'activité BDG catalyse directement la polymérisation des monomères par une activité acyl-transférase, ou soit responsable du clivage d'esters précurseurs de cutine après leur transport dans la paroi, fournissant les acides gras au site de polymérisation de la cutine (Jakobson *et al.*, 2016).

Une autre protéine localisée dans la paroi des cellules épidermiques, et dont l'activité exacte reste énigmatique, est connue pour son rôle potentiel dans la polymérisation de la cutine. L'enzyme DCR a été identifiée grâce au mutant *dcr* (pour « deficient in cuticular ridges ») d'*A. thaliana*. Le mutant *dcr* présente un phénotype de fusion d'organes au niveau des pièces florales et des feuilles, une absence des crêtes cuticulaires caractéristiques des sépales et des pétales, et une perte passive en eau accrue. Ces caractéristiques sont reliées à une altération de la composition de la cutine, dont la teneur en diOH-C16 est nulle dans la cutine des feuilles, et est fortement diminuée dans la cutine des fleurs et des téguments, alors que la teneur des autres monomères n'est pas affectée ou légèrement supérieure dans la cutine du mutant. AtDCR est ainsi suspectée d'être responsable de l'intégration spécifique du diOH-C16 dans la cutine, à travers un mécanisme encore inconnu. L'enzyme appartient à la famille des BAHDs, mais aucune activité n'a été détectée avec une gamme d'hydroxycinnamoyl-CoA donneurs, et d'acides gras accepteurs (Panikashvili *et al.*, 2009). Rani *et al.* (2010) ont montré que AtDCR a une activité DIACYLGLYCEROL ACYL-TRANSFERASE (DGAT), formant des triacylglycérols (TAGs). Les auteurs proposent que des TAGs contenant des acides gras caractéristiques de la cutine pourraient être synthétisés par DCR, transportés à travers la paroi, et clivés pour libérer les monomères de cutine, possiblement par BDG. D'autres réactions sont proposées par Molina et Kosma (2015), où le diOH-C16-CoA serait le précurseur direct du diOH-C16 incorporé à la cutine.

Une polymérisation non-enzymatique des monomères aliphatiques de cutine est aussi proposée d'après plusieurs expériences biochimiques et observations microscopiques. Les acides gras poly-hydroxylés peuvent s'auto-assembler en nanoparticules appelées « cutinsomes » dans l'eau, où ils peuvent polymériser spontanément et former des films lipidiques (Heredia-Guerrero *et al.*, 2009 ; Domínguez *et al.*, 2010). Les cutinsomes peuvent fusionner entre eux et former des vésicules lipidiques exportées vers la paroi, où la libération des acides gras estérifiés forme une « procuticule » (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008). Les cutinsomes ont pu être détectés *in vivo* grâce à des anticorps, et leur localisation spatio-

temporelle suggère leur rôle précoce dans la polymérisation de la cutine, en amont de l'activité CD1 dans la déposition de la cuticule du fruit de tomate (Segado *et al.*, 2020).

Polymérisation des autres polymères apoplastiques

Polymérisation de la subérine

Aucun mécanisme de polymérisation de la subérine n'a encore été démontré expérimentalement. Cependant, la composition et la voie de biosynthèse en partie similaires de la subérine et de la cutine suggèrent des mécanismes de polymérisation similaires également (Philippe *et al.*, 2020b). Cette idée a récemment été renforcée par la découverte de cinq GDSLs exprimées dans l'endoderme racinaire d'*A. thaliana*. Le mutant KO quintuple affecté dans ce cluster ne synthétise plus de subérine dans les racines, démontrant le rôle et la redondance fonctionnelle de ces cinq GDSLs dans la synthèse de subérine. Ces GDSLs sont ainsi des candidates pour être des « subérine synthases » qui auraient une activité de type CUS, probablement à partir de substrats de type 2-MAG, dont la partie aliphatique serait représentative de la composition de la subérine (Ursache *et al.*, 2021). Un tel mécanisme semble cohérent avec la structure et la composition du domaine poly-aliphatique de la subérine. Par ailleurs, plusieurs études proposent que la polymérisation du domaine poly-aromatique soit effectuée par des peroxydases de classe III, des enzymes davantage connues et étudiées dans le contexte de la polymérisation de la lignine (Bernards *et al.*, 1999 et 2004 ; Bernards et Razem, 2001).

Polymérisation de la lignine

La lignine est polymérisée par des enzymes de type laccase et/ou peroxydase, des protéines extracellulaires qui utilisent respectivement le dioxygène (O₂) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme co-substrat pour catalyser le couplage radicalaire des monolignols (Vanholme *et al.*, 2010). L'oxydation des monolignols par ces enzymes forme des radicaux libres très réactifs, qui s'assemblent spontanément entre eux et forment un polymère hétérogène grandissant (Shigeto *et al.*, 2014). Les laccases sont des protéines très glycosylées qui utilisent l'O₂ et le cuivre comme cofacteurs, et sont très répandues chez les plantes et les champignons. Chez les plantes, les laccases participent à de multiples réactions d'oxydations de composés phénoliques, et sont impliquées dans divers processus tels que l'élongation cellulaire, la polymérisation des tannins, et la résistance à des stress biotiques ou abiotiques (Mayer, 2002). Les peroxydases de classe III, à l'inverse des peroxydases de classe I et II, constituent une

famille spécifique des plantes. Plus précisément, cette famille est présente de manière ubiquitaire chez les espèces embryophytes et dans quelques espèces charophytes, mais absente chez les espèces chlorophytes (Passardi *et al.*, 2004). Il s'agit de protéines extracellulaires qui possèdent un groupement prosthétique protoporphyrine IX et un atome de fer III, nécessaires aux deux types d'activités enzymatiques de ces enzymes. À travers le cycle hydroxylytique et le cycle peroxydatif, les peroxydases de classe III catalysent respectivement *i*) la métabolisation de l' H_2O_2 en d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou *ii*) l'oxydation d'un substrat en radical libre, accompagné de la réduction de l' H_2O_2 en eau (Shigeto et Tsutsumi, 2015 ; Passardi *et al.*, 2005). Par ces différents types de réactions, les peroxydases sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, souvent associés à la dégradation ou au renforcement de la paroi (Passardi *et al.*, 2004 ; Cosio et Dunand, 2009). La production de ROS par les peroxydases provoque par exemple le clivage non-enzymatique des polysaccharides pariétaux, nécessaire à l'élongation cellulaire (Schweikert *et al.*, 2000 ; Passardi *et al.*, 2004). À l'inverse, l'oxydation radicalaire des extensines provoque leur polymérisation et le renforcement de la paroi (Marzol *et al.*, 2020 ; Jacobowitz *et al.*, 2019 ; Francoz *et al.*, 2019). Les peroxydases catalysent également le couplage radicalaire de composés phénoliques avec d'autres éléments pariétaux, tels que les monolignols, les acides gras et les polysaccharides. Ainsi, ces réactions permettent d'associer la lignine ou la cutine avec les polysaccharides (Ralph *et al.*, 2004 ; Ralph, 2010).

Chez les plantes vasculaires, la polymérisation de la lignine dans les tissus conducteurs s'effectue principalement par les laccases, bien que leur rôle soit non redondant avec les peroxydases (Zhao *et al.*, 2013). Les peroxydases sont situées dans la lamelle moyenne des fibres interfasciculaires alors que les laccases sont localisées dans la paroi secondaire des fibres et des éléments de vaisseaux (Yi Chou *et al.*, 2018). Leurs fonctions semblent donc séparées spatialement. Plusieurs laccases et peroxydases ont été identifiées et caractérisées pour leur rôle dans la lignification, notamment chez *A. thaliana* (Berthet *et al.*, 2011 ; Shigeto *et al.*, 2015 ; Herrero *et al.*, 2013 ; Fernández-Pérez *et al.*, 2015a et 2015b). Si la lignification des tissus vasculaires implique les deux types d'enzymes, la lignification du cadre de Caspary est réalisée uniquement par des peroxydases (Rojas-Murcia *et al.*, 2020).

Les peroxydases ont une faible spécificité de substrat. La spécificité de leurs activités semble donc davantage régulée par leur localisation précise dans la paroi et par la production localisée de ROS. Des motifs précis de méthyl-estérification des pectines permettent par exemple l'ancrage précis de peroxydases dans la paroi (Francoz *et al.*, 2019). L'interaction des peroxydases avec des protéines dirigeantes, tout comme la production finement régulée de la

production apoplastique de l'H₂O₂, permettent aussi la lignification très localisée du cadre de Caspary (Lee *et al.*, 2013 ; Fujita *et al.*, 2020).

Polymérisation de la sporopollénine

De même que la composition exacte de la sporopollénine n'est que partiellement connue (Li *et al.*, 2019), les mécanismes de polymérisation et d'assemblage de ce polymère sont encore largement inconnus, ou au mieux suspectés (Quillichini *et al.*, 2015). Plusieurs glycosyl-transférases ont possiblement un rôle dans la polymérisation de la sporopollénine d'après les phénotypes de mutants T-DNA chez *A. thaliana*, sans que leur activité biochimique n'ait été identifiée (Dobrista *et al.*, 2011). Plus récemment, plusieurs mutants KO ont été générés chez *P. patens* et caractérisés pour leurs défauts des propriétés de la sporopollénine des spores. Ces mutants sont affectés dans plusieurs GDSLs ou peroxydases de classe III, ce qui suggère le rôle de ces familles et de leurs mécanismes enzymatiques connus dans la polymérisation de la sporopollénine également (Rabbi *et al.*, 2020a et 2020b).

Étude de la famille CUS chez *P. patens*

Introduction

Les bryophytes synthétisent et possèdent deux types de polymères apoplastiques, la cutine et la sporopollénine, dont l'émergence chez les embryophytes a contribué à l'adaptation des plantes aux milieux terrestres. En comparaison à la sporopollénine, la voie de biosynthèse de la cutine est bien décrite, bien que de nombreuses questions restent ouvertes quant aux processus de polymérisation. Au cours de ma thèse et en m'appuyant sur les travaux réalisés auparavant au laboratoire, j'ai pu poursuivre l'investigation de la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, sous le prisme de la voie des phénylpropanoïdes. En comparaison aux plantes vasculaires, ce métabolisme est particulièrement important dans la synthèse et la composition de la cutine des bryophytes. Ces découvertes posent la question de savoir dans quelle mesure la voie de biosynthèse de la cutine est conservée au sein des plantes terrestres, comment elle a évolué, et comment les voies de biosynthèse des différents polymères apoplastiques sont apparues au cours de l'évolution des embryophytes. Si des éléments de réponse ont été apportés par l'étude de la synthèse des précurseurs de cutine, les mécanismes de polymérisation de la cutine restent à élucider chez les bryophytes. Dans une seconde partie de ma thèse, j'ai donc souhaité investir ce champ de recherche. Chez les plantes vasculaires, l'unique mécanisme de polymérisation de la cutine décrit à ce jour est celui impliquant les cutine synthases. Une étude phylogénétique et biochimique de la famille CUS a déjà montré que cette famille est spécifique des plantes terrestres, et que l'activité enzymatique est conservée *in vitro* entre des protéines CUS de bryophyte (*P. patens*) et d'angiospermes (*S. lycopersicum* et *A. thaliana* ; Yeats *et al.*, 2014). Le travail réalisé jusqu'à présent sur la biosynthèse de la cutine des bryophytes a principalement porté sur la mousse *P. patens*, pour qui nous disposons de davantage de connaissances, notamment sur la nature des précurseurs du polymère. J'ai donc dans un premier temps focalisé mes travaux sur cette espèce, qui possède deux copies CUSs, *PpCUS1* et *PpCUS2*. L'activité CUS de *PpCUS1* a été démontrée (Yeats *et al.*, 2014), et un mutant KO simple *cus1* a été généré, sans qu'aucun phénotype n'ait été identifié (Rici, 2013). J'ai approfondi l'étude fonctionnelle de la famille CUS chez *P. patens*, notamment par la génération et la caractérisation de mutants simple et double KO *cus*.

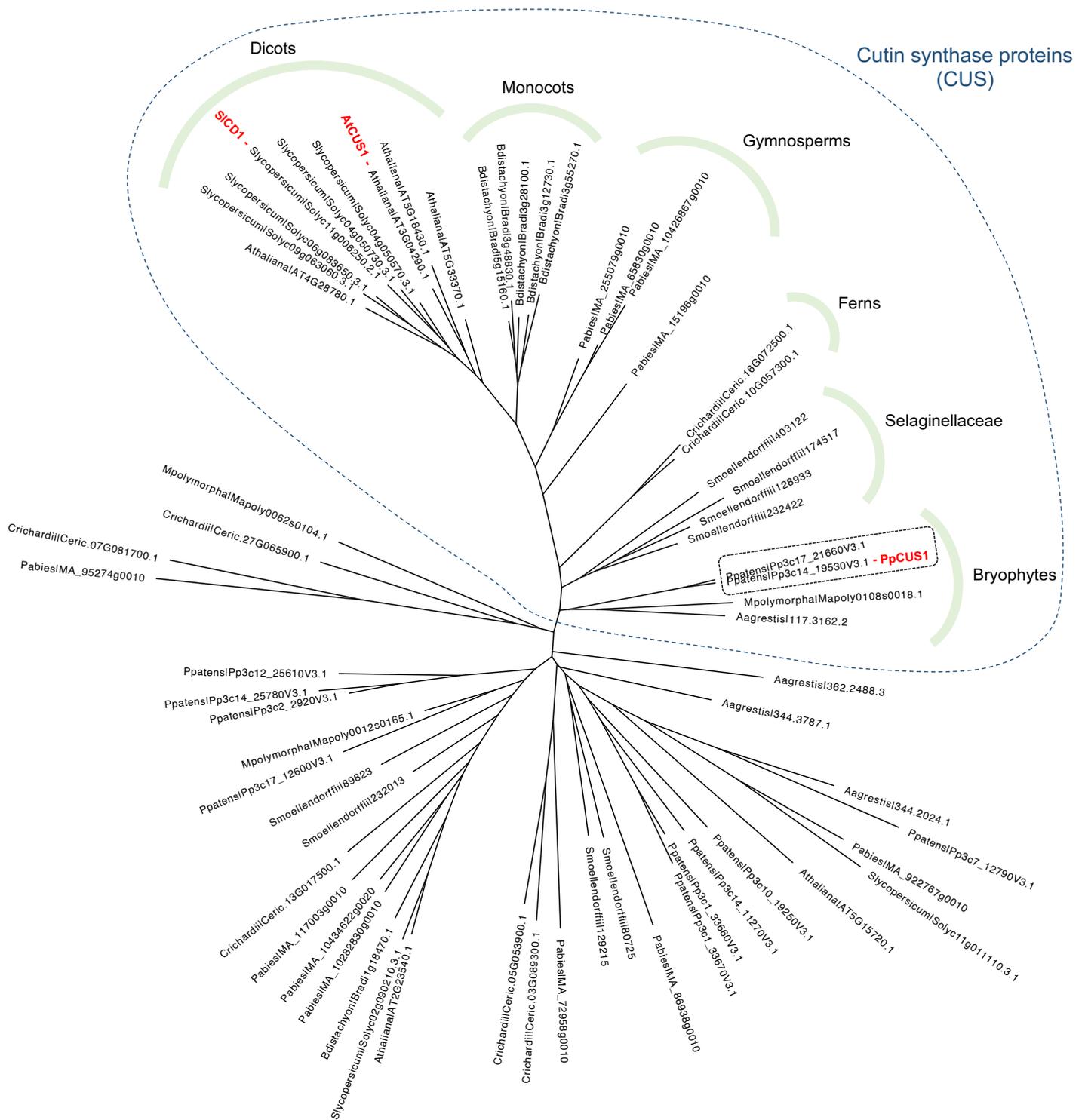


Figure 24 : Histoire évolutive de la famille CUS.

Arbre phylogénétique non enraciné décrivant les relations phylogénétiques d'un sous-groupe de protéines de la famille GDSL incluant les protéines CUS. La phylogénie a été reconstruite à partir d'un alignement de séquences nucléotidiques de GDSLs homologues à SICD1 (BLASTp E-value < E-70) recherchées dans les génomes d'espèces représentatives des embryophytes : *P. Patens*, *M. polymorpha*, *A. agrestis*, *S. moellendorffii*, *C. richardii*, *P. abies*, *B. distachyon*, *A. thaliana* et *S. lycopersicum*. La recherche d'homologues de SICD1 dans les génomes des espèces charophytes *Penium margaritaceum*, *Mesotaenium endlicherianum*, *Chara braunii* et *Klebsormidium nitens* s'est révélée infructueuse selon la même procédure. Les trois protéines CUS caractérisées (SICD1, AtCUS1 et PpCUS1, indiquées en rouge) sont regroupées dans une sous-famille unique spécifique des embryophytes. La famille CUS serait donc apparue chez un ancêtre commun des embryophytes, et est conservée chez les plantes terrestres.

Résultats

PpCUS1 et PpCUS2 sont deux membres d'une famille unique de GDSLs

Une analyse phylogénétique a été conduite pour retracer l'histoire évolutive de la famille CUS et identifier les différents gènes *CUSs* chez *P. patens*. Des séquences homologues à SICD1 ont été recherchées par BLASTp dans les génomes d'espèces représentatives de chlorophytes, charophytes, bryophytes et trachéophytes. Aucune séquence homologue n'a été identifiée chez les espèces charophytes, indiquant une origine de la famille CUS dans l'ancêtre des embryophytes. Un arbre phylogénétique a ensuite été réalisé à partir des séquences GDSLs obtenues (fig. 24). Les trois protéines CUSs caractérisées à ce jour se situent dans un groupe unique, qui contient une ou plusieurs séquences pour chaque espèce analysée, toutes positionnées selon la systématique des embryophytes. Ce groupe CUS est ainsi monophylétique et a une origine chez un ancêtre commun des embryophytes. La famille CUS est souvent multigénique, notamment chez les espèces trachéophytes (trois à cinq copies), et dans une moindre mesure chez les espèces bryophytes (une à deux copies). La mousse *P. patens* possède deux copies *CUSs*, *PpCUS1* et *PpCUS2*, sélectionnées pour l'étude fonctionnelle de la famille CUS chez les bryophytes (fig. 24).

PpCUS1 et PpCUS2 ont les caractéristiques de protéines CUS

L'analyse fonctionnelle des gènes *PpCUS1* et *PpCUS2* a été initiée par l'étude de leurs profils d'expression à l'aide des données transcriptomiques RNA-Seq disponibles dans la base de données CoNekT (Proost et Mutwil, 2018). Ainsi, les deux gènes sont majoritairement exprimés dans les gamétophores, les archégonies et les sporophytes, des organes qui tous possèdent une cuticule. L'expression dans les anthéridies, le protonema et le chloronema est quasi-nulle. L'isoforme *PpCUS1* est majoritairement exprimée dans les gamétophores et les archégonies, tandis que *PpCUS2* est plus exprimée dans les sporophytes (fig. 25A). La localisation subcellulaire des protéines a ensuite été prédite par l'algorithme DeepLoc (Almagro Armenteros *et al.*, 2017), en comparaison avec la séquence protéique de SICD1. La protéine SICD1, dont la localisation apoplastique a été démontrée expérimentalement (Yeats *et al.*, 2012 ; Girard *et al.*, 2012), est également prédite extracellulaire par l'algorithme (fig. 25B). La localisation de *PpCUS1* est prédite extracellulaire ou vacuolaire avec des probabilités similaires (0,46 et 0,48 respectivement), et la protéine *PpCUS2* est prédite extracellulaire avec une probabilité de 0,75 (fig. 25B). La polymérisation de la cutine par des protéines CUSs ayant lieu dans l'apoplaste, la localisation extracellulaire suggérée d'après les séquences protéiques de

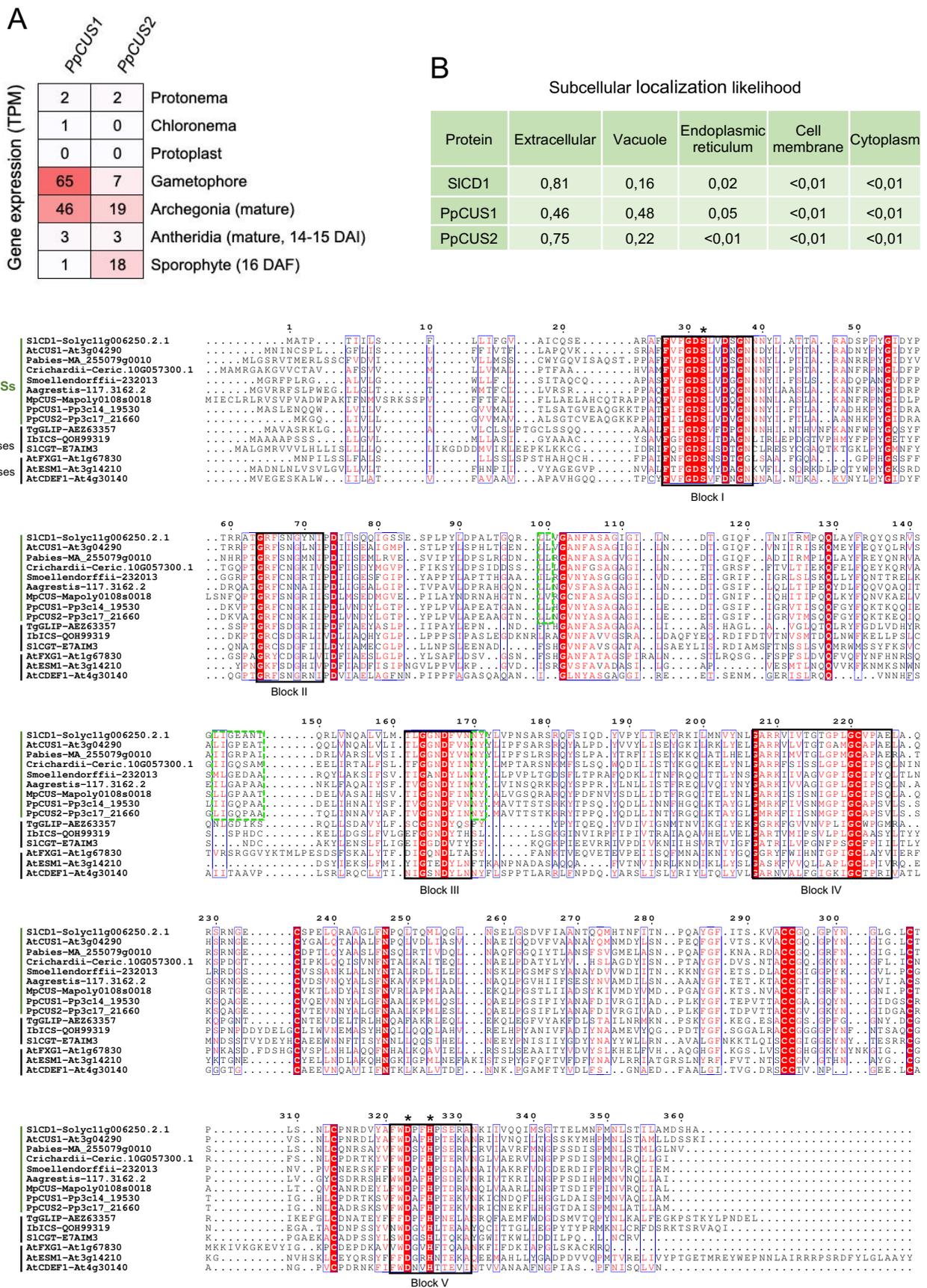


Figure 25 : Profil d'expression et caractéristiques de PpCUS1 et PpCUS2.

A : Heatmap du niveau de transcription des gènes *PpCUS1* et *PpCUS2* dans différents organes de *P. patens*, exprimés en transcrits par million (TPM). Les données sont issues de la base de données RNA-seq CoNekT (Proost et Mutwill, 2018). **B** : Prédiction de la localisation subcellulaire de SICD1, PpCUS1 et PpCUS2 par l'algorithme DeepLoc (Almagro Armenteros *et al.*, 2017). Le tableau indique les probabilités obtenues, qui peuvent s'échelonner de 0 à 1 (1 étant la probabilité maximale). **C** : Alignement des séquences PpCUS1 et PpCUS2 avec d'autres GDSLs caractérisées pour leur activité CUS, acyl-transférase ou estérase. Les résidus indiqués en blanc sur fond rouge sont strictement conservés. Les résidus indiqués en rouge ont un score de similarité supérieur à 0,7. Les motifs délimités par un trait fin bleu sont caractéristiques des protéines alignées. Les cinq blocs conservés caractéristiques des GDSLs sont encadrés en noir, d'après Ding *et al.* (2019). Les motifs et résidus caractéristiques des protéines CUSs sont encadrés en vert. Les résidus catalytiques sont indiqués par un astérisque.

PpCUS1 et PpCUS2, est compatible avec l'hypothèse de leur activité CUS. Les séquences protéiques de PpCUS1 et PpCUS2 ont ensuite été alignées avec d'autres GDSLs provenant des différents clades embryophytes, afin de comparer et étudier leurs séquences. Les protéines utilisées pour l'alignement comportent des CUSs caractérisées ou identifiées dans l'arbre phylogénétique présenté fig. 24, des GDSLs ayant aussi une activité acyl-transférase, et des GDSLs ayant une activité estérase uniquement. Toutes les séquences analysées contiennent les cinq blocs caractéristiques des GDSLs, ainsi que les trois résidus catalytiques conservés (fig. 25C ; Ding *et al.*, 2019). Les CUS et les GDSLs acyl-transférases ne partagent pas de motifs similaires évidents. En revanche, l'ensemble des CUSs, dont PpCUS1 et PpCUS2, partagent des motifs et des résidus caractéristiques, conservés entre les espèces représentatives des embryophytes (fig. 25C). Ces données montrent une certaine conservation des séquences protéiques de la famille CUS au sein des GDSLs, qui suggère une activité également conservée.

PpCUS1 et PpCUS2 ont un rôle redondant dans la synthèse de cutine

Des mutants simple ou double KO *cus* ont été générés par CRISPR/Cas9 pour étudier la fonction de la famille CUS chez *P. patens*. Quatre lignées génétiquement indépendantes ont été obtenues et caractérisées pour chaque génotype. Le phénotype macroscopique des mutants a d'abord été observé au niveau du développement des plantes. Les colonies entières et les gamétophores individuels des deux mutants simple KO *cus1* et *cus2* ne présentent aucun phénotype particulier en comparaison aux plantes WT (fig. 26A). En revanche, la croissance et le développement du mutant double KO *cus1/cus2* sont affectés. Quatre semaines après repiquage d'un gamétophore unique, les nouveaux gamétophores formés sont plus petits que les gamétophores WT, témoignant d'un retard de croissance. Après huit semaines, le développement des gamétophores est nettement altéré, notamment au niveau des phyllides qui sont plus petites et déformées à l'apex des gamétophores (fig. 26A). Les propriétés hydrophobes de la cuticule ont été évaluées par le niveau de perméabilité des gamétophores au bleu de toluidine (TB). Une très légère pénétration du colorant dans les tissus est visible après coloration des gamétophores des mutants simple KO. Les gamétophores du mutant double KO sont nettement plus perméables au TB, témoignant d'une altération du niveau de perméabilité des tissus (fig. 26A). La quantification de la pénétration du TB dans les tissus montre effectivement que les gamétophores des mutants simples *cus1* et *cus2* sont légèrement plus perméables que les gamétophores WT, et que les gamétophores du mutant double *cus1/cus2* sont beaucoup plus perméables par rapport au WT (fig. 26B). L'ensemble de ces observations macroscopiques est identique pour les quatre lignées indépendantes de chaque mutant (annexe

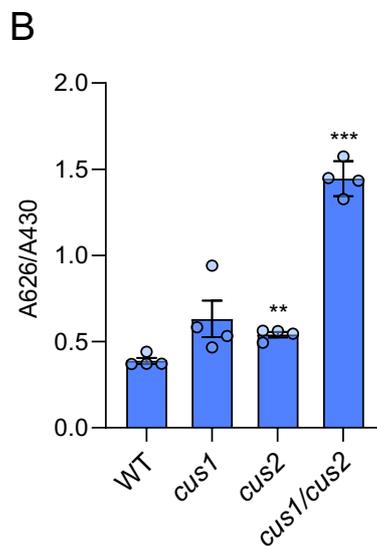
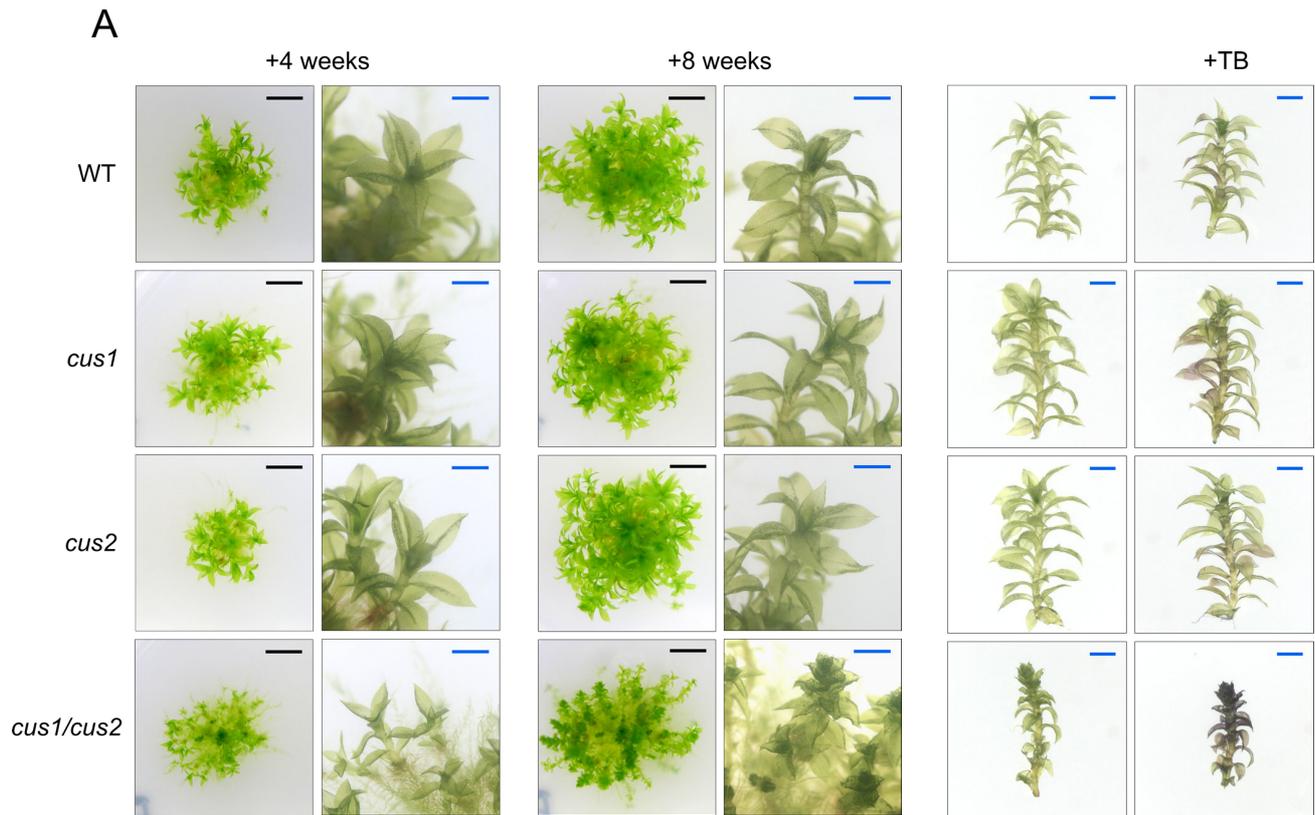


Figure 26 : Investigation de la fonction biologique de PpCUS1 et PpCUS2.

A : Phénotypes des colonies et gamétophores des lignées sauvages et mutantes *Ppcus*, quatre et huit semaines après repiquage. Le niveau de perméabilité des gamétophores a été évalué par coloration au bleu de toluidine (TB). **B** : Niveau de perméabilité des gamétophores mesuré par le ratio d'absorbance A626/A430 après coloration au bleu de toluidine. Échelles : noire 5 mm ; bleue 1 mm. Les données représentent la moyenne de quatre lignées indépendantes ± l'erreur standard. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

1). L'altération du développement des gamétophores et de leur perméabilité dans le mutant double KO suggère un rôle des gènes *CUSs* dans la biosynthèse de la cutine ou de la cuticule, avec une redondance fonctionnelle. Pour explorer cette hypothèse et déceler d'éventuelles différences entre les mutants simples KO, la cuticule des lignées mutantes a été observée par microscopie électronique à balayage sur des coupes de phyllides. Les observations montrent une déstructuration de la paroi et de la cuticule, dans les mutants simples KO *cus1* et *cus2*, tout comme dans le mutant double KO *cus1/cus2* (fig. 27A). Néanmoins, la résolution des images obtenues ne permet pas d'identifier et de délimiter précisément la paroi et les couches cuticulaires, le « cuticle layer » et le « cuticle proper ». Ces observations permettent toutefois de relier le phénotype du mutant *cus1/cus2* à une déstructuration de la cuticule, et montrent que la cuticule des mutants simples *cus1* et *cus2* est également altérée, même si le développement et la physiologie des plantes sont peu affectés. Pour relier l'altération de la cuticule des mutants à d'éventuelles modifications de la cutine, la composition du polymère a été analysée par GC-TOFMS. La composition de la cutine des mutants simples KO est peu ou pas affectée. En effet, en comparaison avec la cutine des gamétophores WT, la cutine des gamétophores du mutant *cus1* contient plus de glycérol (différence non significative) et moins de diOH-C16 ; et la cutine du mutant *cus2* a une composition similaire au WT (fig. 27B). La différence de composition de la cutine du mutant *cus1/cus2* est bien plus importante. Pour ce mutant, les teneurs des monomères aliphatiques principaux (C16:0, C18:0, diOH-C16 et triOH-C18) sont plus faibles, notamment la teneur en diOH-C16 qui diminue de 75% par rapport au WT. A l'inverse, les teneurs en glycérol et en *p*-coumarate sont respectivement 2,6 et 1,7 fois plus élevées dans la cutine du mutant double KO (fig. 27B). A partir de ces données, des caractéristiques générales de la composition de la cutine ont pu être calculées pour étudier l'impact de la mutation des gènes *CUSs* sur la cutine. La quantité totale de cutine est similaire entre les plantes WT et simples KO, mais est diminuée de 33% pour le mutant double KO (fig. 27C). La proportion relative des types de monomères est également différente entre les différentes lignées. La proportion en glycérol et en monomères aliphatiques hydroxylés (acides gras hydroxylés et tri-OHC18) est respectivement supérieure et inférieure dans la cutine du mutant *cus1* par rapport au WT, alors que la proportion globale de chaque type de monomères est identique dans la cutine du mutant *cus2* (fig. 27D). Pour la cutine du mutant *cus1/cus2*, les proportions en glycérol et en composés phénoliques sont supérieures, et les proportions en acides gras et en monomères aliphatiques hydroxylés sont inférieures par rapport au WT. D'après la composition de la cutine et la nature chimique de chaque monomère, le rapport entre les fonctions hydroxyles et acides carboxyliques a pu être calculé (ratio OH/COOH ; fig. 27E). En supposant un taux

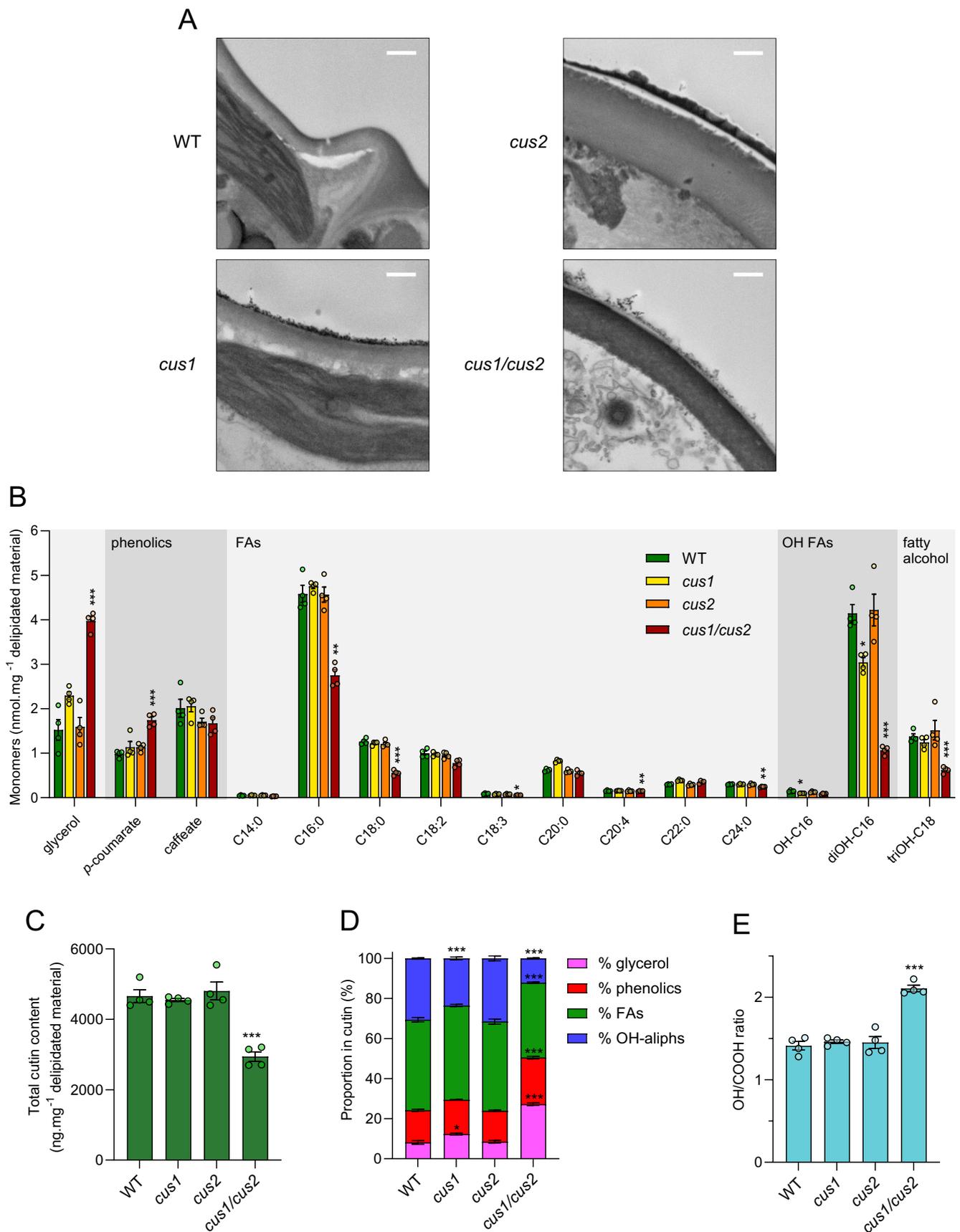


Figure 27 : Analyse de la cutine et de la cuticule des mutants *Ppcus*.

A : Structure de la cuticule observée sur des coupes transversales de phyllides de plantes WT et mutantes par microscopie électronique à balayage. Échelle : 1 μ m. **B** : Composition du polymère cuticulaire des plantes WT et mutantes, établie par GC-TOFMS après délipidation des tissus et dépolymérisation de la cutine. Les données représentent la moyenne de quatre lignées indépendantes \pm l'erreur standard. **C** : Quantité totale de cutine des plantes WT et mutantes. **D** : Proportion relative des types de monomères de la cutine des plantes WT et mutantes. **E** : Proportion des fonctions hydroxyles libres (ratio OH/COOH) dans la cutine des plantes WT et mutantes. Les données des figures C, D et E ont été calculées d'après les données visibles en B. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

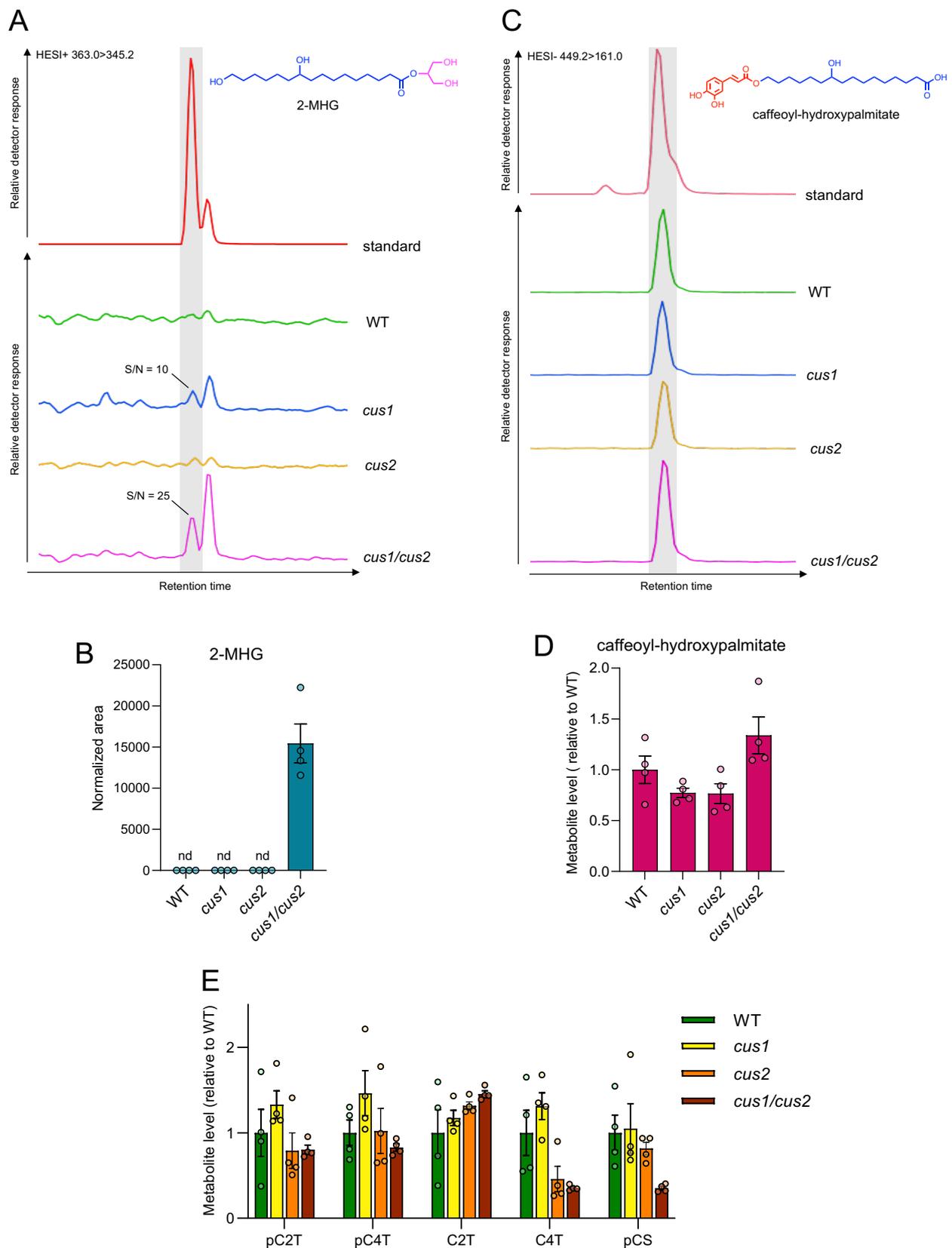


Figure 28 : Profil métabolique des mutants *Ppcus*.

A : Détection du 2-MHG par UPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et mutantes. Le 2-MHG est détecté et identifié ($S/N > 10$) uniquement dans les plantes *cus1/cus2*. S/N : rapport signal/bruit. **B** : Détection du caféoyl-hydroxypalmitate par UHPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et mutantes. **C** : Teneur en 2-MHG mesurée par UHPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et mutantes. **D** : Teneur relative en caféoyl-hydroxypalmitate mesurée par UHPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et mutantes. **E** : Teneurs relatives en esters phénoliques solubles de thréonate et de shikimate, mesurées par UHPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et mutantes. pC2T : *p*-coumaroyl-2-thréonate ; pC4T : *p*-coumaroyl-4-thréonate ; C2T : caféoyl-2-thréonate ; C4T : caféoyl-4-thréonate ; pCS : *p*-coumaroyl-shikimate. Les données représentent la moyenne de quatre lignées indépendantes \pm l'erreur standard. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

d'estérification maximum des monomères, cette valeur permet de connaître la proportion théorique de fonctions hydroxyles libres, qui conditionne fortement les propriétés physico-chimiques de la cutine et de la cuticule (Isaacson *et al.*, 2009 ; Philippe *et al.*, 2016). D'après la composition mesurée par GC-TOFMS, la cutine de *P. patens* contient un excès de fonctions hydroxyles (ratio OH/COOH = 1,41 chez le WT ; fig. 27E). Ce ratio est similaire pour la cutine des mutants simples *cus1* et *cus2*, mais est supérieur pour la cutine du mutant double *cus1/cus2* (2,11 ; fig. 27E). Il existe donc théoriquement plus de deux fois plus de fonctions hydroxyles que de fonctions carboxyliques dans la cutine de ce mutant, ce qui signifie un fort excès de fonctions hydroxyles non-estérifiées en comparaison avec la cutine de plantes WT. Ainsi, la caractérisation des mutants simples ou double KO *cus* à l'échelle macroscopique, cellulaire et moléculaire a montré une modification de la biosynthèse de la cutine et de la cuticule, de pair avec une altération des propriétés de la cuticule et du développement de la plante. La comparaison des phénotypes montre une redondance fonctionnelle au moins partielle des deux isoformes CUSs.

Le 2-MHG s'accumule dans le mutant *cus1/cus2*

L'activité enzymatique CUS décrite implique le substrat 2-MHG, dont une légère accumulation a été détectée dans les fruits de tomate des mutants *cd1* (Yeats *et al.*, 2012). Pour étudier l'hypothèse d'une activité canonique CUS par les enzymes PpCUS1 et PpCUS2, le 2-MHG a été recherché par UHPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT, simples ou doubles KO. Le 2-MHG n'est pas détecté dans les extraits de gamétophores WT et *cus2*. La molécule semble être légèrement détectée dans les extraits de gamétophores *cus1*, mais avec un rapport signal/bruit (S/N) faible, compris 5 et 10 selon la lignée analysée, soit en-dessous des limites de détection usuelles (LOD ; fig. 28A). Une accumulation plus nette est mesurée dans les extraits de gamétophores *cus1/cus2* (S/N compris entre 17 et 25 ; fig. 28A et 28B). La caractérisation du mutant *fht* a mis en évidence que le produit enzymatique de PpFHT, le caféoyl-hydroxypalmitate, est un précurseur de la cutine de *P. patens*. Cette molécule a donc également été recherchée et dosée par UHPLC-MS/MS dans les mêmes extraits métaboliques. Le caféoyl-hydroxypalmitate est détecté dans l'ensemble des gamétophores (fig. 28C), avec une légère accumulation non statistiquement significative dans le mutant *cus1/cus2* (fig. 28D). La voie des phénylpropanoïdes ayant un rôle central dans la biosynthèse de la cutine de *P. patens*, des molécules caractéristiques de cette voie métabolique ont aussi été dosées par UPLC-MS/MS au sein des mêmes génotypes. Les teneurs en esters phénoliques de thréonate caractéristiques de *P. patens* (Renault *et al.*, 2017a), ainsi qu'en

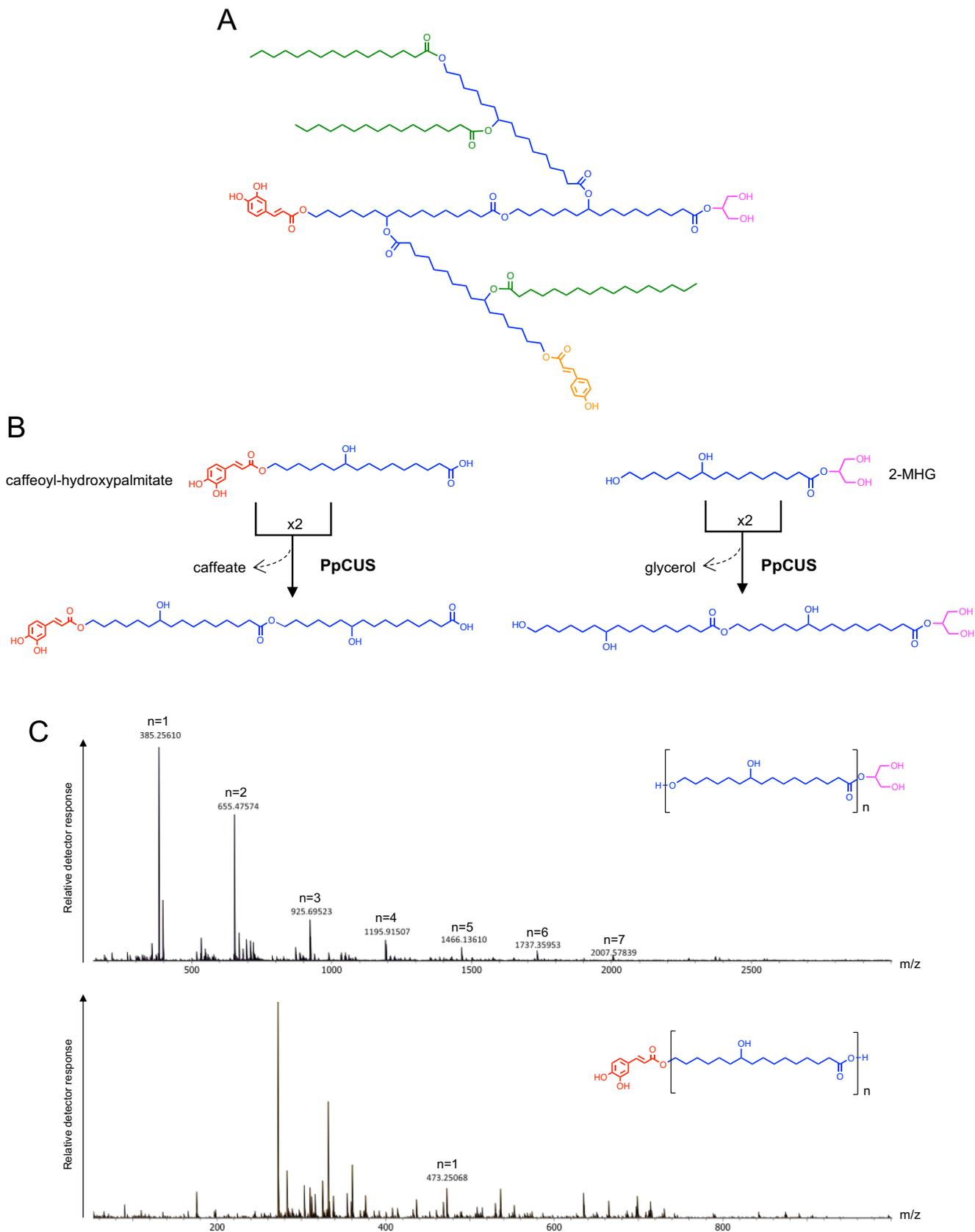


Figure 29 : Activité enzymatique des enzymes PpCUSs.

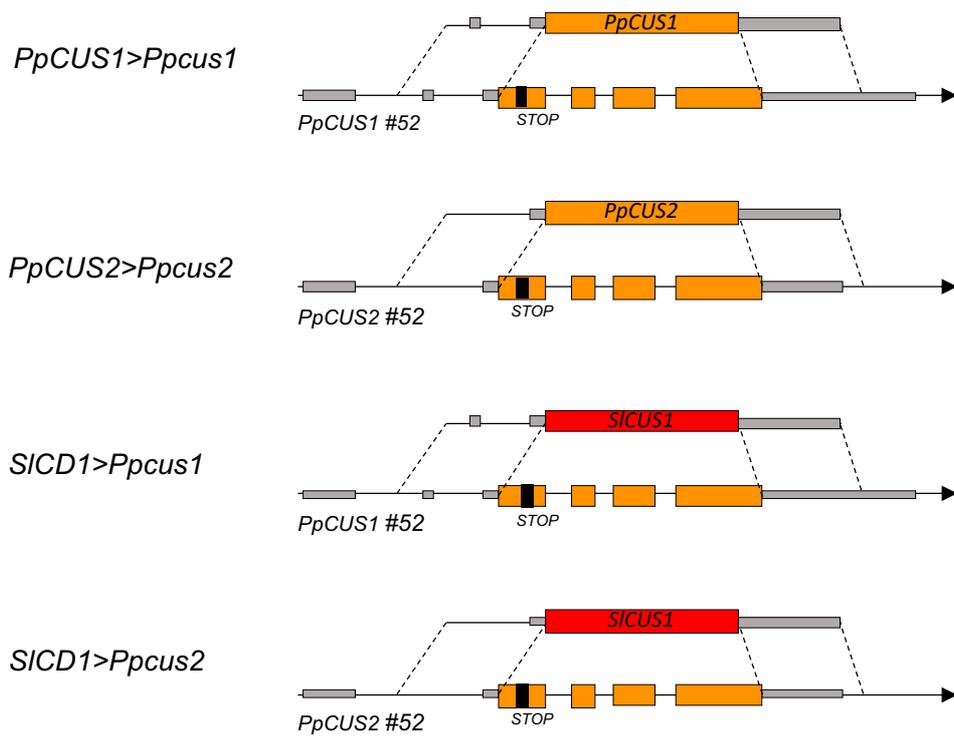
A : Proposition d'une structure de la cutine de *P. patens*, d'après la composition du polymère mesurée par GC-TOF. **B** : Activités enzymatiques potentielles des enzymes PpCUSs, à partir du 2-MHG ou du caféoyl-hydroxypalmitate. **C** : Analyse par MALDI-HRMS des produits enzymatiques de PpCUS1 à partir du 2-MHG ou du caféoyl-hydroxypalmitate. Des oligomères dérivés du 2-MHG et conformes à la structure proposée sont détectés jusqu'à n=7. Aucun oligomère dérivé du caféoyl-hydroxypalmitate n'est identifié.

p-coumaroyl-shikimate, un intermédiaire essentiel de la voie des phénylpropanoïdes, ont été mesurées. La teneur en caféoyl-4-thréonate semble inférieure dans le mutant *cus2* et *cus1/cus2*, et la teneur en *p*-coumaroyl-shikimate semble inférieure dans le mutant *cus1/cus2*, sans que les différences soient statistiquement significatives. Il existe en effet une variabilité importante entre les différentes lignées, ce qui ne permet pas d'interpréter davantage ces données analytiques (fig. 28D).

PpCUS1 métabolise le 2-MHG

Les gènes *PpCUSs* ayant une fonction associée à la synthèse de la cutine, la question se pose de connaître l'activité enzymatique des protéines PpCUSs, au vu de l'activité décrite CUS et de la nature de la cutine de *P. patens*. Une structure théorique de la cutine de *P. patens* est proposée figure 29A, d'après la composition du polymère mesurée par GC-TOFMS. D'après cette structure et l'identification du caféoyl-hydroxypalmitate comme précurseur de la cutine, deux réactions enzymatiques potentielles sont imaginées. La réaction canonique, déjà démontrée pour PpCUS1, métabolise le 2-MHG (Yeats *et al.*, 2014). Une hypothèse alternative serait que les CUSs de *P. patens* utiliseraient le caféoyl-hydroxypalmitate pour la polymérisation en catalysant le clivage de la liaison ester du substrat et la formation d'une nouvelle liaison ester entre deux extrémités du diOH-C16. Notons qu'à la différence de la réaction avec le 2-MHG, cette deuxième réaction formerait des liaisons ester entre la fonction hydroxyle du diOH-C16 libéré et la fonction acide carboxylique du polymère grandissant, et non l'inverse (fig. 29B). Ces deux activités ont été testées *in vitro* avec la protéine recombinante PpCUS1 produite par Yeats *et al.* (2014), en présence du 2-MHG synthétisé chimiquement, ou du caféoyl-hydroxypalmitate synthétisé enzymatiquement. Les produits des réactions enzymatiques ont été analysés par « matrix-assisted laser desorption-ionization » couplée à un spectromètre de masse haute-résolution (MALDI-HRMS), afin de rechercher les *m/z* des oligomères théoriques formés par les deux réactions présentées figure 29B. Des oligomères de $n=1$ à $n=7$ sont identifiés dans les produits de la réaction enzymatique avec le 2-MHG, ce qui démontre à nouveau l'activité de PpCUS1 avec ce substrat, et valide nos conditions expérimentales et analytiques (fig. 29C). En revanche, aucun oligomère n'est identifié dans les produits de la réaction enzymatique avec le caféoyl-hydroxypalmitate. Dans les conditions testées, l'enzyme ne métabolise donc pas ce substrat selon la réaction imaginée (fig. 29C). Toutefois, l'activité enzymatique n'a pas pu être évaluée dans les mêmes conditions pour les deux substrats. En effet, la concentration en caféoyl-hydroxypalmitate lors de la réaction enzymatique était estimée à 20 fois inférieure à la concentration en 2-MHG, car le substrat n'a

A



B

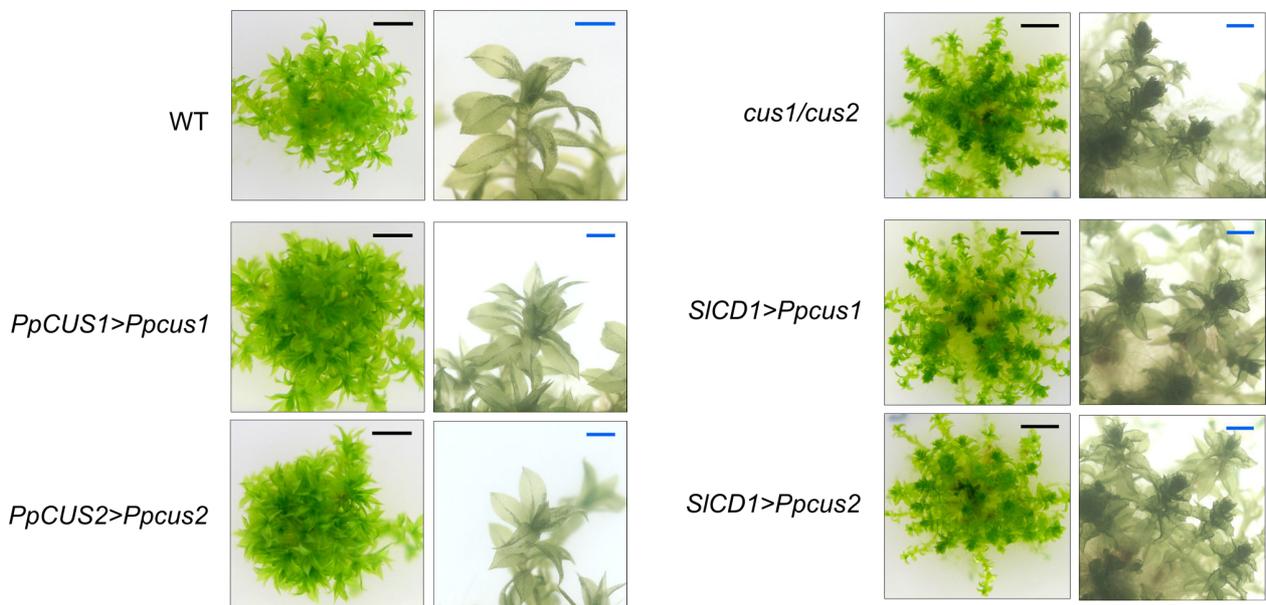


Figure 30 : Trans-complémentation du mutant *Ppcus1/cus2* par *SICD1*.

A : Stratégie de trans-complémentation du mutant double KO *cus1/cus2* par recombinaison homologue. Le gène *PpCUS1* ou *PpCUS2* muté par CRISPR/Cas9 dans le premier intron est remplacé par la séquence codante du gène *PpCUS1*, *PpCUS2* ou *SICD1*. **B** : Phénotype des colonies et gamétophores des lignées trans-complémentées. Les lignées *PpCUS1*>*Ppcus1* et *PpCUS2*>*Ppcus2* ont un phénotype WT. Les lignées *SICD1*>*Ppcus1* et *SICD1*>*Ppcus2* ont le même phénotype macroscopique que le mutant double KO *cus1/cus2*.

pas pu être produit en plus grande quantité enzymatiquement. Cette expérience ne montre donc pas d'activité à partir du caféoyl-hydroxypalmitate, mais ne permet pas d'infirmer l'hypothèse formulée avec certitude.

SICD1 ne complémente pas le mutant *cus1/cus2*

Au sein de la famille CUS, les différentes enzymes caractérisées enzymatiquement ont l'activité CUS décrite à partir du 2-MHG. La caractérisation fonctionnelle des gènes *CUSs* de *P. patens* suggère une fonction conservée de cette famille dans la biosynthèse de la cutine. Pour savoir si la fonction biochimique et physiologique de la famille CUS est effectivement conservée chez les embryophytes, le mutant double KO *cus1/cus2* a été trans-complémenté par recombinaison homologue avec le gène *SICD1*, le seul gène *CUS* à avoir été caractérisé biochimiquement et fonctionnellement (Yeats *et al.*, 2012). Afin de valider la démarche expérimentale, le mutant *cus1/cus2* a d'abord été trans-complémenté avec la séquence codante du gène *PpCUS1* ou *PpCUS2*, dans le locus muté correspondant. Cette trans-complémentation restaure théoriquement un génotype simple KO *cus1* ou *cus2*, à l'exception de l'absence d'introns dans le gène modifié (fig. 30A). Tout comme les mutants simples KO, les lignées trans-complémentées obtenues *PpCUS1*>*Ppcus1* et *PpCUS2*>*Ppcus2* ont effectivement un phénotype macroscopique identique aux plantes WT, validant ainsi la démarche expérimentale (fig. 30B). La même démarche a été utilisée pour trans-complémenter le mutant *cus1/cus2* avec la séquence codante du gène *SICD1* (fig. 30A). Les lignées trans-complémentées obtenues *SICD1*>*Ppcus1* et *SICD1*>*Ppcus2* ont un phénotype macroscopique identique au mutant *cus1/cus2* (fig. 30B). Pour les quatre types de trans-complémentations réalisées, trois lignées indépendantes ont été obtenues, ayant toutes le même phénotype (annexe 1). La trans-complémentation du mutant *cus1/cus2* par *SICD1* ne restaure donc pas le phénotype WT, invalidant à priori l'hypothèse d'une conservation fonctionnelle *in planta*. Néanmoins, la transcription du gène *SICD1* et/ou la production de la protéine SICD1 n'ont pas encore été confirmées par RT-qPCR et Western Blot, respectivement. Ces futures données permettront d'affirmer ou de nuancer les résultats présents.

Discussion

La famille CUS participe à la biosynthèse de la cutine de *P. patens*

L'obtention et la caractérisation des mutants simple et double KO *cus* de *P. patens* a montré le rôle de cette famille dans la biosynthèse de la cutine et l'élaboration de la cuticule.

Seule l'abolition totale de la voie CUS dans le mutant *cus1/cus2* provoque un phénotype fort de défaut de cuticule, tant à l'échelle macroscopique que moléculaire. La fonction des deux gènes *PpCUS1* et *PpCUS2* est donc redondante. La nature, l'activité et la localisation subcellulaire prédite des protéines PpCUS1 et PpCUS2 suggèrent leur rôle plus spécifique dans la polymérisation apoplastique des précurseurs de cutine. L'unique activité CUS décrite à ce jour polymérise le diOH-C16. Ce monomère, majoritaire dans la cutine de *P. patens*, est aussi celui dont la diminution est la plus importante dans la cutine du mutant *cus1/cus2*. Par ailleurs, selon le mécanisme de polymérisation à partir d'un précurseur de type 2-MAG, parmi les monomères de cutine de *P. patens*, seuls le diOH-C16 et le ω OH-C16 peuvent être polymérisés par un tel mécanisme. Or, la teneur en ω OH-C16 n'est pas impactée dans la cutine du mutant *cus1/cus2*. Tel que proposé pour le mutant *fht*, la diminution de la teneur en acides gras non hydroxylés dans la cutine du mutant *cus1/cus2* serait alors aussi la conséquence d'une plus faible incorporation du diOH-C16 dans le polymère, car fournissant moins de fonctions hydroxyles nécessaires à l'estérification de ces monomères. Une autre conséquence de l'abolition de l'activité CUS est l'augmentation de la teneur en glycérol dans la cutine, potentiellement due à une incorporation directe du 2-MHG accumulé dans le polymère, en l'absence du clivage de la liaison ester entre le glycérol et le diOH-C16. Ces modifications de la composition de la cutine du mutant *cus1/cus2* se traduisent par une baisse de la quantité totale de cutine et une augmentation de la proportion de fonctions hydroxyles libres dans le polymère. La caractérisation des mutants *cd1*, *cd2* et *cd3* de *S. lycopersicum* a montré qu'une augmentation des fonctions hydroxyles de la cutine augmente les interactions hydrophiles du polymère, provoque sa déstructuration, et est associé à une modification des propriétés hydrophobes de la cuticule, traduite par une perméabilité accrue des fruits des mutants. La quantité totale et l'épaisseur de la cutine ne sont en revanche pas corrélés à l'intensité de ce phénotype (Isaacson *et al.*, 2009). La comparaison du taux d'estérification du diOH-C16 et du glycérol dans la cutine des fruits WT et *cd1* de *S. lycopersicum* montre par ailleurs une moindre estérification des fonctions hydroxyles de ces deux monomères, ce qui contribue à l'augmentation du taux de fonctions hydroxyles libres, et à la déstructuration de la cutine (Phillipe *et al.*, 2016). D'un point de vue théorique, d'après la composition de la cutine des plantes WT et *cus1/cus2* et en supposant un taux d'estérification maximum des monomères, la proportion de fonctions hydroxyles libres est nécessairement supérieure dans la cutine du mutant double KO. Si à l'instar du mutant *cd1* de tomate, le taux d'estérification du glycérol et du diOH-C16 sont aussi impactés négativement, la proportion de fonctions hydroxyles libres, et de fait les propriétés physico-chimiques du polymère, peuvent être davantage impactées dans

ce mutant. De manière évidente, l'absence d'activité CUS perturbe donc la synthèse, la composition et la structure globale de la cutine. La famille CUS participe ainsi à la biosynthèse et *a fortiori* à la polymérisation de la cutine.

L'activité et la fonction de la famille CUS sont partiellement conservées chez les embryophytes

L'activité enzymatique CUS à partir du 2-MHG, démontrée pour les enzymes SICD1 et AtCUS1, a aussi été démontrée pour l'enzyme PpCUS1, par Yeats *et al.* (2014) et lors de ces travaux. Cette propriété catalytique semble donc conservée au sein de la famille CUS chez les embryophytes. En l'absence d'activité CUS, l'accumulation du substrat 2-MHG dans les gamétophores du mutant double KO *cus1/cus2*, suggère que cette activité est aussi conservée *in planta*, et que la fonction des enzymes PpCUSs soit effectivement liée à cette activité. Les mêmes observations interprétations ont été faites dans les fruits du mutant *cd1* de tomate (Yeats *et al.*, 2012). En amont de cette étape de polymérisation, le 2-MHG est produit par des enzymes GPATs. Chez *P. patens*, deux gènes *GPATs* ont été étudiés. L'expression des gènes *PpGPAT2* et *PpGPAT4* de *P. patens* dans le mutant *gpat6* d'*A. thaliana* – qui a un défaut de cuticule au niveau des pièces florales – restaure le phénotype WT (Lee *et al.*, 2020). La double activité enzymatique GPAT (acyl-transférase et phosphatase ; fig. 23), caractéristique de la voie de biosynthèse de la cutine, est donc conservée entre *P. patens* et *A. thaliana*. De plus, les gamétophores du mutant KO *Ppgpat2* sont partiellement perméables au TB et la cutine du mutant a des teneurs plus faibles en ω OH-C16, diOH-C16 et triOH-C18. La famille GPAT est également multigénique chez *P. patens*, et une redondance fonctionnelle éventuelle des différentes copies n'a cependant pas été évaluée (Lee *et al.*, 2020). Cette étude converge vers l'idée qu'il existe chez *P. patens* un mécanisme de polymérisation de la cutine par les enzymes CUSs, à partir du 2-MHG produit par les enzymes GPATs. L'origine commune de la famille CUS chez les embryophytes s'accompagnerait alors d'une conservation de l'activité et la fonction des gènes *CUSs*, présents en au moins une copie dans chaque espèce. Néanmoins, l'absence de complémentation du mutant *cus1/cus2* par *SICD1* ne soutient pas cette hypothèse. Si l'activité CUS est réellement conservée chez les embryophytes, plusieurs causes peuvent expliquer ce résultat négatif. L'expression de la protéine de tomate dans la mousse doit dans un premier temps être vérifiée, notamment car l'éventuelle différence d'usage des codons entre espèces peut entraver la traduction de la protéine. D'autre part, nous disposons de peu de connaissances quant à la polymérisation de la cutine et ne savons pas si les enzymes CUS fonctionnent avec des partenaires protéiques. L'environnement pariétal des gamétophores de

P. patens est nécessairement différent de celui des fruits de *S. lycopersicum*, ce qui peut via de nombreux facteurs empêcher la protéine SICD1 d'être fonctionnelle. Bien que l'activité enzymatique de SICD1 et PpCUS1 soit identique *in vitro*, il reste possible que l'activité biologique diffère entre ces deux espèces ou bien requiert des environnements cellulaires spécifiques. La caractérisation des mutants *cus* des deux espèces suggèrent, en plus d'une activité commune des enzymes CUSs, que leur fonction biologique est conservée dans la polymérisation de la cutine. Dans ce contexte, l'émergence de la famille CUS chez les embryophytes constitue un des facteurs qui ont permis l'apparition de la cutine et de la cuticule, et qui a participé à l'adaptation des plantes aux milieux terrestres.

D'autres mécanismes de polymérisation de la cutine existent chez *P. patens*

La famille CUS est souvent multigénique, notamment chez les angiospermes, pour qui uniquement des mutants *cus* ont été étudiés jusqu'à aujourd'hui (Yeats *et al.*, 2012 ; Girard *et al.*, 2012 ; Isaacson *et al.*, 2009 ; Philippe *et al.*, 2016 ; Naranjo *et al.*, 2006 ; Hong *et al.*, 2017). La caractérisation des différents mutants simples de tomate suggère qu'il existe une redondance fonctionnelle entre les différentes copies de la famille CUS (Isaacson *et al.*, 2009). Il est donc impossible de savoir dans quelle proportion la cutine restante des mutants simple *cus* est polymérisée par les autres isoformes CUS et/ou par d'autres mécanismes enzymatiques ou non-enzymatiques. En d'autres mots, il est ainsi impossible de connaître précisément dans quelle mesure la famille CUS est responsable de la polymérisation de la cutine. Avec la caractérisation fonctionnelle de PpCUS1 et PpCUS2, *P. patens* est dorénavant la seule espèce pour laquelle nous disposons d'un mutant affecté dans l'ensemble de la voie CUS, et devient un outil intéressant pour répondre à cette question. La quantité totale de cutine n'est diminuée que d'un tiers dans le mutant *cus1/cus2*, et les teneurs des différents monomères ne sont pas impactées de manière identique. Le développement des gamétophores est par ailleurs aussi altéré, sans être entièrement inhibé. L'impact de l'abolition de l'activité CUS sur la synthèse de cutine et le développement est donc significatif mais pas total. Il existe ainsi, *a minima* chez *P. patens*, d'autres mécanismes de polymérisation de la cutine, qu'ils soient constitutifs ou compensatoires. Ce résultat n'est pas généralisable aux embryophytes en général, d'autant plus que la composition de la cutine de *P. patens* et des bryophytes au sens large est différente de celle des plantes vasculaires (Kong *et al.*, 2020). Il est intéressant de noter qu'alors que la proportion en monomères aliphatiques est affectée négativement dans le mutant *cus1/cus2*, la proportion d'unités phénolique y est supérieure. La polymérisation de la cutine par la voie CUS semble donc davantage concerner la portion aliphatique que phénolique du polymère. La partie

aliphatique de la cutine n'est toutefois que partiellement affectée dans le mutant *cus1/cus2*, signifiant qu'il existe à priori aussi d'autres mécanismes de polymérisation des monomères aliphatiques, indépendants de la voie CUS. Il semble ainsi qu'il existe d'autres mécanismes de polymérisation, à la fois concernant les monomères aliphatiques et phénoliques de la cutine chez *P. patens*. L'identification de ces mécanismes et leur éventuelle conservation fonctionnelle chez les embryophytes restent à étudier et à découvrir.

Conclusion et perspectives

L'étude de la famille CUS chez *P. patens* a démontré son rôle dans la biosynthèse de la cutine et de la cuticule. Les deux isoformes PpCUS1 et PpCUS2 ont une fonction redondante, attribuée à la polymérisation de la cutine. L'activité biochimique des protéines CUSs caractérisées jusqu'à ce jour est conservée chez les embryophytes, tout comme la fonction biologique de cette famille apparue chez l'ancêtre commun des plantes terrestres. L'émergence de cette sous-famille de GDSLs a ainsi vraisemblablement contribué à l'acquisition de la machinerie enzymatique nécessaire à la biosynthèse de la cutine, et à l'adaptation des plantes aux milieux terrestres.

L'activité des protéines CUSs est le seul mécanisme de polymérisation de la cutine connu à ce jour. Le caractère multigénique de la famille CUS rend son étude fonctionnelle exhaustive laborieuse. La présence de seulement deux gènes *CUSs* chez *P. patens* a permis d'abolir intégralement la voie CUS de cette espèce dans un mutant double KO. L'obtention de ce mutant apporte ainsi de nouvelles informations quant au rôle de la voie CUS chez *P. patens*, mais aussi quant à la contribution de cette voie dans la polymérisation de la cutine en général. Il apparaît que d'autres mécanismes de polymérisation de la cutine existent chez *P. patens*, tant pour une proportion des monomères aliphatiques, que pour les monomères phénoliques du polymère. Pour investiguer si le rôle partiel de la famille CUS dans la polymérisation de la cutine est spécifique à *P. patens*, ou commun aux embryophytes, il serait aujourd'hui concevable d'obtenir un mutant KO multiple affecté dans l'ensemble des copies *CUSs*, par exemple chez *A. thaliana* grâce aux protocoles récents de transformation génétique par CRISPR/Cas9.

La démonstration du rôle de la voie CUS dans la biosynthèse de la cutine de *P. patens* est à présent à élargir aux bryophytes au sens large, pour confirmer la fonction et la conservation de cette famille, et étudier si la contribution de la voie CUS dans l'assemblage du polymère est analogue. L'existence d'une copie unique *CUS* chez *M. polymorpha* et *A. agrestis* rend ces

espèces modèles pertinentes pour une telle approche. D'autre part, le constat que la voie CUS ne contribue pas à la polymérisation des monomères phénoliques de la cutine chez *P. patens* ouvre de nouvelles interrogations. À l'inverse des plantes vasculaires, chez les bryophytes, la proportion phénolique de la cutine est importante de manière quantitative, mais aussi dans la structuration du polymère (Renault *et al.*, 2017a ; Kriegshauser *et al.*, 2021). Le ou les mécanisme(s) d'intégration des unités phénoliques à la cutine des bryophytes peuvent donc être spécifiques de ce clade, et apporter de nouvelles informations quant à l'évolution des polymères apoplastiques hydrophobes. Pour ces raisons, j'ai souhaité approfondir cette question et rechercher d'autres mécanismes de polymérisation potentiels de la cutine chez les bryophytes.

Matériels et méthodes

Analyse phylogénétique

Les séquences GDSLs de *P. Patens*, *M. polymorpha*, *A. Agrestis*, *S. moellendorffii*, *C. richardii*, *P. abies*, *B. distachyon*, *A. thaliana* et *S. lycopersicum* ont été identifiées par BLASTp (E-value < E^{-70}) avec la séquence de SICD1 comme référence. Les séquences codantes des gènes ont été récupérées et les protéines correspondantes ont été alignées selon l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004) dans le logiciel Seaview. L'alignement obtenu des séquences nucléotidiques a servi à une reconstruction phylogénétique réalisée avec le logiciel IQTREE2 (Minh *et al.*, 2020) et le modèle d'évolution TVM+F+R6. L'arbre phylogénétique non enraciné a été visualisé avec le logiciel FigTree.

Analyse des séquences protéiques

La localisation subcellulaire des protéines a été prédite par l'algorithme DeepLoc 1.0 (Armenteros *et al.*, 2017 ; <https://services.healthtech.dtu.dk>). Les séquences protéiques étudiées ont été alignées selon l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004) par le logiciel MacVector, et l'alignement obtenu a été visualisé grâce au logiciel ESPript 3.0 (Gouet *et al.*, 2003 ; <https://espript.ibcp.fr/>).

Génération des lignées génétiquement modifiées

Les lignées KO ont été générées par transfection de protoplastes avec des constructions génétiques nécessaires à la mutation des gènes cibles par CRISPR/Cas9 (cf. protocoles et méthodologies générales). Les mutants *cus* simples ou doubles ont été obtenus par transfection

de plantes WT (écotype Reute) avec un (mutants simples) ou deux (mutants doubles) plasmides contenant des protospacers spécifiques de *CUS1* et/ou *CUS2*.

Les lignées transcomplémentées ont été générées par transfection de protoplastes avec des constructions génétiques permettant, par recombinaison homologue assistée par CRISPR/Cas9, le remplacement du gène muté *PpCUS1* ou *PpCUS2* par la séquence codante de *PpCUS1*, *PpCUS2*, ou *SICD1* (cf. fig. 30A). La lignée *cus1/cus2* #52 a été utilisée comme fond génétique pour ces transformations. La recombinaison homologue chez *P. patens* étant plus efficace lorsque la région génomique ciblée subit une cassure double-brin par CRISPR/Cas9 (Collonnier *et al.*, 2017), les plasmides nécessaires à l'introduction d'une telle cassure dans le dernier exon des gènes *PpCUS1* et *PpCUS2* ont été produits de la même manière que pour la génération des lignées KO (cf. protocoles et méthodologies générales). Pour la construction des plasmides fournissant l'ADN matrice pour la recombinaison homologue, les séquences codantes de *PpCUS1* et *PpCUS2* ont d'abord été amplifiées par PCR et clonées dans le vecteur pDONR207 par recombinaison BP (Gateway® ; ThermoFisher Scientific) selon les instructions du fabricant. Un plasmide pDONR201 contenant la séquence codante de *SICD1* (Girard *et al.*, 2012) nous a été fourni par Dr. Bénédicte Bakan à l'INRAe de Nantes. Les régions génomiques de 750 pb ciblant la zone de recombinaison homologue ont été amplifiées par PCR, et l'ensemble des fragments ont été clonés dans le vecteur pGEM-T par clonage Gibson (cf. protocoles et méthodologies générales). La recombinaison homologue étant assistée par CRISPR/Cas9, une nouvelle cassure double-brin pourrait avoir lieu dans le dernier exon du gène lors de la transfection des protoplastes, après que la recombinaison homologue ait eu lieu, et provoquer alors l'apparition de mutations telles que recherchées lors de la génération des lignées KO. Afin d'empêcher la protéine Cas9 de cliver ce site après recombinaison homologue, une mutation synonyme a été introduite par mutagenèse dirigée dans les plasmides pGEM-T, sur le « protospacer adjacent motif » (PAM) de la région ciblée par CRISPR/Cas9. Les mutations synonymes désirées ont été introduites par amplification du plasmide par PCR avec des amorces dessinées à l'aide du logiciel QuikChange Primer Design (Agilent Technologies), puis les plasmides matrice hémi-méthylés ont été digérés par l'enzyme *DpnI* (Promega) selon les instructions du fabricant. Les nouveaux plasmides obtenus ont été amplifiés dans *E. coli*, purifiés, et les mutations ont été vérifiées par séquençage Sanger. Ces derniers plasmides ont été digérés par *EcoRI* (Promega) grâce à des sites de restriction insérés par PCR, afin de linéariser la construction de recombinaison homologue. 10 µg de chaque plasmide digéré stérile ont été utilisés pour la transfection des protoplastes.

Analyse de la cutine et de la cuticule

La cuticule des plantes WT et KO a été observée par microscopie électronique à balayage sur des coupes de phyllides par Mathieu Erhardt, à la plateforme de microscopie de l'IBMP (cf. protocoles et méthodologies générales). La composition de la cutine a été analysée par GC-TOFMS, à partir du même matériel que pour les analyses métaboliques (cf. protocoles et méthodologies générales).

Analyses métaboliques

Les esters phénoliques de thréonate et de shikimate, le caféoyl-hydroxypalmitate et le 2-MHG ont été identifiés et quantifiés par UHPLC-MS/MS à partir d'extraits métaboliques. Les esters de thréonate ont été analysés à partir d'extraits non concentrés, tandis que le *p*-coumaroyl-shikimate, le caféoyl-hydroxypalmitate et le 2-MHG ont été analysés à partir d'extraits concentrés (cf. protocoles et méthodologies générales). Les esters de thréonate et de shikimate ont été séparés selon la méthode chromatographique des molécules solubles, tandis que le caféoyl-hydroxypalmitate et le 2-MHG ont été séparés selon la méthode chromatographique des molécules aliphatiques (cf. protocoles et méthodologies générales). Le standard chimique de 2-MHG (Yeats *et al.*, 2012) nous a été fourni par Pr. Jocelyn K.C. Rose de l'université de Cornell (Ithaca, USA). Une méthode MRM spécifique de cette molécule a préalablement été développée afin de pouvoir la rechercher dans les extraits métaboliques, de la même manière que pour l'identification des produits enzymatiques de PpFHT.

Activité enzymatique de PpCUS1

L'activité enzymatique de la protéine recombinante PpCUS1 a été évaluée à partir du 2-MHG synthétisé chimiquement (Yeats *et al.*, 2012), ou du caféoyl-hydroxypalmitate synthétisé enzymatiquement par PpFHT. Une réaction enzymatique avec PpFHT a donc préalablement été réalisée afin de produire et purifier le caféoyl-hydroxypalmitate en plus grande quantité. La réaction a été conduite dans un volume total de 300 μ L contenant 50 mM de tampon phosphate de potassium (KPi ; pH 7,4), 1 mM dithiothréitol (DTT), 0,8 mM caféoyl-CoA (à partir d'une solution stock à 5 mM dans l'eau), 0,8 mM de diOH-C16 (à partir d'une solution stock à 80 mM dans l'éthanol), et 150 μ g de protéine recombinante. La réaction a été initiée par l'ajout du caféoyl-CoA et incubée une nuit à 40°C. Le caféoyl-hydroxypalmitate a été extrait par séparation de phase après ajout de 0,3 μ L d'acide formique (0,1 % final) et 300 μ L d'acétate d'éthyle. L'échantillon a ensuite été vortexé et centrifugé 5 min à 3000 g. 20 μ L

de la phase organique supérieure ont été prélevés, évaporés au SpeedVac (ThermoFisher Scientific), et dérivés au BSTFA pour injection en GC-TOFMS (cf. protocoles et méthodologies générales). La concentration en caféoyl-hydroxypalmitate formé a alors été estimée en calculant la quantité de diOH-C16 consommé lors de la réaction enzymatique. 500 μL de phase organique ont été prélevés, évaporés au SpeedVac, et resuspendus dans 10 μL de DMSO, afin de constituer la solution stock de caféoyl-hydroxypalmitate, estimée à 5 mM. Les activités *in vitro* de PpCUS1 ont été conduites dans un volume total de 50 μL contenant 50 mM de tampon acétate d'ammonium (pH 5.0), 500 ng de protéine recombinante PpCUS1, et le substrat : 1 mM de 2-MHG (à partir d'une solution stock à 100 mM dans le DMSO), ou 50 μM de caféoyl-hydroxypalmitate (à partir d'une solution stock à 5 mM dans le DMSO). Les réactions ont été incubées à 37°C pendant 24h sous agitation (350 rpm). La protéine recombinante PpCUS1 a été produite de manière hétérologue en tabac (*Nicotiana benthamiana*) par Yeats *et al.* (2014), et nous a été fournie par Pr. Jocelyn K.C. Rose de l'université de Cornell (Ithaca, USA). Des réactions témoins ont été réalisées sans enzyme, car la faible quantité de protéine recombinante à notre disposition ne permettait pas un contrôle avec des enzymes dénaturées. Les produits enzymatiques ont été extraits par séparation de phase par l'ajout de 100 μL d'acétate d'éthyle. Les tubes réactionnels ont ensuite été vortexés, centrifugés 5 min à 3000 g, et 80 μL de phase organique ont été transférés dans un nouveau tube. Une deuxième extraction identique a été réalisée, et les phases organiques ont été rassemblées, puis évaporées au SpeedVac en chauffant à 35 °C, et reprises dans 100 μL de méthanol. Ce volume a à nouveau été évaporé, et repris dans 10 μL de méthanol pour analyser les produits enzymatiques par spectrométrie de masse.

Les produits des réactions enzymatiques ont été analysés par « matrix-assisted laser desorption-ionization » couplée à un spectromètre de masse haute-résolution (MALDI-HRMS) sur un SolariX XR 7 T (Bruker). 0,5 μL de matrice (20 mg/mL d'acide 2,5-dihydrobenzoïque dans une solution d'eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique, 69,9:30:0,1, v/v/v) soniquée pendant 10 min avant utilisation, ont d'abord été déposés sur une plaque AnchorChip (Bruker), évaporés, puis 0,5 μL d'échantillon ont été déposés. Le spectromètre de masse était réglé en mode positif sur une gamme de 150 à 3000 Da. La calibration a été faite en utilisant les pics de matrice comme référence. La puissance du laser était de 20 %, avec 100 coups à une fréquence de 1000 Hz, sur une section de 50 μm , et avec un temps de transfert de 0,6 ms. Les données ont été collectées à l'aide du logiciel ftmsControl 2.2.0 (Bruker), et analysées avec le logiciel DataAnalysis 5.2 (Bruker). Les formules brutes des pics obtenus ont été générées avec l'outil SmartFormula, avec un maximum de déviation (m/z) de 3 ppm et un mSigma maximum de 30.

Les formules brutes obtenues ont ensuite été comparées aux formules brutes théoriques des différents oligomères présentés fig. 29B. L'analyse des produits des réactions enzymatiques par MALDI-HRMS a été réalisée par Claire Villette à la plateforme d'imagerie et de spectrométrie de masse de l'IBMP.

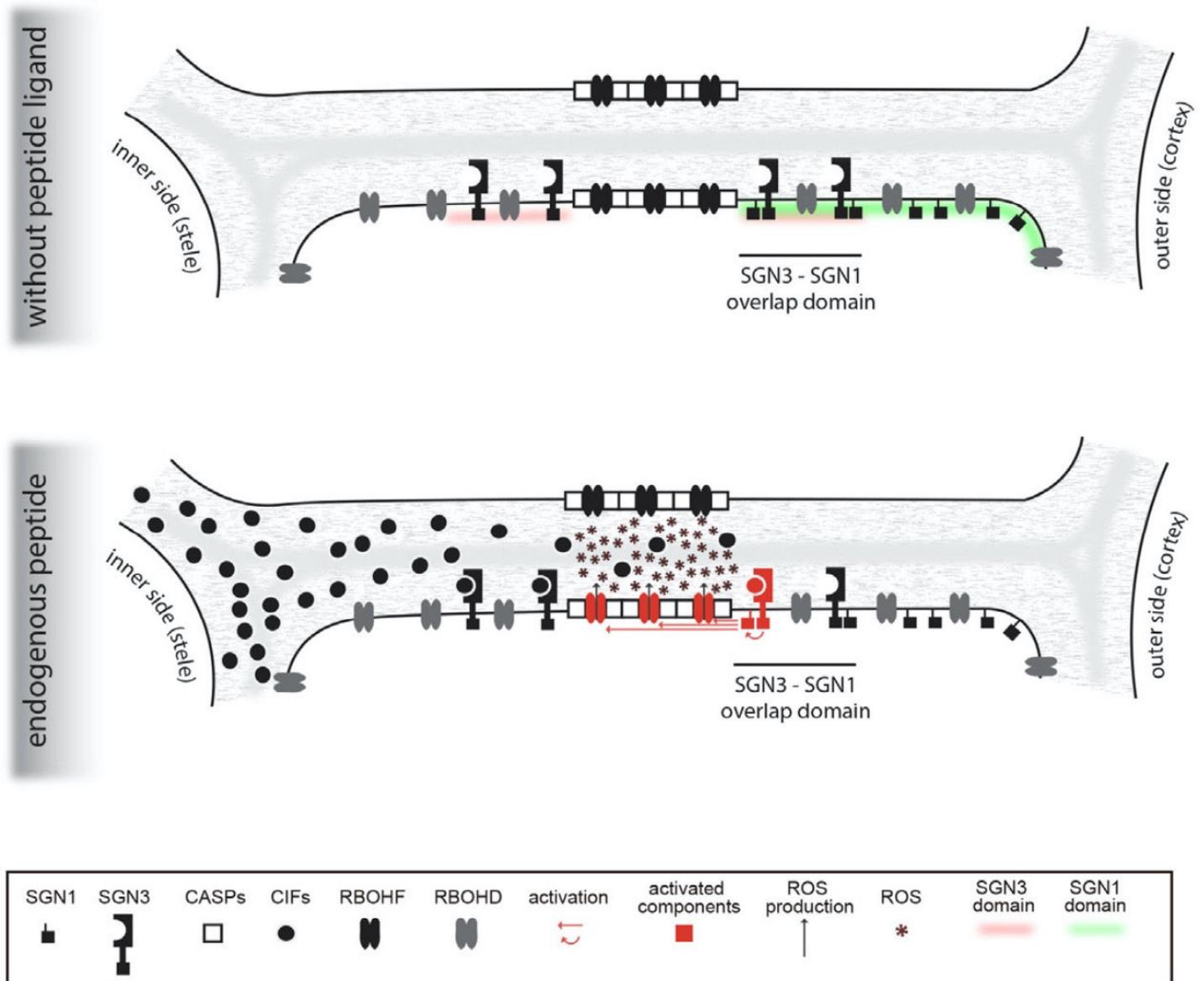


Figure 31 : Lignification du cadre de Caspary.

Le schéma représente la voie de signalisation qui contrôle la lignification localisée du cadre de Caspary entre les cellules de l'endoderme racinaire. Les protéines transmembranaires CASPs sont localisées précisément au lieu de formation du cadre de Caspary, et coordonnent la colocalisation des protéines RBOHF et PRX64 (non représentée). Les peptides CIFs sont synthétisés dans la stèle et reconnus par le domaine extracellulaire de SGN3, dont le domaine kinase cytosolique phosphoryle et active SGN1, qui phosphoryle et active à son tour RBOHF. La colocalisation de SGN3 et SGN1 à proximité des protéines CASPs vers le cortex, canalise la production de ROS apoplastiques au lieu de formation du cadre de Caspary, uniquement si les peptides CIFs peuvent traverser le domaine du cadre de Caspary. La colocalisation de l' H_2O_2 et des peroxydases provoque la lignification du cadre de Caspary de manière localisée. Une fois cette barrière devenue imperméable, les peptides CIFs ne peuvent plus atteindre les récepteurs SGN3 et la lignification cesse. D'après Fujita *et al.* (2020).

Étude d'une voie peroxydase dans la biosynthèse de la cutine de *P. patens*

Introduction

L'étude fonctionnelle de la famille CUS chez *P. patens* suggère l'existence d'autres mécanismes de polymérisation de la cutine. Le faible impact de l'absence d'activité CUS sur le profil en monomères phénoliques de la cutine invite à considérer un mécanisme plus spécifique de cette portion du polymère. Puisque la voie de biosynthèse et de polymérisation de la cutine semble au moins partiellement conservée entre les plantes vasculaires et non-vasculaires (Lee *et al.*, 2020 ; Buda *et al.*, 2013 ; Yeats *et al.*, 2014), et que l'idée d'un polymère ancestral ait été plusieurs fois évoquée (Renault *et al.*, 2017a et 2019), il est concevable que des mécanismes de polymérisation d'autres polymères apoplastiques soient impliqués dans la polymérisation de la cutine des bryophytes. Notamment, la grande proportion de monomères phénoliques dans la cutine des bryophytes incite à s'intéresser aux mécanismes de polymérisation de la lignine, un polymère entièrement phénolique dont l'élaboration est relativement bien documentée (Kong *et al.*, 2020 ; Dixon et Barros, 2019). Au cours de la dernière décennie, le cadre de Caspary est devenu un modèle pertinent pour l'étude de la lignification. La formation de cette structure localisée dans les racines offre l'avantage d'être facilement et rapidement observable, et d'avoir lieu dans des cellules vivantes, rendant possible l'utilisation d'outils de biologie cellulaire (Roppolo *et al.*, 2011 ; Naseer *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2013 ; Alassimone *et al.*, 2016 ; Fujita *et al.*, 2020). La formation du cadre de Caspary est dirigée des protéines transmembranaires CASPs (pour « casparian strip membrane proteins »), situées à la zone de jonction des cellules de l'endoderme (Roppolo *et al.*, 2011 ; fig. 31). Les protéines CASPs sont nécessaires à la localisation correcte du cadre de Caspary, ainsi qu'à la colocalisation des protéines PRX64 (ou PER64) et RBOHF (Lee *et al.*, 2013). La protéine PRX64 est une peroxydase de classe III responsable, avec d'autres peroxydases, de la lignification du cadre de Caspary (Lee *et al.*, 2013 ; Rojas-Murcia *et al.*, 2020). L' H_2O_2 nécessaire à la polymérisation des monolignols dans la paroi est localement produit par la protéine RBOHF, une NADPH oxydase de la famille des RBOH (pour « respiratory burst oxidase homolog » ; fig. 31). Plus précisément, RBOHF oxyde l' O_2 en anion superoxyde (O_2^-), dismuté ensuite en H_2O_2 par une SOD apoplastique non identifiée (Lee *et al.*, 2013). Récemment, la voie de signalisation aboutissant à la production de ROS et à la lignification contrôlées du cadre de Caspary a été finement décrite (Fujita *et al.*,

2020). Des peptides signaux de type CIF (pour « casparian strip integrity factor ») sont produits dans la stèle et peuvent traverser librement l'espace apoplastique de l'endoderme en l'absence de cadre de Caspary. Ces peptides sont reconnus par le domaine extracellulaire de la protéine transmembranaire SCHENGEN3 (SGN3, également appelée GSO1 ou GASHHO1 ; Nakayama *et al.*, 2017 ; Okuda *et al.*, 2020 ; Fujita *et al.*, 2020). SGN3 appartient à la famille des LRR-RLK (pour « leucine rich repeat – receptor like kinase »), des récepteurs transmembranaires qui après perception d'un ligand extracellulaire, activent une voie de signalisation via leur domaine kinase cytosolique (Pfister *et al.*, 2014 ; Shiu et Bleecker, 2001 et 2003). Après reconnaissance des peptides CIF1 et CIF2, SGN3 phosphoryle et active ainsi SCHENGEN1 (SGN1), une autre protéine LRR-RLK capable de phosphoryler et d'activer RBOHF (Okuda *et al.*, 2020 ; Fujita *et al.*, 2020). Les protéines SGN3 et SGN1 sont colocalisées sur la face externe (vers le cortex) du cadre de Caspary (Alassimone *et al.*, 2016 ; Fujita *et al.*, 2020 ; fig. 31). Ainsi, la reconnaissance des peptides CIF1 et CIF2 par SGN3 mène, via SGN1 et RBOHF, à la production localisée d'H₂O₂ dans la zone de formation du cadre de Caspary. Les peroxydases apoplastiques responsables de la lignification du cadre de Caspary disposent alors du cosubstrat nécessaire à leur activité et polymérisent les monolignols en lignine (fig. 31). Une fois le cadre de Caspary formé et l'endoderme imperméable, les peptides CIFs n'atteignent plus leur récepteur et la production de ROS et la lignification cessent. Ainsi, cette voie de signalisation et la colocalisation des protéines nécessaires à la lignification canalisent la production de ROS de manière contrôlée. Grâce à la production et à la reconnaissance séparées des peptides signaux, cette voie de signalisation appelée « voie Schengen », d'après le traité européen du même nom, permet de sonder l'intégrité de la barrière apoplastique que constitue le cadre de Caspary (Fujita *et al.*, 2020).

En m'appuyant sur la connaissance des acteurs génétiques de la voie Schengen et des mécanismes de polymérisation de la lignine, j'ai recherché au sein de données génomiques et transcriptomiques si un processus analogue pouvait opérer également chez les bryophytes, dans la biosynthèse de la cutine et de la cuticule. L'identification chez *P. patens* de gènes homologues à la voie de lignification du cadre de Caspary, m'a amené à étudier l'implication d'une potentielle voie de polymérisation de la cutine par des peroxydases. Si le rôle de cette voie dans la polymérisation elle-même reste hypothétique, le rôle des ROS et des peroxydases dans la biosynthèse de la cutine a été démontré par l'obtention de différentes combinaisons de mutants KO multiples. L'interaction de cette voie avec la voie CUS étudiée précédemment a aussi été investiguée.

Résultats

Un cluster de gènes contenant des peroxydases est co-exprimé avec *PpFHT*

L'analyse de co-expression à partir de données RNA-Seq dérivées de 32 conditions ou organes différents a permis de mettre en évidence un cluster de gènes co-exprimé avec *PpFHT*, un gène dont nous avons démontré le rôle et l'importance dans la synthèse de la cutine (cf. chapitre 1). Le mutant *fht* est d'ailleurs particulièrement impacté, plus encore que le mutant *cus1/cus2* (fig. 20A et 26A). Ce cluster contient trois peroxydases (nommées arbitrairement *PpPRX1*, *PpPRX2* et *PpPRX3*), deux gènes *LRR-RLK* (nommés *PpLRR-RLK1* et *PpLRR-RLK2*), ainsi qu'un gène *RBOH* (*PpRBOH*). Les gènes *PpFHT*, *PpPRX1/2/3*, *PpRBOH* et *PpLRR-RLK1/2* forment un réseau dont tous les membres sont co-exprimés entre eux (fig. 32). Ce réseau rappelle la voie de signalisation Schengen impliquée dans la lignification du cadre de Caspary caractérisée chez *A. thaliana*, qui fait intervenir deux gènes *LRR-RLKs* (*AtSGN1* et *AtSGN3*), un gène *RBOH* (*AtRBOHF*) et une peroxydase principale (*AtPRX64* ; fig. 31). Ces données transcriptomiques suggèrent donc l'existence d'une voie de signalisation similaire chez *P. patens*, également associée à des peroxydases et à la biosynthèse de la cutine. Notons qu'aucun membre de ce cluster n'est co-exprimé avec les gènes de la voie des phénylpropanoïdes, qui forme partiellement un autre réseau de co-expression. De même, les deux gènes *PpCUSs* sont co-exprimés entre eux, mais pas avec les gènes de la voie des phénylpropanoïdes. Les gènes *PpCUS1* et *PpPRX3* sont par ailleurs co-exprimés (fig. 32). Les données exhaustives de co-expression des gènes étudiés sont disponibles en annexe 5. Si la ou les peroxydases identifiées ont un rôle dans la synthèse de la cutine, leur action dans la voie métabolique serait donc d'une certaine manière distincte de la synthèse de précurseurs phénoliques par la voie des phénylpropanoïdes, et davantage reliée à l'activité FHT et/ou CUS.

Pour explorer plus largement l'hypothèse d'une voie peroxydase dans la synthèse de la cutine, l'histoire évolutive des peroxydases de classe III associées à la lignification a été appréhendée par une analyse phylogénétique, réalisée à partir de séquences homologues à *AtPRX64*, identifiées dans des génomes représentatifs des embryophytes. Les peroxydases connues chez *A. thaliana* pour leur rôle dans la lignification des tissus vasculaires ou du cadre de Caspary, ont ensuite été recherchées au sein de l'arbre phylogénétique obtenu (fig. 33). La dispersion de ces protéines dans l'arbre montre qu'il n'existe pas d'origine commune claire des peroxydases liées à la lignification. En revanche, *PpPRX1*, *AtPRX64* et *AtPRX66*, appartiennent à un même clade. *PpPRX1* partage donc une origine phylogénétique proche avec ces deux peroxydases responsables de la polymérisation de la lignine (fig. 33). Les deux autres

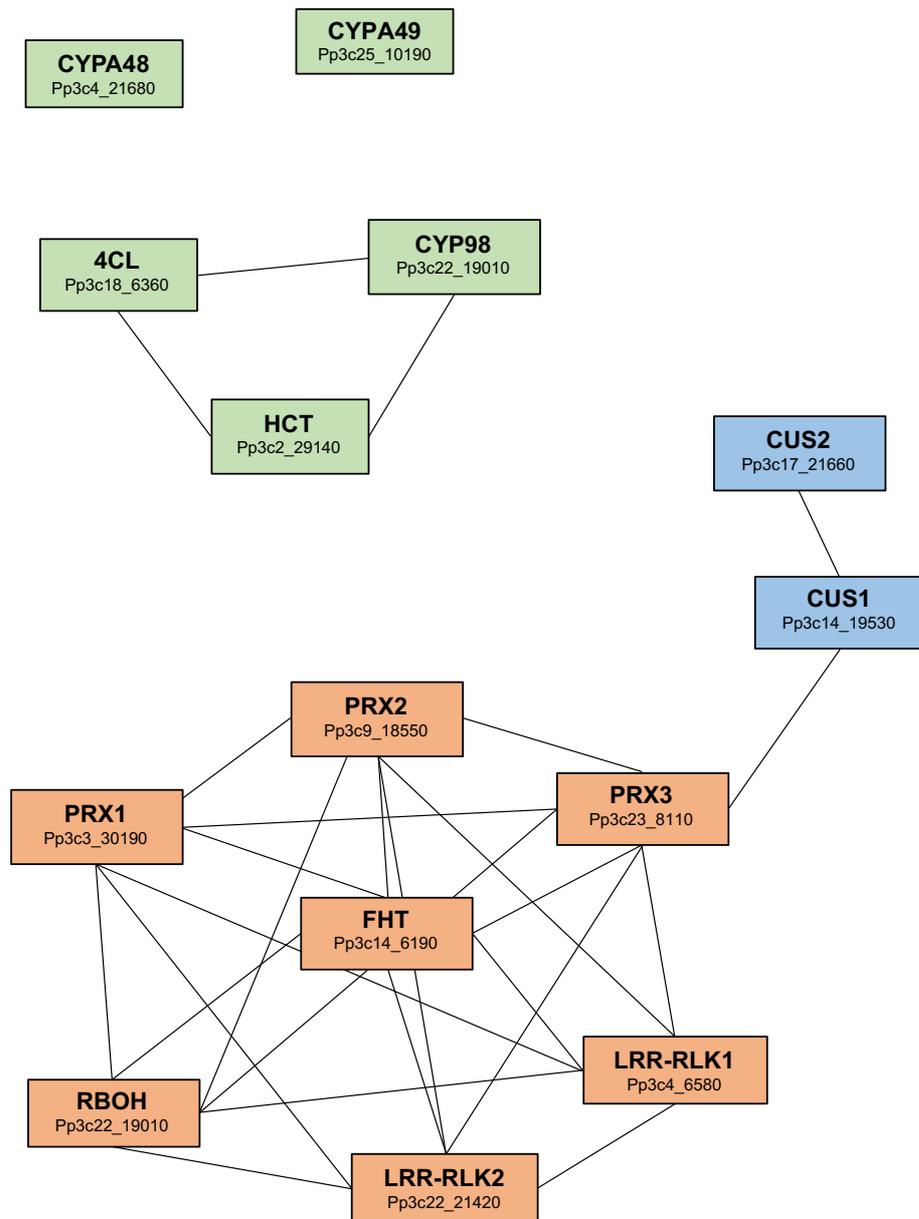


Figure 32 : Co-expression des gènes de biosynthèse de la cutine et d'une voie peroxydase potentielle chez *P. patens*.

Une analyse de co-expression par corrélation de Pearson met en évidence un cluster de gènes co-exprimés avec *PpFHT*, dont la nature rappelle la voie Schengen impliquée dans la lignification du cadre de Caspary. Ce cluster comporte en particulier un gène de type *RBOH*, deux gènes de type *LRR-RLK*, trois peroxydases de classe III (nommées *PpPRX1-3*). Tous les gènes du cluster sont co-exprimés de manière réciproque. Les gènes de la voie de phénylpropanoïdes (*Pp4CL*, *PpCYP98* et *PpHCT*) sont co-exprimés entre eux (Kriegshauser *et al.*, 2021), mais pas avec le cluster identifié, ni avec les gènes *PpCUSs*. Il existe une co-expression entre les gènes *PpCUS1* et *PpCUS2*, et les gènes *PpCUS1* et *PpPRX3*. Chaque connexion représentée entre les gènes signifie un coefficient de corrélation de Pearson supérieur à 0,8. Les valeurs de co-expression ont été obtenues sur Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>), d'après les données RNA-Seq de Perroud *et al.* (2018).

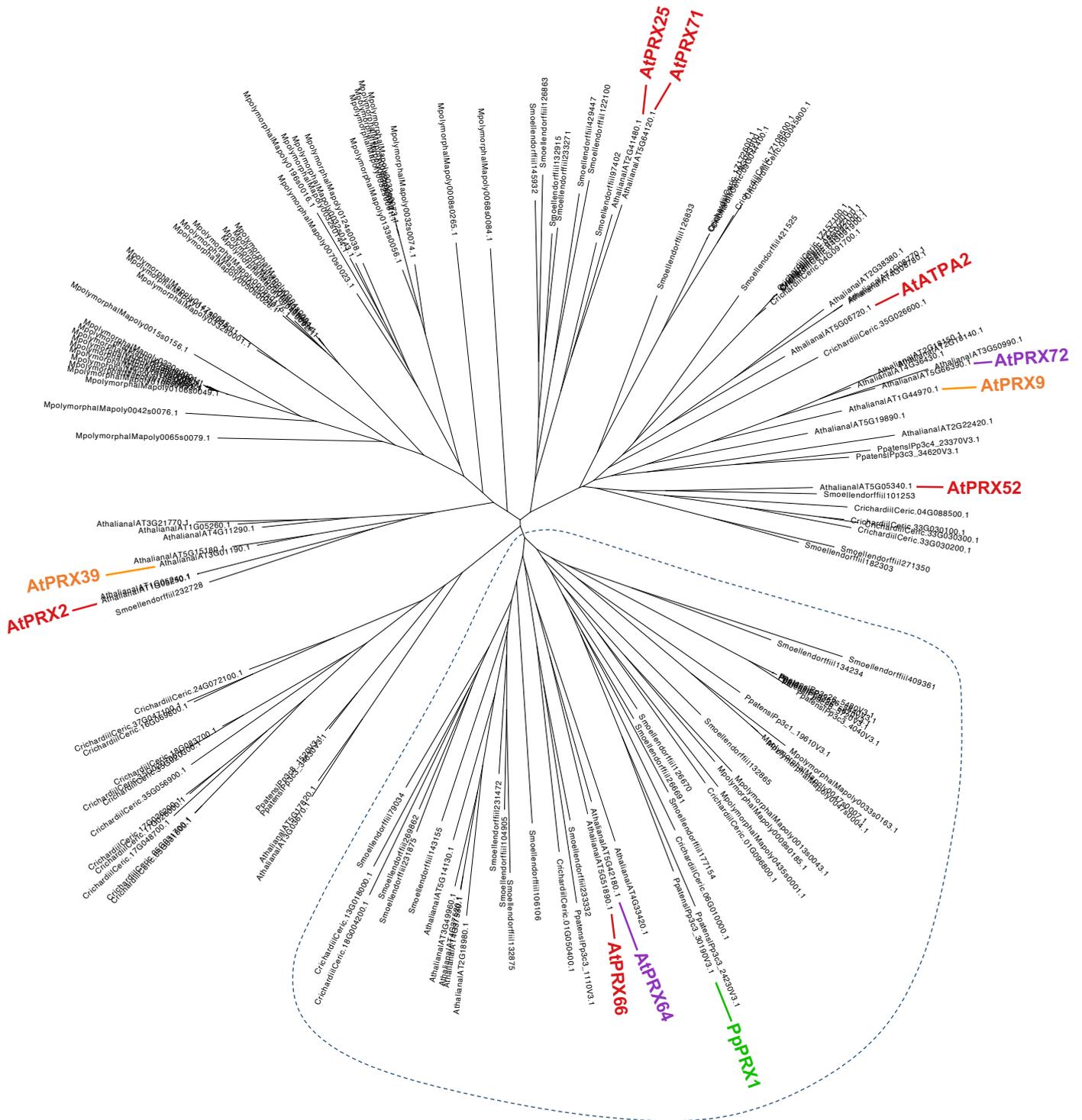


Figure 33 : Histoire évolutive des peroxydases associées à la lignification.

L'arbre phylogénétique non enraciné a été obtenu à partir d'un alignement de séquences nucléotidiques de peroxydases de classe III homologues à AtPRX64 (BLASTp E-value < E-70), recherchées dans les génomes d'espèces représentatives des embryophytes : *P. Patens*, *M. polymorpha*, *S. moellendorffii*, *C. richardii* et *A. thaliana*. Les peroxydases de *A. thaliana* associées à la lignification des tissus conducteurs (rouge), du cadre de Caspary (orange), ou des deux (violet) sont dispersées au sein de l'arbre phylogénétique obtenu. PpPRX1 (vert) se situe dans un clade commun avec AtPRX64, qui est la principale peroxydase associée à la lignification du cadre de Caspary.

péroxydases co-exprimées avec PpPRX1 – PpPRX2 et PpPRX3 – n’ont pas été identifiées dans les séquences homologues à AtPRX64 avec le seuil de similarité utilisé. D’autre part, PpPRX1 est la séquence la plus proche chez *P. patens* de AtPRX64 (premier résultat de BLASTp ; E-value = $2,36e^{-84}$; 44% d’identité de séquence), confirmant une homologie des deux protéines.

Les ROS jouent un rôle dans le développement des bryophytes

L’activité des peroxydases est liée à la génération et/ou à la métabolisation de ROS. Notamment, l’H₂O₂ est le substrat ou le co-substrat des peroxydases, selon leur cycle hydroxylytique ou peroxydatif, respectivement (Passardi *et al.*, 2005). Le rôle des ROS et des peroxydases peut ainsi être étudié en interférant avec les enzymes responsables de la génération de l’H₂O₂, ou avec l’activité des peroxydases directement. Ainsi, avant l’utilisation d’outils génétiques, la génération de l’H₂O₂ et son utilisation par des peroxydases pour la lignification du cadre de Caspary a d’abord été mis en évidence par plusieurs inhibiteurs chimiques (Lee *et al.*, 2013). Le diphenyleneiodonium (DPI) et l’acide diethyldithiocarbamique (DDC) sont des inhibiteurs des NADPH oxydases et des SODs, respectivement, responsables de la génération de l’H₂O₂ apoplastique ; l’acide salicylhydroxamique (SHAM) est quant à lui un inhibiteur des peroxydases (fig. 34A). Ces inhibiteurs ont cependant l’inconvénient de ne pas être spécifiques de ces cibles et d’être cytotoxiques. Leur utilisation pour l’étude de la formation du cadre de Caspary a donc nécessité d’identifier des concentrations appropriées lors de traitements courts, pour observer l’impact sur la formation du cadre de Caspary dans les cellules néoformées lors du traitement (Lee *et al.*, 2013). Une telle démarche est difficilement concevable pour observer l’effet de ces inhibiteurs à l’échelle tissulaire sur la synthèse de la cuticule, car un traitement court serait insuffisant à la formation de nouveaux tissus, alors qu’un traitement long serait létal. Une méthode indirecte pour inhiber l’activité des peroxydases est de piéger leur substrat ou co-substrat en utilisant l’iodure de potassium (KI), qui a la propriété de chélater l’H₂O₂, et qui présente l’avantage d’avoir une toxicité moindre, et donc de pouvoir être utilisé pour des traitements longs (fig. 34A ; Lee *et al.*, 2013). Pour explorer l’hypothèse du rôle d’une activité peroxydase dans la biosynthèse de la cutine de *P. patens*, des plantes WT ont donc été cultivées en présence de KI à diverses concentrations. Le traitement a un effet sur le développement des gamétophores, dont la sévérité croît avec la concentration utilisée (fig. 34B). Les phyllides des gamétophores sont plus petites, moins larges, et plus rapprochées de la tige. Plus l’émergence et la croissance des gamétophores sont inhibées, plus la croissance du protonema est importante. L’impermeabilité des gamétophores a ensuite été évaluée par le test de coloration au TB. La pénétration du colorant dans les tissus est visible en présence de KI à 500 et 1000 μ M

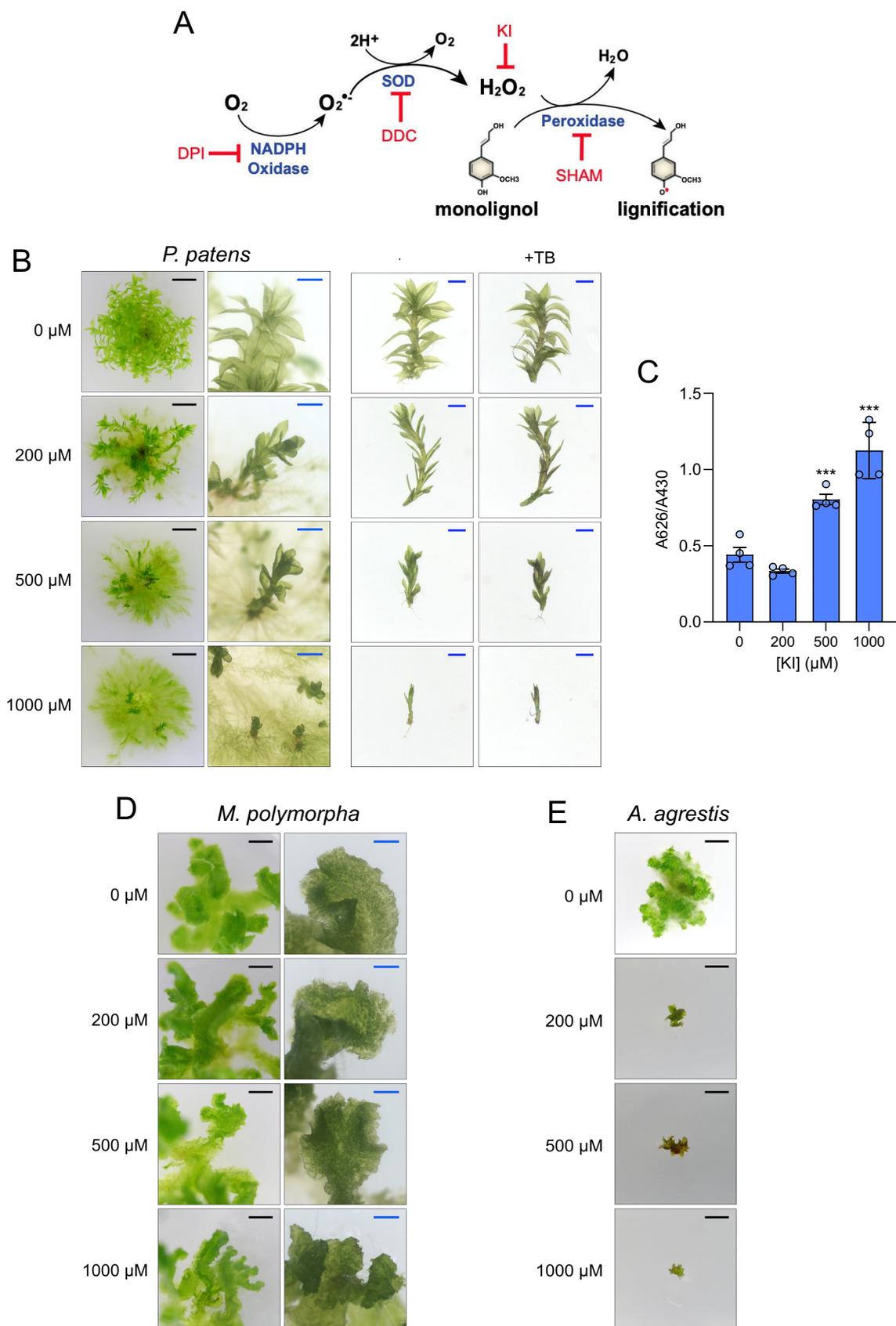


Figure 34 : Rôle de l' H_2O_2 dans le développement des bryophytes.

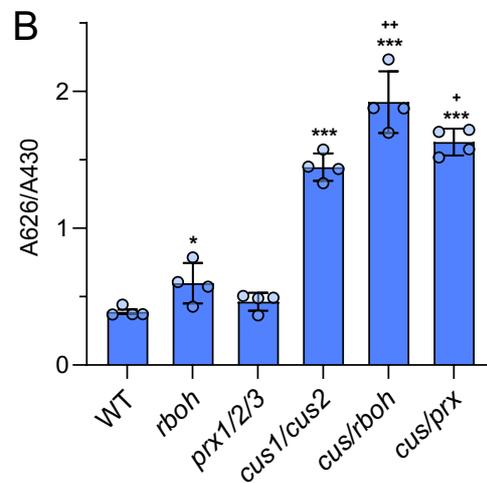
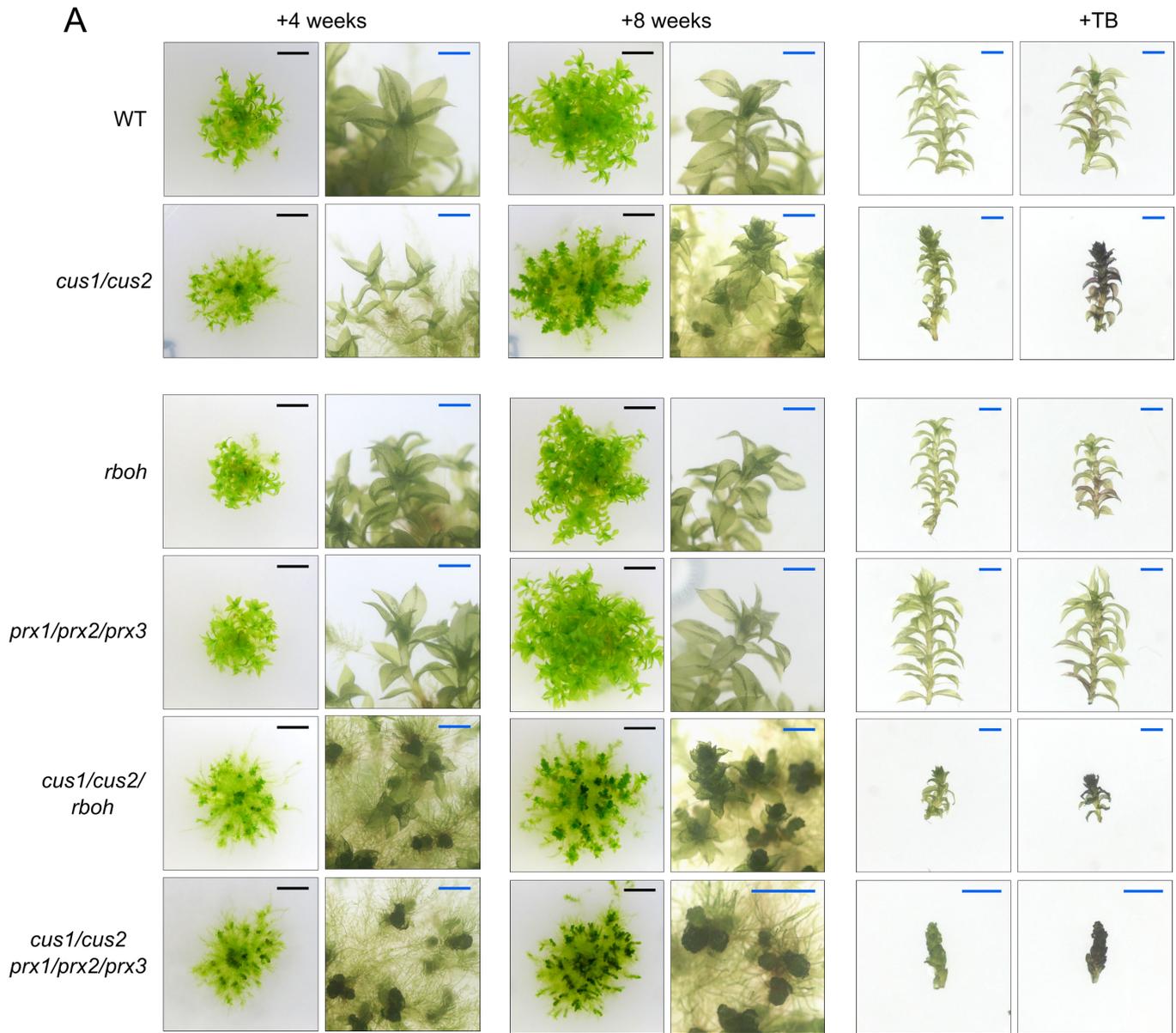
A : Plusieurs inhibiteurs chimiques peuvent être utilisés pour étudier les protéines nécessaires à la production d' H_2O_2 apoplastique et à la polymérisation des monolignols. En particulier, l'iodure de potassium (KI) a la propriété de chélater l' H_2O_2 , et donc d'inhiber l'activité des peroxydases en les privant de leur co-substrat. DPI : diphenyleneiodonium ; DDC : l'acide diethyldithiocarbamique ; SHAM : acide salicylhydroxamique. D'après Lee *et al.* (2013). **B** : Phénotypes des colonies et gamétophores de *P. patens* cultivés en présence de plusieurs concentrations de KI. L'impact du KI sur la perméabilité des gamétophores a été évalué par un test au bleu de toluidine (TB). **C** : Niveau de perméabilité des gamétophores mesuré par le ratio d'absorbance A626/A430 après coloration au TB. **D** : Impact du KI sur le développement de *M. polymorpha*. **E** : Impact du KI sur le développement de *A. agrestis*. Échelles : noire 5 mm ; bleue 1 mm. Les données représentent la moyenne de quatre répliques biologiques \pm l'erreur standard. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

(fig. 34B). La quantification du niveau de pénétration du TB montre en effet qu'à ces concentrations, les gamétophores sont significativement plus perméables qu'en condition témoin (fig. 34C). Le phénotype provoqué par la présence de KI, notamment à 1000 μM , rappelle les phénotypes forts observés dans plusieurs mutants KO affectés dans la voie des phénylpropanoïdes (*cyp98*, *cyp73a48/a49*, *hct*, *fht*; fig. 10, 14 et 20): inhibition du développement des gamétophores, forte croissance du protonema, perméabilité des organes aériens. Cette approche pharmacologique peut donc suggérer un rôle de l' H_2O_2 dans la biosynthèse de cutine et le développement de *P. patens*, possiblement en tant que co-substrat d'enzymes peroxydases. Toutefois, les fonctions de l' H_2O_2 et des ROS en général sont complexes et variées, et le KI peut potentiellement interférer avec d'autres cibles. L'hypothèse d'une participation d'enzymes peroxydases à la biosynthèse de cutine reste donc à approfondir. Afin d'appréhender le rôle de l'activité des peroxydases sur le développement des bryophytes en général, la même expérience a été conduite avec *M. polymorpha* et *A. agrestis*. La présence de KI a un impact modéré sur le développement du thalle de *M. polymorpha*, proportionné à la concentration utilisée : les thalles sont plus petits, moins larges, avec une marge davantage échanquée (fig. 34D). Chez *A. agrestis*, le KI a un effet quasi-létal dès 200 μM , provoquant l'inhibition de la croissance du thalle (fig. 34E). L'utilisation du KI comme agent piègeur de l' H_2O_2 suggère donc un rôle des ROS dans le développement des organes aériens des bryophytes, contrasté selon l'espèce considérée. L'impact du KI est similaire à l'altération de la voie des phénylpropanoïdes, nécessaire à la synthèse de précurseurs de la cutine et au développement des bryophytes. Ces résultats sont conciliables avec l'hypothèse d'un rôle des peroxydases dans la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, bien que d'autres interprétations soient possibles. Cette hypothèse a donc été approfondie de manière fonctionnelle chez *P. patens*.

La déficience de *PRX1/2/3* inhibe le développement de *P. patens* dans un fond génétique *cus1/cus2*

Les données phylogénétiques et transcriptomiques amènent à l'hypothèse d'une implication de peroxydases dans la polymérisation, ou la synthèse au sens large, de la cutine de *P. patens*, selon un mécanisme analogue à celui de la voie de lignification du cadre de Caspary. Pour investiguer cette hypothèse, de multiples mutants KO ont été générés par CRISPR/Cas9, en ciblant des gènes du cluster de co-expression identifié. La présence de trois peroxydases – *PpPRX1*, *PpPRX2* et *PpPRX3* – dans le réseau de co-expression suggère une potentielle redondance fonctionnelle des trois gènes ; un mutant triple KO *prx1/prx2/prx3* a donc

directement été généré afin d'abolir l'ensemble de l'activité peroxydase de ce réseau. La co-expression de ces trois peroxydases avec *PpRBOH* suggère un lien entre ces acteurs, potentiellement via la génération localisée d' H_2O_2 , nécessaire à l'activité des peroxydases. Ce scénario a donc aussi été étudié par l'obtention d'un mutant simple KO *rboh*. La polymérisation de la cutine de *P. patens* a d'abord été étudiée par le prisme des protéines CUSs, dont l'activité participe à la polymérisation du polymère de manière non exhaustive. Pour étudier une potentielle connexion des deux voies étudiées, les mutants *prx1/prx2/prx3* et *rboh* ont donc été générés à partir d'un fond génétique WT, ou du mutant double KO *cus1/cus2*. Un mutant triple KO *cus1/cus2/rboh* (abrégé *cus/rboh*) et un mutant quintuple KO *cus1/cus2/prx1/prx2/prx3* (abrégé *cus/prx*) ont ainsi été obtenus. Pour chaque mutant généré, quatre lignées génétiquement indépendantes ont été obtenues. Les phénotypes de ces lignées ont été comparés aux phénotypes de plantes WT et *cus1/cus2*, les deux fonds génétiques témoin utilisés. A l'échelle macroscopique, aucune différence sur le développement des colonies et des gamétophores n'est remarquable entre les lignées *rboh* et *prx1/prx2/prx3* par rapport aux plantes WT (fig. 35A). En comparaison au mutant *cus1/cus2*, le développement des gamétophores est davantage altéré chez le mutant *cus/rboh*. Dès quatre semaines, certains gamétophores présentent déjà une fusion d'organe. De manière surprenante, ce phénotype est hétérogène au sein d'une même colonie : certains gamétophores ont simplement une croissance ralentie par rapport au WT, comme le mutant *cus1/cus2*, alors que d'autres gamétophores ont le phénotype fort de fusion d'organe (fig. 35A). Après huit semaines, les gamétophores d'une même colonie présentent un phénotype plus homogène. Ce phénotype est similaire à celui du mutant *cus1/cus2*, avec une intensité plus forte : les gamétophores sont plus petits, les phyllides sont plus petites et plus déformées, et la fusion d'organe est plus marquée (fig. 35A). En comparaison aux mutants *cus1/cus2* et *cus/rboh*, le développement des gamétophores est nettement plus altéré chez le mutant *cus/prx* : la fusion d'organe est si forte que presque aucune phyllide ne se distingue réellement, et la croissance des gamétophores est rapidement inhibée après l'émergence des organes depuis le protonema (fig. 35A). Ce phénotype rappelle une nouvelle fois le phénotype observé dans les mutants affectés dans la voie des phénylpropanoïdes, bien que le nombre de gamétophores par colonie semble plus important, et leur croissance légèrement moins inhibée (fig. 14, 20 et 35A). Le niveau de perméabilité des gamétophores des différents mutants obtenus a ensuite été évalué par une coloration au TB. Aucune coloration nette des gamétophores n'est observée pour les mutants *rboh* et *prx1/prx2/prx3*. En revanche, tout comme le mutant *cus1/cus2*, les gamétophores des mutants *cus/rboh* et *cus/prx* sont nettement perméables au TB (fig. 35A). La quantification du niveau



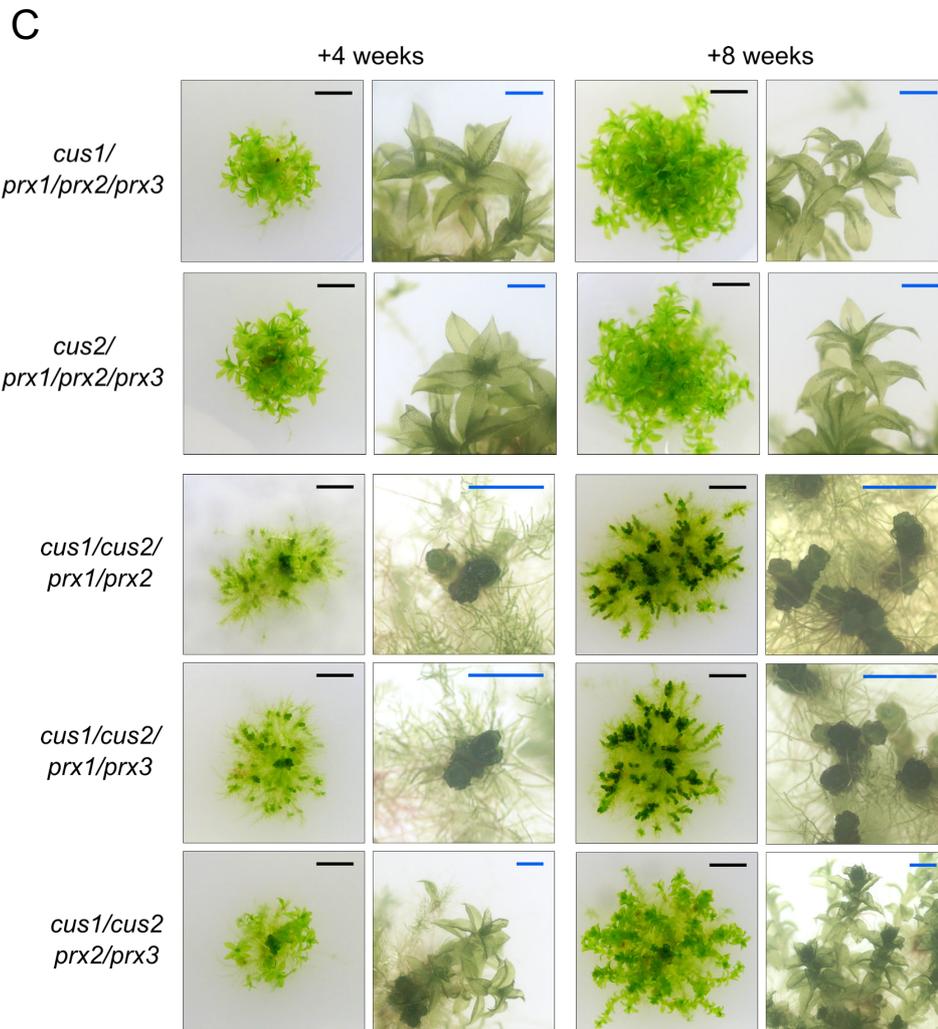


Figure 35 : Investigation de la fonction biologique de PpRBOH et de PpPRX1/2/3

A : Phénotypes des colonies et gamétophores des lignées sauvages et mutantes, quatre et huit semaines après repiquage. Les fonctions du gène *PpRBOH* et des gènes *PpPRX1/2/3* ont été investiguées par la production de mutants KO dans un fond génétique WT ou *cus1/cus2*. Le niveau de perméabilité des gamétophores des mutants a été évalué par coloration au bleu de toluidine (TB). **B** : Niveau de perméabilité des gamétophores mesuré par le ratio d'absorbance A626/A430 après coloration au TB. **C** : A des fins de comparaison avec le mutant quintuple KO *cus1/cus2/prx1/prx2/prx3*, des lignées quadruple KO ont été obtenues pour appréhender la potentielle redondance fonctionnelle des deux gènes *CUS* et des trois gènes *PRX*. Échelles : noire 5 mm ; bleue 1 mm. Les données représentent la moyenne de quatre lignées indépendantes \pm l'erreur standard. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001. P-value ajustée du t-test *cus1/cus2* versus *cus/rboh* ou *cus/prx* : * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001.

de pénétration du TB montre effectivement que les gamétophores des lignées *cus1/cus2*, *cus/rboh* et *cus/prx* sont entre trois et quatre fois plus perméables que les gamétophores WT, alors que ce niveau de perméabilité est légèrement supérieur pour le mutant *rboh*, et similaire pour le mutant *prx1/prx2/prx3*, en comparaison au WT (fig. 35B). Par ailleurs, les niveaux de perméabilité des gamétophores des mutants *cus/rboh* et *cus/prx* sont aussi significativement supérieurs en comparaison avec le mutant *cus1/cus2*, utilisé comme fond génétique pour leur obtention (fig. 35B). La caractérisation de ces quatre nouveaux mutants montre qu'altérer la voie peroxydase étudiée a un impact sur le développement de *P. patens*, uniquement dans un fond génétique *cus1/cus2* à l'échelle macroscopique. Cet impact est prononcé pour le mutant quintuple KO *cus1/cus2/prx1/prx2/prx3*, dont le phénotype fort rappelle d'autres mutants impactés dans des étapes cruciales de la biosynthèse de cutine. Pour savoir si la mutation des cinq gènes est nécessaire à l'obtention d'un tel phénotype, d'autres lignées ont été générées, en ciblant qu'une partie des gènes de la famille *CUS* ou de la famille *PRX*. Les mutants quadruple KO *cus1/prx1/prx2/prx3* et *cus2/prx1/prx2/prx3* ont un phénotype WT, montrant la nécessité de muter les deux gènes *PpCUSs* pour obtenir le phénotype du mutant *cus/prx* (fig. 35C). En revanche, parmi les trois mutants quadruple KO *cus1/cus2/prx1/prx2*, *cus1/cus2/prx1/prx3* et *cus1/cus2/prx2/prx3*, seuls les deux premiers mutants ont le même phénotype fort que le mutant quintuple KO *cus/prx*, alors que le dernier a un phénotype *cus1/cus2* (fig. 35C). Ces différentes combinaisons suggèrent qu'en association avec *PpCUS1* et *PpCUS2*, seule la mutation de *PpPRX1* est nécessaire à l'obtention du phénotype *cus/prx*. Ces résultats peuvent être mis en perspective avec le fait que *PpPRX1* soit l'homologue de *P. patens* le plus proche de *AtPRX64*, alors que *PpPRX2* et *PpPRX3* n'ont pas été identifiés comme tels lors de l'analyse phylogénétique présentée fig. 33. Il existerait donc une redondance fonctionnelle entre *PpCUS1* et *PpCUS2*, mais pas entre *PpPRX1*, *PpPRX2* et *PpPRX3*, bien que ces trois gènes soient co-exprimés. Cette hypothèse nécessiterait toutefois une confirmation par l'obtention d'un mutant triple KO *cus1/cus2/prx1*. Aussi, la ressemblance des phénotypes *cus/prx*, *cus1/cus2/prx1/prx2* et *cus1/cus2/prx1/prx3*, et des phénotypes *cus1/cus2* et *cus1/cus2/prx2/prx3* n'est que macroscopique, et des différences moins évidentes et/ou à des échelles microscopiques ou moléculaires peuvent exister. Trois lignées génétiquement indépendantes ont été générés pour l'obtention de ces cinq mutants quadruple KO, qui présentent toutes le même phénotype macroscopique (annexe 1). Ces résultats ont été obtenus après la caractérisation du mutant quintuple KO *cus/prx*. Bien qu'il serait pertinent d'obtenir et de caractériser un mutant *cus1/cus2/prx1*, le mutant *cus/prx* a été retenu pour sa caractérisation plus approfondie et l'étude du rôle des peroxydases. S'il existe une légère redondance fonctionnelle entre les trois

péroxydases étudiées, ce mutant permet en première approche d'étudier cette voie dans son exhaustivité.

La synthèse de cutine est plus affectée dans le mutant *cus/prx* que dans le mutant *cus1/cus2*

Pour étudier le rôle potentiel des peroxydases et du réseau de gènes associés dans la synthèse de la cutine, la composition de la cutine et la structure de la cuticule des mutants obtenus ont été analysées. Pour étudier l'interaction éventuelle d'une telle voie avec la voie CUS, les résultats ont été comparés avec les génotypes WT et *cus1/cus2*. L'analyse de la cutine en GC-TOFMS montre que la composition en monomères de la cutine des mutants *rboh* et *prx1/prx2/prx3* est similaire à la cutine de plantes WT (fig. 36A). Par conséquent, ni la quantité totale de cutine, la proportion relative des différents types de monomères, ni la proportion de fonctions hydroxyles libres (mesurée par le ratio OH/COOH) de ces deux mutants ne sont significativement différentes du WT (fig. 36B, 36C et 36D). A l'inverse, la composition de la cutine des mutants *cus/rboh* et *cus/prx* est nettement différente de la cutine des plantes WT. Comme pour le mutant *cus1/cus2*, la teneur en glycérol est plus de deux fois supérieure, et les teneurs en monomères aliphatiques majoritaires (C16:0, C18:0, diOH-C16 et triOH-C18) sont inférieures par rapport au WT (fig. 36A). Par rapport au mutant *cus1/cus2*, la composition de la cutine du mutant *cus/rboh* n'est pas significativement différente. En revanche, la cutine du mutant *cus/prx* contient des teneurs inférieures en monomères aliphatiques (C16:0, C18:0, C18:2, diOH-C16 et triOH-C18). Les teneurs en monomères phénoliques sont aussi inférieures que dans le mutant *cus1/cus2*, notamment pour le *p*-coumarate dont la teneur devient similaire à celle du WT (fig. 36A). Ces différences se traduisent par une quantité totale de cutine plus faible dans les mutants *cus1/cus2*, *cus/rboh* et *cus/prx* par rapport au WT. Toujours en comparaison au mutant *cus1/cus2*, la quantité totale de cutine est inférieure seulement pour le mutant *cus/prx* (fig. 36B). La proportion relative des types de monomères est également altérée chez ces trois mutants par rapport au WT, sans différence entre *cus1/cus2* et *cus/rboh*, mais avec une diminution de la proportion en monomères aliphatiques hydroxylés dans le mutant *cus/prx* par rapport à *cus1/cus2* (fig. 36C). Le ratio OH/COOH calculé d'après la composition du polymère est également significativement supérieur pour la cutine de ces trois mutants, témoignant d'une plus grande proportion théorique de fonctions hydroxyles libres, sans différence significative entre *cus/rboh* et *cus/prx* par rapport à *cus1/cus2* (fig. 36D). A partir d'un fond génétique *cus1/cus2*, l'abolition de l'activité PpRBOH n'a donc pas d'incidence évidente sur la composition de la cutine, alors que l'abolition de l'activité PpPRX1/2/3 diminue

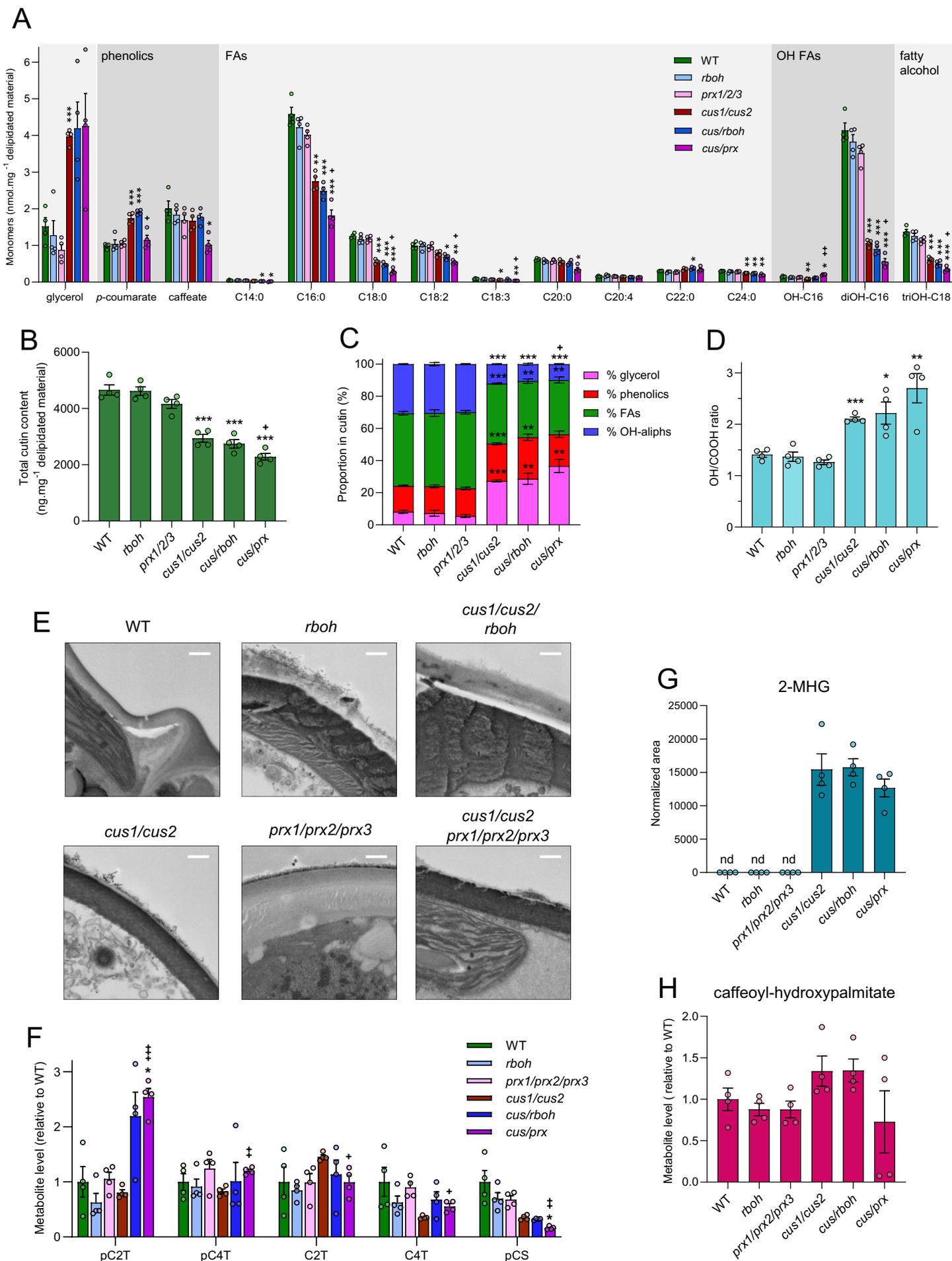


Figure 36 : Analyse de la cutine, de la cuticule et profilage métabolique des mutants affectés dans la voie peroxydase.

A : Composition du polymère cuticulaire des plantes WT et mutantes, établi par GC-TOFMS après purification et dépolymérisation de la cutine. **B** : Quantité totale de cutine des plantes WT et mutantes.

C : Proportion relative des types de monomères de la cutine des plantes WT et mutantes. **D** : Proportion des fonctions hydroxyles libres (ratio OH/COOH) dans la cutine des plantes WT et mutantes. **E** : Structure de la cuticule observée par microscopie électronique à balayage sur des coupes transversales de phyllides de plantes WT et mutantes. Échelle : 1 µm. **F** : Teneurs relatives en esters phénoliques solubles de thréonate et de shikimate, mesurées par UHPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et mutantes. p2CT : *p*-coumaroyl-2-thréonate ; p4CT : *p*-coumaroyl-4-thréonate ; C2T : caféoyl-2-thréonate ; C4T : caféoyl-4-thréonate ; pCS : *p*-coumaroyl-shikimate. **G** et **H** : Teneurs relatives en caféoyl-hydroxypalmitate mesurées par UHPLC-MS/MS dans des extraits métaboliques de gamétophores issus de plantes WT et mutantes. Les données des figures B, C et D ont été calculées d'après la composition de la cutine mesurée en GC-TOFMS. Les données représentent la moyenne de quatre lignées indépendantes ± l'erreur standard. P-value ajustée du t-test WT versus mutant : * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001. P-value ajustée du t-test *cus1/cus2* versus *cus/rboh* ou *cus/prx* : * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001.

les teneurs en monomères phénoliques et aliphatiques, accentuant l'impact global sur le polymère.

Pour observer l'impact du changement de composition de la cutine, ou de modifications de la structure du polymère non identifiables dans nos conditions analytiques, sur la structure globale de la cuticule, la cuticule des gamétophores des mutants caractérisés a été observée sur des coupes de phyllides par microscopie électronique à balayage. Tout comme pour le mutant *cus1/cus2*, la structure de la cuticule au-delà de la paroi cellulaire est altérée chez l'ensemble des mutants analysés par rapport à la cuticule des gamétophores WT (fig. 36E). La résolution des images obtenues ne permet cependant toujours pas d'identifier les différentes couches caractéristiques de la cuticule, et d'interpréter davantage ces résultats. Il est néanmoins intéressant d'observer que la structure de la cuticule semble être impactée dans les mutants *rboh* et *prx1/prx2/prx3*, alors qu'aucun défaut de cuticule manifeste n'a été observé chez ces mutants. Il est donc possible que l'altération d'une voie peroxydase dans ces mutants impacte la synthèse du polymère ou son interaction avec la paroi, sans que cela ne soit détectable par analyse compositionnelle, ni n'entraîne de conséquence physiologique forte. Une observation plus précise et reproductible de la cuticule de ces mutants par microscopie électronique reste à réaliser pour approfondir ces résultats.

Parallèlement à l'analyse chimique de la cutine, le profil métabolique en composés phénoliques solubles des mutants étudiés a été caractérisé par UHPLC-MS/MS. Les esters phénoliques de thréonate caractéristiques de *P. patens* (Renault *et al.*, 2017a) et le *p*-coumaroyl-shikimate – un intermédiaire essentiel de la voie des phénylpropanoïdes (fig. 11) – ont été recherchés et dosés dans des extraits métaboliques de gamétophores (fig. 36F). Les seules différences significatives observées par rapport au profil de plantes WT sont une teneur plus élevée en *p*-coumaroyl-2-thréonate et plus faible en *p*-coumaroyl-shikimate dans les extraits du mutant *cus/prx*. Par rapport au mutant *cus1/cus2*, les teneurs en *p*-coumaroyl-2-thréonate et *p*-coumaroyl-4-thréonate sont supérieures dans les extraits du mutant *cus/prx* tandis que les teneurs en caféoyl-4-thréonate et *p*-coumaroyl-shikimate sont plus faibles (fig. 36F). La grande variabilité biologique et/ou analytique ne permet pas de révéler d'autres différences

significatives. Le 2-MHG, le substrat des protéines CUSs, dont l'accumulation a déjà été détectée dans le mutant *cus1/cus2* (fig. 28B), a aussi été quantifié dans les extraits de gamétophores de ces nouveaux mutants. Le 2-MHG n'est pas détecté dans les extraits des mutants *rboh* et *prx1/prx2/prx3*, mais s'accumule dans les mutants *cus/rboh* et *cus/prx*, à des niveaux similaires au témoin *cus1/cus2* (fig. 36G). D'autre part, le produit enzymatique de PpFHT, le caféoyl-hydroxypalmitate a aussi été quantifié. Le fait que PpFHT soit co-exprimée avec PpPRX1/2/3, et la nature phénolique du caféoyl-hydroxypalmitate, suggèrent ensemble que cette molécule puisse être le substrat biologique des peroxydases. Aucune accumulation ou différence significative de la teneur en caféoyl-hydroxypalmitate n'est cependant observée entre les différents génotypes (fig. 36H).

Discussion

Une activité peroxydase est nécessaire à la synthèse de la cutine de *P. patens*

Le rôle d'une activité peroxydase dans la synthèse de la cutine de *P. patens*, ou plus largement dans le développement des bryophytes, a été suggéré par l'utilisation du KI en tant que chélateur de l'H₂O₂. La caractérisation des différents mutants générés a effectivement mis en avant le rôle de peroxydases dans le développement de *P. patens*, et à priori via la synthèse de cutine, en association avec l'activité CUS. Il n'existe toutefois pas de redondance fonctionnelle ou d'effet additif entre les deux voies étudiées, puisque les mutants *rboh* et *prx1/prx2/prx3* ne présentent aucun phénotype particulier. L'inactivation des gènes PpRBOH ou PpPRX1/PRX2/PRX3 n'a d'effet que dans un fond génétique *cus1/cus2*. Ce cas de figure s'apparente donc à de l'épistasie négative, car l'inactivation des gènes PpCUS1/2 conditionne l'effet de l'inactivation des gènes PpPRX1/2/3, et la réunion des deux types de mutation a un effet supérieur à la somme des deux phénotypes individuels. La relation épistatique des deux types de gènes suggérerait alors que l'action de PRX1/2/3 serait ultérieure à celle de CUS1/2 (de Visser *et al.*, 2011). Au vu des activités biochimiques de leurs familles enzymatiques respectives, les protéines CUSs et PRXs ne peuvent à priori pas avoir la même activité et la même fonction (Ding *et al.*, 2019 ; Cosio et Dunand, 2009). La raison pour laquelle la mutation des trois gènes PpPRXs ou la mutation de PpRBOH provoque un phénotype uniquement dans un fond génétique *cus1/cus2* reste donc inexplicable pour le moment. Les résultats obtenus permettent tout de même d'imaginer une explication. L'activité des peroxydases dépend plus de leur localisation subcellulaire et de la présence simultanée de leurs substrats et co-substrat, que de leur activité enzymatique intrinsèque (Cosio et Dunand, 2009 ; Francoz *et al.*, 2019).

Les phyllides constituant un environnement tissulaire peu complexe, avec une couche cellulaire unique, il est possible que d'autres protéines RBOH et PRX, absentes du cluster de co-expression identifié, maintiennent une production d' H_2O_2 apoplastique et une activité peroxydase identique au lieu de biosynthèse de cutine. Ces activités résiduelles, ou compensatoires, ne seraient alors pas suffisantes pour maintenir cette voie dans un fond génétique *cus1/cus2*. Le traitement au KI permet en revanche d'abolir à priori toute activité peroxydase. Selon cette hypothèse, le phénotype des plantes cultivées en présence de KI à 1 mM serait davantage représentatif d'une altération totale des peroxydases, dont l'activité est cruciale pour la synthèse de cutine et le développement. L'activité et le rôle précis des peroxydases étudiées, notamment PRX1, restent donc à éclaircir. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées d'après les résultats obtenus et la littérature. Par rapport au mutant *cus1/cus2*, le développement du mutant *cus/prx* est davantage affecté, dont les gamétophores possèdent une moindre teneur en cutine, avec une moindre proportion en monomères phénoliques. L'hypothèse initiale était une implication des peroxydases dans la polymérisation de la cutine. Les analyses de cutine peuvent alors suggérer que les peroxydases sont responsables d'une partie de la polymérisation des monomères phénoliques, alors que les CUS polymérisent une partie des monomères aliphatiques. Cependant, à l'inverse des CUSs, les peroxydases ne catalysent à priori pas la formation de liaisons ester, mais de liaisons chimiques plus récalcitrantes de type éther, qui ne seraient pas clivées lors de dépolymérisation chimique de la cutine pour analyser sa composition (Vanholme *et al.*, 2010). Si les peroxydases étudiées ont effectivement une activité polymérase, elles seraient alors davantage responsables de la formation d'un polymère autre que la cutine, dont la nature serait différente d'un polyester, et dont l'existence est encore inconnue. Alternativement, l'activité des peroxydases peut ne pas être reliée à la polymérisation de la cutine elle-même, mais à son interaction chimique avec la paroi. Chez les plantes vasculaires, des peroxydases apoplastiques forment effectivement des liaisons covalentes entre les polysaccharides et des acides hydroxycinnamiques, des monolignols ou des polymères de lignine (Ralph *et al.*, 2004 ; Ralph, 2010 ; Passardi *et al.*, 2004). De la même manière, les acides hydroxycinnamiques de la cutine de *P. patens* pourraient alors être liés chimiquement aux polysaccharides et ancrer la cutine dans la paroi. Enfin, nous ne pouvons pas exclure que l'activité des peroxydases étudiées soit indépendante de la cutine, mais soit par exemple reliée aux propriétés physico-chimiques de la paroi. La famille des peroxydases de classe III est en effet connue pour ses rôles variés dans le relâchement ou le renforcement de la paroi, lors de processus développementaux précis. Lors de la croissance des gamétophores et de la néosynthèse de cuticule, l'élongation cellulaire pourrait nécessiter une

dégradation des polysaccharides par des ROS générés via le cycle hydroxylytique de peroxydases, tel qu'il a déjà été démontré (Passardi *et al.*, 2004). Toutefois, la co-expression de *PpRBOH* et des trois gènes *PpPRXs* avec *PpFHT* suggère davantage une fonction de cette voie liée à la synthèse de cutine. Le rôle des peroxydases de classe III dans la polymérisation de la lignine, de la subérine et de sporopollénine a déjà été démontré ou suggéré (Vanholme *et al.*, 2010 ; Rabbi, 2020). L'hypothèse explorée ici d'une fonction de cette famille dans la synthèse ou la polymérisation de la cutine des bryophytes, apporte un éclairage sur l'origine des polymères apoplastiques hydrophobes, en lien avec les ROS et le stress oxydatif.

Une concomitance de la terrestrialisation, du stress oxydatif et des barrières apoplastiques

La colonisation des espaces terrestres par les plantes s'est accompagnée de leur exposition accrue au rayonnement UV et à l'intensité lumineuse, qui a engendré un stress oxydatif inédit. Une quantité basale de ROS est produite dans les cellules, en tant que sous-produit de voies métaboliques ou via la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries. Des mécanismes de piégeage et de détoxification des ROS existent, qui reposent sur de nombreuses molécules (e.g. ascorbate, glutathion) et enzymes (e.g. ascorbate peroxydase, glutathion peroxydase ; Mittler *et al.*, 2004). L'exposition des plantes à un rayonnement lumineux plus intense sur les milieux terrestres qu'aquatiques, a augmenté considérablement la génération de ROS, notamment via la réaction de Melher dans les chloroplastes, et lors de conditions limitantes pour l'activité photosynthétique (Badger *et al.*, 2000). De nouvelles adaptations ont donc été nécessaires pour contrôler ce stress oxydatif et protéger les cellules de la toxicité des ROS (de Vries et Archibald, 2018). Dixon et Barros (2019) avancent de fait que lors de l'adaptation des plantes aux milieux terrestres, la nécessité d'une protection contre la production importante de ROS a précédé la nécessité de former des barrières apoplastiques. Les auteurs soulignent que dans la voie de biosynthèse des monolignols, trois enzymes proviennent d'une néofonctionnalisation de gènes de détoxification des ROS : APX/C3H, CSE et CCR (fig. 11). Aucun homologue de ces trois gènes n'est retrouvé dans les génomes d'espèces charophytes ou chlorophytes, ce qui place leur origine chez l'ancêtre commun des embryophytes (de Vries *et al.*, 2017 ; Renault *et al.*, 2019). De même, si la fonction originelle des peroxydases est de détoxifier l' H_2O_2 , leur activité dans la polymérisation des monolignols constitue également une néofonctionnalisation. La voie de biosynthèse de la lignine serait donc apparue à la suite de l'acquisition de caractères de lutte contre le stress oxydatif (Weng et Chapple, 2011 ; Dixon et Barros, 2019). D'autre part, la mesure de l'activité enzymatique

péroxydase, évaluée à partir d'un substrat modèle sur des extraits protéiques totaux, montre que cette activité est près de 1000 fois supérieure chez les embryophytes que chez des espèces charophytes ou chlorophytes (Mbadinda Mbadinda *et al.*, 2020). Plusieurs auteurs proposent ainsi que les ROS ont d'abord dû être neutralisés par l'acquisition d'un système antioxydant efficace, puis ont pu être utilisés au sein d'autres caractères adaptatifs (Dixon et Barros, 2019 ; Weng et Chapple, 2011 ; Fujita *et al.*, 2020). Chez les plantes vasculaires, l'utilisation de l' H_2O_2 par les peroxydases lors de la polymérisation de la lignine en est un exemple. A ce titre, l'observation par microscopie électronique de l'accumulation apoplastique de l' H_2O_2 dans des mutants impactés dans la formation du cadre de Caspary, montre que les peroxydases constituent un puissant puit d' H_2O_2 (Rojas-Murcia *et al.*, 2020 ; Fujita *et al.*, 2020). Toutefois, alors que la lignine est apparue chez les plantes vasculaires, les premières plantes terrestres et les bryophytes existantes possèdent uniquement de la cutine et de la sporopollénine (Niklas *et al.*, 2017). Chez *P. patens*, la production maîtrisée d' H_2O_2 utilisé par des peroxydases dans la synthèse de cutine, pourrait témoigner d'une adaptation dérivée des caractères acquis pour lutter contre le stress oxydatif. L'utilisation des ROS et des peroxydases dans la constitution de barrières apoplastiques pourrait donc être partagée au sein des embryophytes, et être apparue au cours de la terrestrialisation, une fois un système efficace de détoxification des ROS acquis. Un tel scénario reste à approfondir, clarifier et illustrer de manière plus précise. La découverte du rôle d'une activité peroxydase et des ROS dans le développement de *P. patens*, suggère pour l'heure un lien étroit entre l'apparition des plantes sur les milieux terrestres, l'exposition au stress oxydatif, et l'acquisition de barrières apoplastiques au cours de l'évolution.

Vers une origine commune de la voie Schengen...

L'investigation d'une voie peroxydase dans la biosynthèse de cutine chez *P. patens* a été menée d'après la connaissance de la voie Schengen qui contrôle la lignification du cadre de Caspary. Dans l'endoderme racinaire, cette voie de signalisation permet la production canalisée et contrôlée d' H_2O_2 , utilisé localement par des peroxydases. La structuration à l'échelle subcellulaire de cette voie de signalisation permet le contrôle de l'intégrité du cadre de Caspary, dont la formation cesse une fois la barrière constituée. L'identification dans *P. patens* de gènes homologues aux gènes de la voie Schengen, dans un réseau de co-expression qui inclue *PpFHT* et des peroxydases, suggère l'existence d'une voie similaire, qui contrôlerait également la production d' H_2O_2 nécessaire aux peroxydases pour la mise en place de la cutine et de la cuticule. L'existence d'une telle voie restent toutefois à prouver et à caractériser. Il est néanmoins pertinent de considérer ces résultats au regard d'autres fonctions connues de la voie

Schengen. Effectivement, une voie de signalisation analogue a aussi été caractérisée chez *A. thaliana*, lors de la mise en place de la cuticule qui sépare l'embryon de l'endosperme (Creff *et al.*, 2019 ; Doll *et al.*, 2020). Cette voie de signalisation a aussi été appelée Schengen (ou Gassho) car deux récepteurs LRR-RLK y ont une fonction redondante : le même récepteur SGN3 (ou GSO1) aussi impliqué dans la formation du cadre de Caspary, et le récepteur GSO2 (Tsuwamoto *et al.*, 2007). La reconnaissance du peptide TWS1 par GSO1 et GSO2 entraîne une cascade de signalisation via la phosphorylation d'une protéine « mitogen-activated protein kinase » (MAPK), MPK6, entraînant notamment la synthèse localisée de cutine. Le peptide TWS1 est produit dans l'embryon mais nécessite une activation dans l'endosperme par l'enzyme ALE1 avant d'être reconnu par les récepteurs GSO1 et GSO2. Une fois la couche de cuticule formée, les peptides TWS1 ne peuvent plus être activés dans l'endosperme, et la synthèse de cutine cesse (fig. 37). Dans ce contexte, la voie Schengen/Gassho permet donc aussi l'établissement localisé d'une barrière apoplastique et le contrôle de son intégrité, grâce à un dialogue bidirectionnel entre l'embryon et l'endosperme (Doll *et al.*, 2020). L'existence de ces deux voies de signalisation similaires et impliquées dans la formation de barrières apoplastiques, pose la question de leur origine, tel que discuté par Fujita *et al.* (2020) et Doll *et al.* (2020). L'activation de protéines RBOH et MAPK par des protéines LRR-RLKs est un processus répandu dans la réponse aux stress biotiques. Effectivement, des récepteurs LRR-RLKs reconnaissent des motifs moléculaires ou des peptides exogènes (PAMP pour « pathogen associated molecular pattern ») ou endogènes (DAMP pour « damaged associated molecular pattern ») libérés à la suite de l'infection par un agent pathogène ou un bioagresseur (Yamaguchi et Huffaker, 2011). La phosphorylation et l'activation de protéines RBOHs provoque la production localisée de ROS en tant que composés de défense, tandis que l'activation de protéines MAPKs déclenche des cascades de signalisation menant à la transcription de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques (Kadota *et al.*, 2014 ; Liang et Zhou, 2018). Il est alors pertinent de noter que les homologues les plus proches de SGN3/GSO1 et GSO2 sont les récepteurs PEPR1 et PEPR2, associés à la perception des DAMPs chez *A. thaliana* (Gust *et al.*, 2017 ; Krol *et al.*, 2010). D'autre part, des gènes reliés aux stress biotiques et abiotiques sont sous-régulés dans les siliques du mutant *Atgso1/gso2*, suggérant que ces récepteurs peuvent activer des voies de défense (Creff *et al.*, 2019). Dans l'endoderme racinaire, la perception des peptides CIFs par SGN3 active indirectement RBOHF, mais également une cascade signalisation dépendante de MAPKs qui mène à la transcription de gènes de biosynthèse de la lignine (Fujita *et al.*, 2020). Ainsi, Fujita *et al.* (2020) proposent que la voie Schengen provienne d'une néofonctionnalisation d'une voie de signalisation

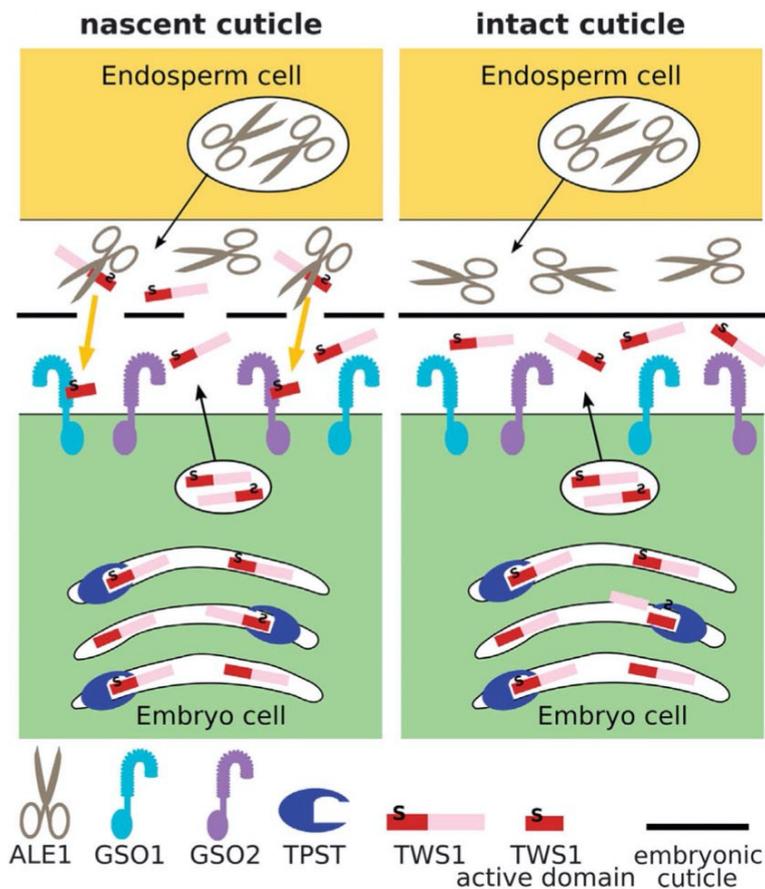


Figure 37 : Contrôle de la biosynthèse de la cuticule de l'embryon par la voie Schengen/Gassho.

Chez *A. thaliana*, l'établissement de la cuticule autour de l'embryon est contrôlé par un dialogue bidirectionnel entre l'embryon et l'endosperme. Les peptides TWS1 sont produits dans l'embryon où ils sont sulfatés par l'enzyme TPST. Tant que la cuticule autour de l'embryon est discontinue, les peptides diffusent vers l'endosperme où ils sont clivés par l'enzyme ALE1, et peuvent alors être reconnus par les récepteurs transmembranaires GSO1 et GSO2 localisés dans l'épiderme de l'embryon, ce qui active la synthèse localisée de cuticule. Une fois une couche de cuticule continue formée, la diffusion des peptides TWS1 vers l'endosperme est bloquée, ce qui arrête la voie de signalisation et la synthèse de la cuticule. D'après Doll *et al.* (2020).

associée à la perception de stress biotiques et au déclenchement de mécanismes de défense, vers l'établissement contrôlé de barrières apoplastiques indépendantes des stress. La production de ROS via des protéines RBOHs aurait été maintenue pour l'établissement du cadre de Caspary ; et l'activation d'une voie MAPK vers la transcription de gènes spécifiques a aussi été conservée. La perception de DAMPs provoquant la production de ROS et l'activation d'une voie MAPK a déjà été décrite comme un mécanisme de défense chez *P. patens*, indiquant que ce type de voie de signalisation est conservé chez les embryophytes (Bressendorff *et al.*, 2016). L'hypothèse d'une même voie de signalisation dans l'établissement de la cuticule des gamétophores de *P. patens* suggérerait alors que l'émergence d'une voie Schengen par la néofonctionnalisation d'une voie de défense, ait eu lieu chez un ancêtre commun des mousses ou des bryophytes, ou même des embryophytes. Dans ce dernier cas, l'origine commune du contrôle des barrières apoplastiques par une voie « Schengen-like » peut être concomitante à l'adaptation des plantes sur les milieux terrestres, et à l'apparition des polymères apoplastiques hydrophobes. De même que les voies de biosynthèse de la cutine et de la cuticule des premières plantes terrestres aient pu constituer un réservoir génétique pour l'apparition d'autres polymères apoplastiques spécialisés, en parallèle de la complexification de l'anatomie des plantes, la régulation des barrières apoplastiques par la voie Schengen a pu apparaître chez les premières plantes terrestres et être maintenue dans le contrôle de différentes barrières, selon des modifications *ad hoc* de la voie.

...et de la polymérisation des polymères apoplastiques ?

L'origine commune des différents polymères apoplastiques a notamment été discutée entre la cutine et la subérine (Philippe *et al.*, 2016). Effectivement, ces deux polyesters partagent une composition similaire, une voie de biosynthèse avec des gènes de mêmes familles et certaines activités enzymatiques identiques, et probablement des mécanismes de polymérisation communs (Pollard *et al.*, 2008 ; Ursache *et al.*, 2021). L'étude de la voie des phénylpropanoïdes chez les bryophytes suggère une origine commune plus large de ces polymères, cette voie métabolique conservée chez les embryophytes étant centrale dans la synthèse de la lignine des plantes vasculaires, et dans la synthèse de la cutine des plantes non vasculaires. Cette origine commune a jusqu'à présent été illustrée à travers la synthèse des monomères de ces polymères. L'identification d'une peroxydase possiblement impliquée dans la polymérisation de la cutine de *P. patens*, homologue à une peroxydase impliquée dans la polymérisation de la lignine d'*A. thaliana*, étend cette origine commune aux mécanismes de polymérisation des polymères. Si la polymérisation de la cutine des bryophytes nécessite

effectivement une activité CUS et une activité peroxydase, alors l'hypothèse d'une origine commune des différents polymères apoplastiques s'en trouverait renforcée.

Conclusions et perspectives

La recherche de nouveaux mécanismes de polymérisation de la cutine chez *P. patens* a permis de mettre en évidence un rôle des ROS dans le développement de cette espèce, et des bryophytes en général. Celui-ci semble lié à une activité peroxydase, nécessaire de pair avec l'activité CUS à la synthèse du polymère de cutine. Bien que le rôle exact de ce métabolisme des ROS et l'activité enzymatique sous-jacente des peroxydases soient encore inconnus, il semble qu'une voie de signalisation similaire à la voie Schengen puisse régir ce processus métabolique. La découverte du rôle d'une activité peroxydase dans la synthèse de la cutine d'une espèce bryophyte renforce l'idée d'une origine commune des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes. En effet, les peroxydases sont connues pour contribuer à la polymérisation de la lignine, et peut-être aussi de la subérine, des plantes vasculaires (Vanholme *et al.*, 2010 ; Bernards *et al.*, 2004). Si les peroxydases étudiées ici chez *P. patens* pour leur rôle potentiel dans la polymérisation de la cutine, et des peroxydases responsables de la lignification des plantes vasculaires, partagent une origine commune, alors les mécanismes de polymérisation des polymères apoplastiques peuvent aussi avoir une origine commune au sein des embryophytes, tel qu'il a été montré et discuté pour la famille des GDSLs et l'activité CUS. Les bryophytes se sont séparés des plantes vasculaires avant l'apparition de la lignine et de la subérine. La cutine de ces espèces peut donc être davantage représentative de celle des premières plantes terrestres, dont les voies de biosynthèse et de polymérisation ont vraisemblablement constitué un réservoir génétique pour l'émergence et la spécialisation d'autres polymères au cours de l'évolution des plantes terrestres. Par ailleurs, l'identification d'un réseau de co-expression de gènes homologues à la voie de signalisation Schengen, suggère une potentielle origine commune de la néofonctionnalisation de cette voie dans le contrôle de l'établissement des barrières apoplastiques.

Les résultats obtenus au cours de ce projet ouvrent ainsi de nouvelles hypothèses quant à l'évolution des barrières apoplastiques des plantes, et de nouvelles pistes à approfondir pour comprendre le rôle des peroxydases chez les bryophytes, et la potentielle voie de signalisation associée. Le rôle et l'interaction entre les différents acteurs identifiés, PpRBOH, PpLRR-RLK1/2 et PpPRX1/2/3, peuvent à présent être étudiés en détail. Dans cette démarche, le recours à des techniques de biologie cellulaire et de microscopie peuvent apporter des

informations pertinentes, notamment sur la localisation subcellulaire et l'expression spatio-temporelle des différentes protéines. Pour mieux comprendre comment la cutine est synthétisée et assemblée, l'interaction de cette voie avec les protéines CUSs doit aussi être investiguée. Toujours en se basant sur les exemples connus du contrôle des barrières apoplastiques par une voie Schengen, il est aussi possible d'approfondir l'étude d'une telle voie chez *P. patens* en recherchant l'existence de peptides reconnus par les récepteurs LRR-RLK, et d'une voie de signalisation de type de MAPK en aval de ces récepteurs. D'un point de vue évolutif, l'origine commune d'une voie de type Schengen et des peroxydases associées reste à étudier, notamment par des analyses phylogénétiques approfondies des différentes familles géniques impliquées. La potentielle conservation fonctionnelle des peroxydases associées à la polymérisation des polymères apoplastiques chez les embryophytes, peut aussi être étudiée par des expériences de trans-complémentation. Le mutant quintuple KO affecté dans cinq gènes *PRXs* chez *A. thaliana*, dont la formation du cadre de Caspary est abolie, est un outil pertinent à cet égard. L'expression de AtPRX64 dans le fond génétique de ce mutant suffit à restaurer la formation du cadre de Caspary (Rojas-Murcia *et al.*, 2020). L'expression de PpPRX1 – l'homologue le plus proche de AtPRX64, particulièrement important pour la synthèse de la cutine de *P. patens* – dans ce même mutant permettrait ainsi d'éclairer l'existence d'une possible conservation fonctionnelle au sein des embryophytes. Enfin, si une activité peroxydase est réellement responsable de la polymérisation de la cutine chez *P. patens* ou chez les bryophytes d'une manière générale, le polymère formé n'est probablement pas le polyester que nous analysons actuellement par GC-TOFMS, car la polymérisation radicalaire catalysée par les peroxydases crée des liaisons chimiques plus complexes et récalcitrantes (Vanholme *et al.*, 2010). L'existence d'un autre polymère jusqu'à présent non analysé serait alors envisageable. Ce polymère pourrait être associé ou séparé de la cutine, et avoir des similarités avec le domaine poly-aromatique de la subérine voire avec la lignine. La recherche d'un tel polymère peut être menée en ayant recours aux techniques analytiques classiquement utilisées pour analyser ces polymères phénoliques (e.g. DFRC).

Matériels et méthodes

Analyse phylogénétique

Les séquences PRXs de *P. Patens*, *M. polymorpha*, *S. moellendorffii*, *C. richardii*, et *A. thaliana* ont été identifiées par BLASTp (seuil E-value < E⁻⁷⁰) avec la séquence de AtPRX64 comme référence. Les séquences codantes des gènes ont été récupérées et les protéines

correspondantes ont été alignées selon l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004) dans le logiciel Seaview. L'alignement obtenu des séquences nucléotidiques a servi à une reconstruction phylogénétique réalisée avec le logiciel IQTREE2 (Minh *et al.*, 2020) et le modèle d'évolution TVM+F+R10. L'arbre phylogénétique non enraciné a été visualisé avec le logiciel FigTree.

Traitement au iodure de potassium

P. patens (écotype Reute) a été cultivé sur milieu solide Knop, et *M. polymorpha* (écotype Tak-1) et *A. agrestis* (écotype Bonn) ont été cultivés sur milieu solide GB/2 (cf. protocoles et méthodologies générales), tous supplémentés en iodure de potassium (KI) à partir d'une solution stérile à 1 M dans l'eau. Les milieux témoin sans KI ont été supplémentés avec un volume identique d'eau. Un gamétophore (*P. patens*), un gemmae (*M. polymorpha*) ou un morceau de thalle (*A. agrestis*) ont été transférés depuis les milieux de croissance standard vers les milieux supplémentés en KI. Les photos et la coloration au bleu de toluidine ont été réalisés huit semaines (*P. patens* et *A. agrestis*) ou six semaines (*M. polymorpha*) après repiquage.

Génération des lignées génétiquement modifiées

Les lignées KO ont été générées par transfection de protoplastes avec des constructions génétiques nécessaires à la mutation des gènes cibles par CRISPR/Cas9 (cf. protocoles et méthodologies générales). Les lignées *rboh* ont été obtenues à partir d'un fond génétique WT (écotype Reute). En raison du nombre plus élevé de gènes ciblés pour les autres transformations, les lignées KO triples, quadruples et quintuples ont été obtenues de manière séquentielle. Des lignées KO doubles ont alors d'abord été obtenues, et utilisées comme fond génétique pour cibler le ou les gènes supplémentaires. Ainsi, deux lignées KO doubles *prx1/prx3* (#22 et #49) ont été utilisées pour générer les lignées KO triples *prx1/prx2/prx3* et les lignées KO quintuples *prx1/prx2/prx3/cus1/cus2*. La lignée KO double *cus1/cus2* #52 a été utilisée pour générer les lignées KO triples *cus1/cus2/rboh*, et les lignées KO quadruples *cus1/cus2/prx1/prx2*, *cus1/cus2/prx1/prx3* et *cus1/cus2/prx2/prx3*. Pour chaque génotype, trois ou quatre lignées indépendantes ont été sélectionnées de manière à avoir différents allèles, tout en privilégiant les mutations induisant un décalage du cadre de lecture (cf. annexe 3).

Analyse de la cutine et de la cuticule

La cuticule des plantes WT et KO a été observée par microscopie électronique à balayage sur des coupes de phyllides par Mathieu Erhardt, à la plateforme de microscopie de l'IBMP (cf. protocoles et méthodologies générales). La composition de la cutine a été analysée

par GC-TOFMS, à partir du même matériel que pour les analyses métaboliques (cf. protocoles et méthodologies générales).

Analyses métaboliques

Les esters phénoliques de thréonate et de shikimate, ainsi que le caféoyl-hydroxypalmitate ont été identifiés et quantifiés par UHPLC-MS/MS à partir d'extraits métaboliques. Les esters de thréonate ont été analysés à partir d'extraits non concentrés, tandis que le *p*-coumaroyl-shikimate et le caféoyl-hydroxypalmitate ont été analysés à partir d'extraits concentrés (cf. protocoles et méthodologies générales). Les esters de thréonate et de shikimate ont été séparés selon la méthode chromatographique des molécules solubles, tandis que caféoyl-hydroxypalmitate a été séparé selon la méthode chromatographique des molécules aliphatiques (cf. protocoles et méthodologies générales).

Discussion générale

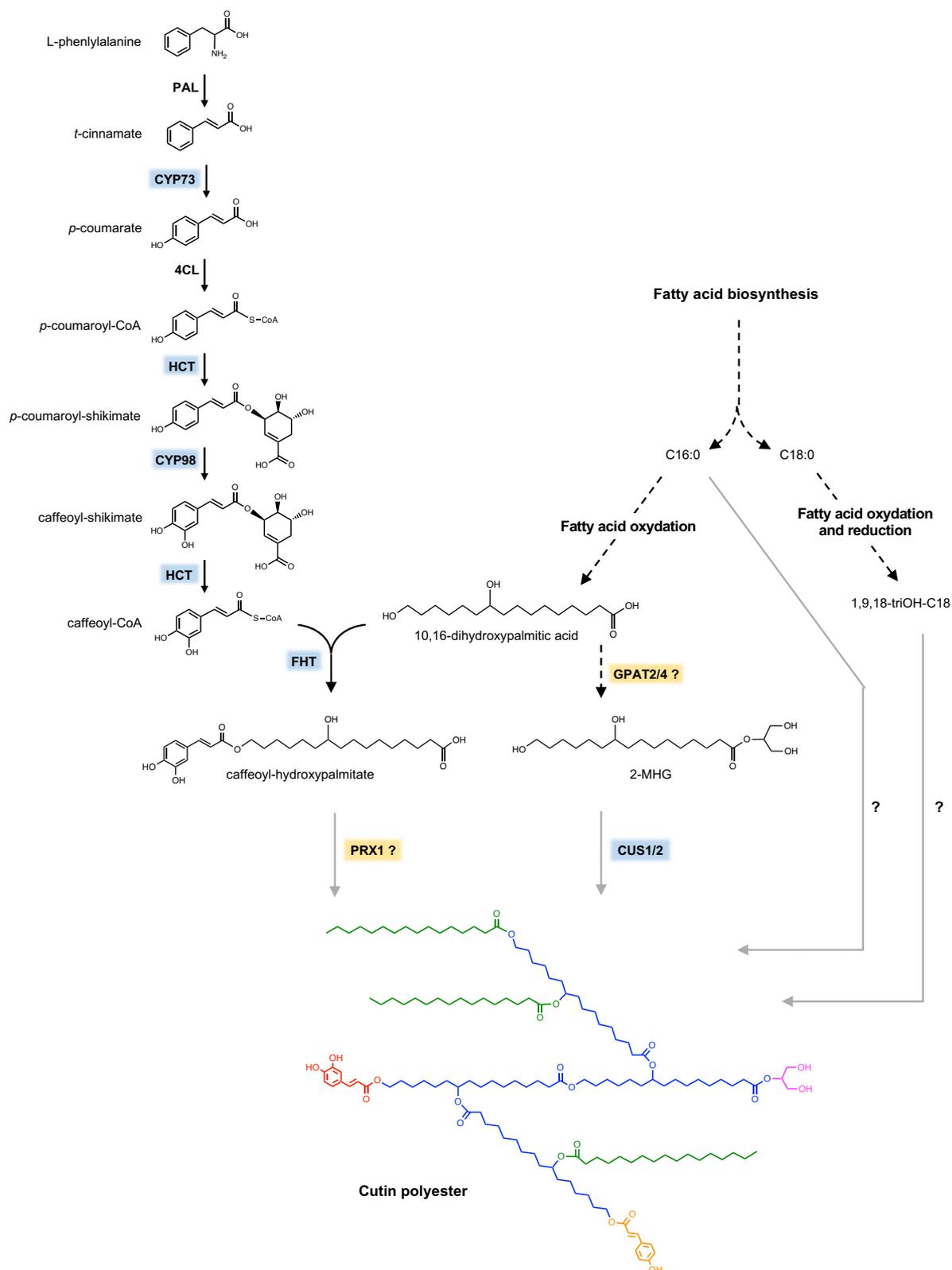


Figure 38 : Voie de biosynthèse de la cutine chez *P. patens*.

La biosynthèse de la cutine de *P. patens* est résumée selon l'étude de la voie des phénylpropanoïdes et des mécanismes de polymérisation du polymère, d'après Renault *et al.* (2017a), Kriegshauser *et al.* (2021), Lee *et al.* (2020), et les présents travaux. À partir de l'acide aminé L-phénylalanine, la voie des phénylpropanoïdes aboutit au caféoyl-CoA. L'enzyme FHT connecte le métabolisme phénolique avec celui des acides gras hydroxylés, en formant du caféoyl-hydroxypalmitate à partir du caféoyl-CoA et du diOH-C16. Le diOH-C16 est également un intermédiaire de la biosynthèse du 2-MHG, un précurseur direct de la polymérisation du diOH-C16 par les enzymes CUS1 et CUS2. L'enzyme PRX1 participe aussi à la synthèse du polymère par une activité inconnue, possiblement à partir du caféoyl-hydroxypalmitate. Le C16:0 et le triOH-C18 sont incorporés au polymère de cutine par des mécanismes inconnus. Les étapes surlignées en bleue ont été caractérisées de manière fonctionnelle et biochimique, et les étapes surlignées en jaune ont uniquement été caractérisées de manière fonctionnelle. Les flèches noires en pointillés indiquent des successions d'étapes connues chez *A. thaliana* (à l'exception de la réduction des acides gras en C18) mais non caractérisées chez *P. patens*. Les flèches grises représentent les étapes de polymérisation ou d'estérification des précurseurs ou monomères de cutine. PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; 4CL : 4-coumarate-CoA ligase ; HCT : hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase; GPAT : glycerol-3-phosphate-O-acyltransférase.

L'étude des bryophytes est pertinente pour comprendre l'apparition et l'évolution des barrières apoplastiques

Les embryophytes synthétisent quatre polymères apoplastiques hydrophobes – cutine, subérine, sporopollénine et lignine – qui permettent de structurer des barrières extracellulaires protectives constituant des adaptations majeures aux contraintes du milieu terrestre. La composition, la biosynthèse et les fonctions de ces polymères ont principalement été étudiées chez des plantes modèles ou d'intérêt agroéconomique qui appartiennent au clade des plantes vasculaires, mais nettement moins chez les plantes non vasculaires (Niklas *et al.*, 2017). Pourtant, ces polymères sont apparus successivement au cours de l'évolution, et leur étude au sein des clades représentatifs des embryophytes permet d'appréhender leur apparition et leur évolution. En effet, la cutine et la sporopollénine sont apparues avec les premières plantes terrestres, tandis que la subérine et la lignine sont apparues avec les plantes vasculaires (Renault *et al.*, 2019). Les bryophytes et les trachéophytes ayant divergé avant l'apparition de ces deux derniers polymères, ce clade peut être représentatif d'un stade non vasculaire des plantes terrestres (McDaniel, 2021). De fait, par leur position taxonomique et dans une perspective évolutive, les bryophytes sont l'objet d'un intérêt croissant pour l'étude de la cutine et de la sporopollénine (Buda *et al.*, 2013 ; Daku *et al.*, 2016 ; Renault *et al.*, 2017a ; Li *et al.*, 2018 ; Salminen *et al.*, 2018 ; Lee *et al.*, 2020 ; Xu *et al.*, 2020 ; Kriegshauser *et al.*, 2021). Lors de ma thèse, j'ai pu approfondir l'étude de la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, sous le prisme de la voie des phénylpropanoïdes et des mécanismes de polymérisation du polymère. Un modèle de voie de biosynthèse de la cutine chez *P. patens* est ainsi proposé en figure 38. Ces travaux ont notamment montré une conservation fonctionnelle forte des familles géniques étudiées entre les bryophytes et les trachéophytes : *CYP73*, *HCT*, *FHT*, *CUS*. De nombreuses étapes clés de la synthèse des polymères apoplastiques sont ainsi apparues chez un ancêtre commun des embryophytes, et ont été conservées au cours de l'évolution. Les connaissances sur la biosynthèse de la cutine des bryophytes suggèrent ainsi l'émergence concomitante de nombreuses familles géniques chez les embryophytes, qui ont été nécessaires à l'acquisition des polymères apoplastiques chez les premières plantes terrestres. Néanmoins, si les embryophytes dérivent bien d'un ancêtre commun unique, la colonisation des terres a probablement procédé de manière successive par l'acquisition progressive de caractères adaptatifs (Delwiche et Cooper, 2015 ; Fürst-Jansen *et al.*, 2020). Il apparaît ainsi plus probable que l'apparition des barrières apoplastiques, qui nécessitent des traits métaboliques complexes,

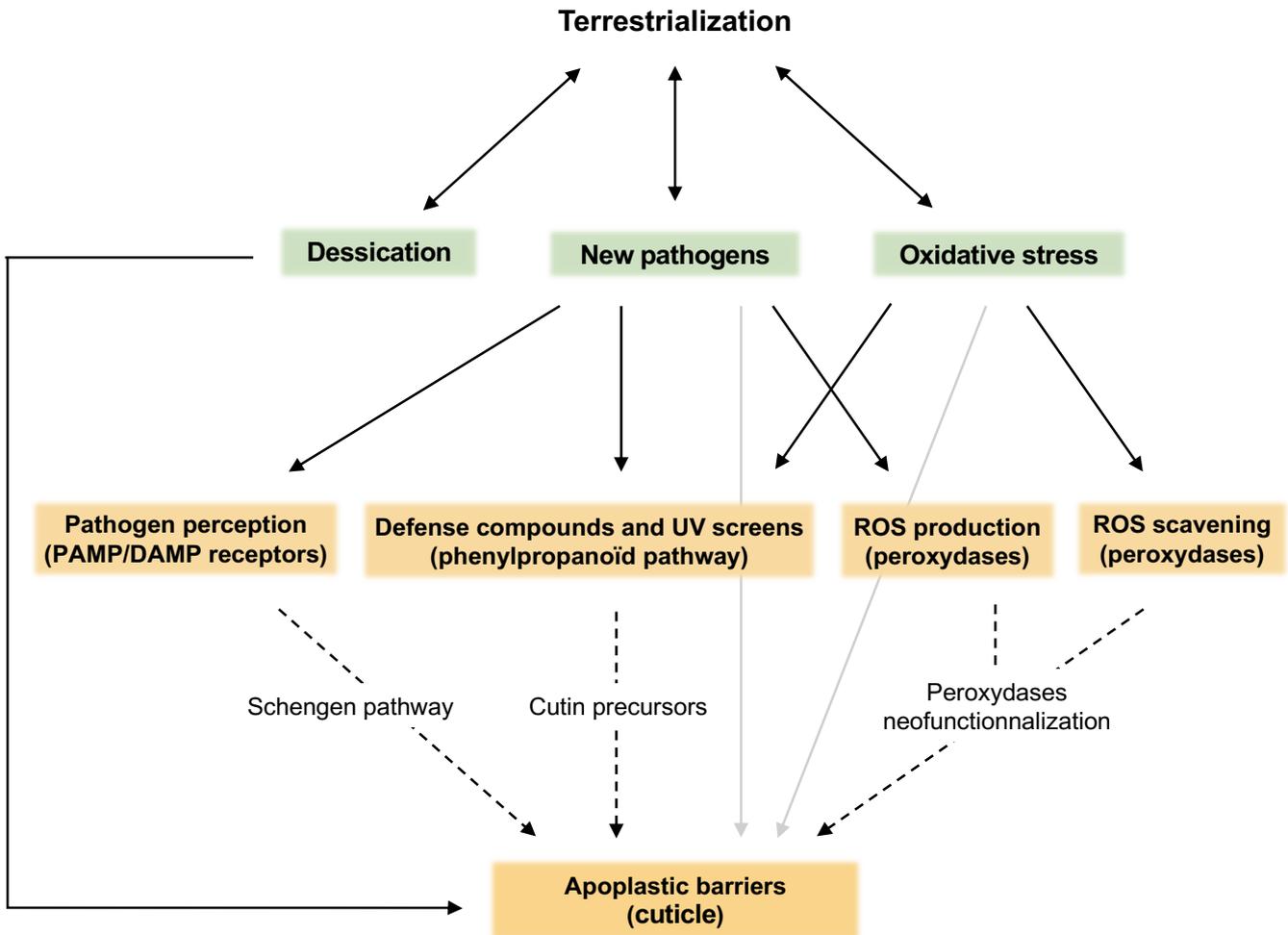


Figure 39 : Émergence des adaptations aux contraintes de la vie hors de l'eau.

Des liens sont proposés entre l'exposition des plantes aux contraintes du milieu terrestre et l'émergence successive d'adaptations à ces contraintes. Lors de la terrestrialisation, les premières plantes terrestres ont notamment été exposées à une atmosphère asséchante et à la dessiccation, à de nouveaux agents pathogènes et bio-agresseurs, et à un stress oxydatif inédit provoqué par un rayonnement UV accru. Face à ces contraintes, quatre adaptations primordiales sont proposées : *i*) la perception de l'attaque par des agents pathogènes via la reconnaissance de PAMP/DAMP qui mène à l'activation de mécanismes de défenses, *ii*) la voie des phénylpropanoïdes qui alimente la synthèse de composés phénoliques de défense ou filtrant les UV, *iii*) la production ROS par des peroxydases comme élément des mécanismes de défense, *iv*) la réduction de l' H_2O_2 en eau par les peroxydases, entre autres systèmes de piégeage et de détoxification des ROS. Ces adaptations primordiales auraient permis l'apparition de la cuticule par la cooptation progressive des mécanismes de perception des agents pathogènes, de la voie des phénylpropanoïdes et des mécanismes de production/détoxification des ROS. La cuticule participe aussi à lutter contre l'attaque des agents pathogènes et le stress oxydatif, en formant une barrière protectrice et en reflétant une partie du rayonnement UV.

soit la résultante de premières adaptations apparues de manière successive chez des ancêtres communs aux embryophytes.

Des adaptations successives peuvent être à l'origine de la cuticule

La terrestrialisation a exposé les premières plantes terrestres à de nombreuses contraintes de manière simultanée, notamment la dessiccation, de nouveaux agents pathogènes, et un stress oxydatif accru (de Vries et Archibald, 2018 ; fig. 39). Bien que les barrières apoplastiques, y compris la cuticule, aient conféré un avantage évolutif considérable aux embryophytes dans la lutte contre les pertes passives en eau, la nécessité d'une protection contre les attaques des agents pathogènes et la production importante de ROS a certainement précédé la nécessité de former des barrières apoplastiques, d'autant plus si la colonisation des terres s'est faite de manière progressive le long d'un gradient hydrologique (Dixon et Barros, 2019 ; Fürst-Jansen *et al.*, 2020). Ainsi, il est proposé que les premiers composés phénoliques synthétisés via la voie des phénylpropanoïdes étaient d'abord des composés de défense et des filtres UV (Weng et Chapple, 2010 ; de Vries *et al.*, 2021). De même, les mécanismes de piégeage et de détoxification des ROS, telles que les peroxydases, sont considérés comme des premières adaptations au stress oxydatif avant d'avoir pu être impliqués dans des processus plus complexes (Passardi *et al.*, 2004 ; Mbadinga Mbadinga *et al.*, 2020). Les systèmes de perception des stress biotiques et abiotiques, couplés à des voies de signalisation et à des réponses physiologiques qui permettent de s'adapter à un environnement fluctuant, sont aussi des éléments considérés comme des marqueurs des adaptations précoces aux milieux terrestres (Fürst-Jansen *et al.*, 2020). À ce titre, la reconnaissance des agents pathogènes et les voies de signalisation de type MAPK et/ou hormonales sous-jacentes jouent un rôle central dans le déclenchement de mécanismes de défense (Liang et Zhou, 2018). Si plusieurs exemples connus montrent l'existence de voies similaires dans la constitution de barrières apoplastiques, leur apparition est probablement liée à la perception des différents stress biotiques et abiotiques (Fujita *et al.*, 2020 ; Doll *et al.*, 2020). Il est alors intéressant de noter que ces différentes réponses aux stress sont ou seraient présentes chez les bryophytes, et seraient apparues chez un ancêtre commun des embryophytes. En effet, l'exposition de *P. patens* aux UV-B induit la transcription de gènes PAL et 4CL – des gènes de la voie des phénylpropanoïdes –, ainsi que de gènes *chalcone synthase* (*CHS*) et *chalcone isomérase* (*CHI*) – des gènes de biosynthèse de composés phénoliques solubles en aval du *p*-coumaroyl-CoA chez les plantes vasculaires (Wolf *et al.*, 2010). La transcription des gènes *PAL* et *CHS* chez *P. patens* est aussi induite par

l'infection par des agents pathogènes (bactérie, champignon, oomycète ; Ponce de Léon *et al.*, 2007 ; Oliver *et al.*, 2009). De même, *M. polymorpha* synthétise par exemple une classe de flavonoïdes propres aux marchantiophytes en réponse aux UV-V (Berland *et al.*, 2019), et la voie des phénylpropanoïde est aussi activée en réponse à l'infection par des agents pathogènes (Carella *et al.*, 2019). La synthèse de composés phénoliques via la voie des phénylpropanoïdes comme composés de défense ou filtre UV semble donc conservée chez les embryophytes. L'activation de mécanismes de défense suite à la perception de PAMPs est aussi un phénomène mis en évidence chez *P. patens*. Un récepteur de type LRR-RLK (PpCERK1, *Pp3c5_4120*) reconnaît la chitine, et est nécessaire à l'activation d'une cascade de signalisation de type MAPK, qui aboutit à des réactions de défense : renforcement de la paroi, transcription de gènes *PAL* et *CHS*, production de ROS (Bressendorff *et al.*, 2016). Une peroxydase de classe III (PpPRX34, *Pp3c4_14530*) a d'ailleurs été identifiée comme responsable du « burst oxydatif » provoqué par le traitement à la chitine (Lehtonen *et al.*, 2012). Bien que la voie entière de la perception des PAMPs à l'activation des défenses n'ait pas été élucidée biochimiquement (i.e. mise en évidence de la phosphorylation et de l'activation des protéines), la capacité à percevoir des PAMPs, induire une cascade de signalisation MAPK, et produire des ROS de manière localisée et maîtrisée, sont là aussi des caractères conservés chez les embryophytes et de fait apparus chez leur ancêtre commun. Par la caractérisation de la voie Schengen/Gassho dans la synthèse du cadre de Caspary et de la cuticule de l'embryon, il a été proposé que ces voies de signalisation similaires impliquées dans la mise en place et le contrôle de barrières apoplastiques, soient le fruit de cooptations de voies de signalisation impliquées dans la perception des agents pathogènes et le déclenchement de mécanismes de défense (Fujita *et al.*, 2020 ; Doll *et al.*, 2020). La découverte d'un rôle des ROS, des peroxydases de classe III, et d'une possible voie de signalisation analogue, dans la synthèse de la cutine de *P. patens*, suggère que la néofonctionnalisation de ce type de voie vers la synthèse des barrières apoplastiques ait pu aussi avoir lieu chez un ancêtre commun des embryophytes, ou plusieurs fois de manière indépendante, et participer à l'apparition de la cutine. Selon ce scénario et celui d'une émergence des barrières apoplastiques ultérieure aux adaptations précoces des plantes à la vie hors de l'eau, la voie des phénylpropanoïdes aurait dans un second temps fourni les précurseurs phénoliques de la cutine puis de la subérine et de la lignine, et les peroxydases impliquées dans la synthèse de ces polymères seraient issues de la néofonctionnalisation des peroxydases impliquées dans la détoxification des ROS ou dans les réactions de défense (fig. 39). De plus, l'émergence de la cuticule a aussi constitué une adaptation face aux agents pathogènes et au stress oxydatif, en formant une barrière protectrice et en reflétant une partie

du rayonnement UV, ce qui a pu participer au succès évolutif des embryophytes (Yeats et Rose, 2013 ; Niklas *et al.*, 2017).

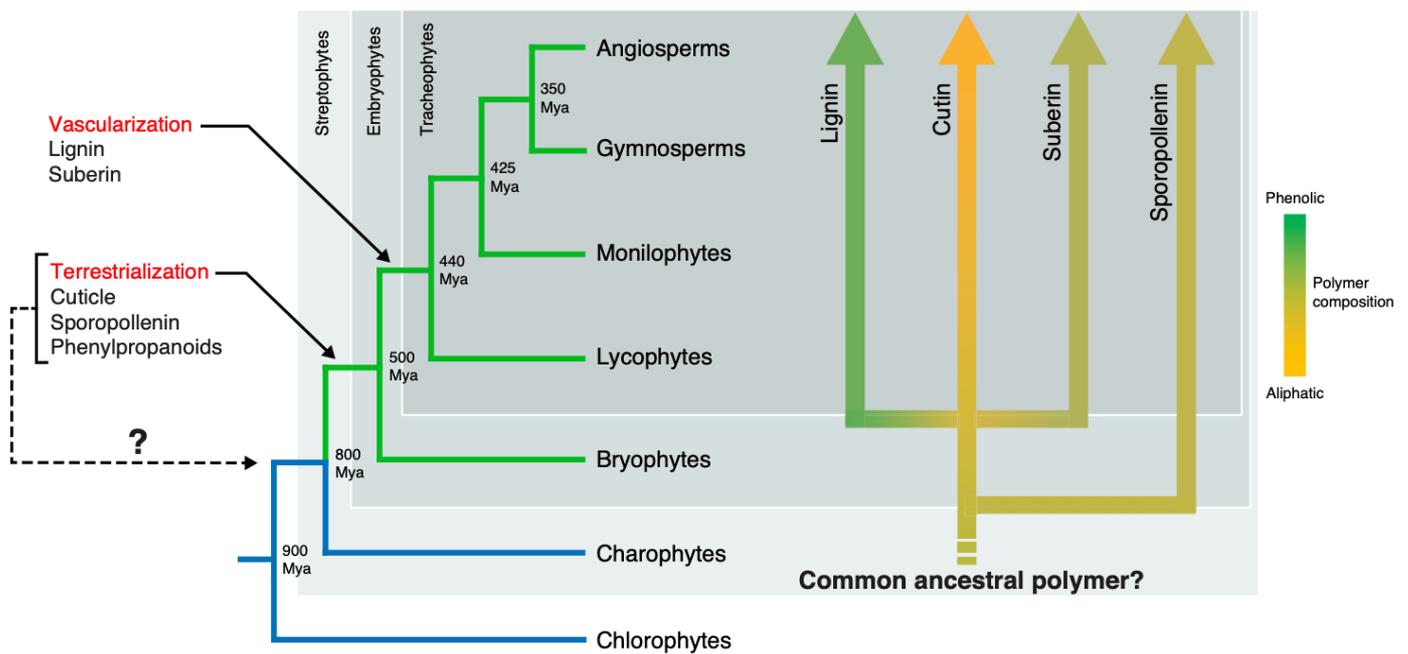
Les polymères apoplastiques hydrophobes partagent une origine commune

Du fait de leur compositions et de leurs voies de biosynthèse plus ou moins partagées, l'origine commune des différents polymères apoplastiques a déjà été suggérée et discutée (Philippe *et al.*, 2020b ; Renault *et al.*, 2017a ; Niklas *et al.*, 2017). Notamment, les voies de biosynthèse de la cutine et de la subérine partagent de nombreuses étapes similaires dans l'hydroxylation et l'activation des acides gras, catalysées par des enzymes de mêmes familles (e.g. CYP86, LACS, GPAT, BAHD, GDSL ; Philippe *et al.*, 2020b). La découverte du rôle de la voie des phénylpropanoïdes dans la biosynthèse de la cutine de *P. patens* a ouvert la voie d'une origine commune de la cutine et de la lignine (Renault *et al.*, 2017a). Ces considérations posent la question de savoir dans quelle mesure les voies de biosynthèse et leurs réactions enzymatiques sont conservées, ou ont évolué lors des divergences des différents polymères. Les travaux de thèse de Lucie Kriegshauser (2018) et de la présente thèse ont étendu l'étude de la voie des phénylpropanoïdes chez les bryophytes par la caractérisation d'autres gènes clés de la voie (*CYP73*, *HCT*), et montré qu'une partie de cette voie est strictement conservée au sein des embryophytes. Dans ce cas, l'activité intrinsèque des protéines est strictement conservée, mais la voie a progressivement été mobilisée pour la synthèse des précurseurs phénoliques des différents polymères apoplastiques au cours de leur apparition et évolution chez les plantes terrestres. L'étude de FHT chez *P. patens* a aussi montré une conservation fonctionnelle du clade FHT chez les embryophytes, dont l'activité a été conservée et s'est diversifiée dans la synthèse de la cutine et de la subérine. Si les activités enzymatiques et les fonctions des différents membres de ce clade sont similaires, leur conservation est moins stricte que pour les gènes de la voie des phénylpropanoïdes étudiés, et montre comment des événements de duplication et de spécialisation peuvent progressivement diversifier la synthèse et la composition des polymères apoplastiques. De même, les différences mineures de préférence de substrat des enzymes impliquées dans la synthèse de la cutine ou de la subérine témoignent à la fois de leur origine commune et de la spécialisation des activités enzymatiques (Philippe *et al.*, 2020b). Enfin, l'étude de la polymérisation de la cutine des bryophytes ouvre l'idée d'une origine commune de plusieurs mécanismes de polymérisation des polymères apoplastiques. L'étude de la famille CUS chez *P. patens* montre sa conservation fonctionnelle chez les

embryophytes, et l'apparition d'un mécanisme de polymérisation de la cutine dans un ancêtre commun des plantes vasculaires et non vasculaires. L'identification récente de probables « subérine synthase » de type GDSL suggère que leur activité enzymatique soit similaire à l'activité CUS, certainement à partir de substrats spécifiques de la subérine (Ursache *et al.*, 2020), et qu'il existe une origine commune de ce mode de polymérisation pour les deux polymères chez les trachéophytes. L'existence de l'activité CUS chez les bryophytes permet de placer son apparition aux origines des embryophytes, et illustre comment plusieurs polymères ont pu émerger à partir d'un polymère ancestral, via la duplication et la spécialisation des gènes de sa biosynthèse. Dans la même idée, le rôle d'une activité peroxydase et de la production de ROS dans la synthèse de la cutine des bryophytes suggère que des mécanismes de polymérisation de la cutine et de la lignine puissent partager une origine commune. Ainsi, l'élucidation de la voie de biosynthèse de la cutine chez les bryophytes montre progressivement que les voies de biosynthèse des polymères apoplastiques hydrophobes partagent de nombreuses origines communes, tant au niveau de la synthèse des précurseurs que des mécanismes de polymérisation. Ces données convergent vers l'idée qu'un polymère ancestral ait pu représenter un trait primordial favorable à l'apparition et à la spécialisation des différents polymères apoplastiques au cours de l'évolution, via de multiples événements de duplications et subfonctionnalisation ou néofonctionnalisation (fig. 40).

Conclusions et perspectives

La colonisation des espaces terrestres par les plantes, il y a environ 500 Ma a été une étape décisive dans l'évolution, en modifiant en profondeur les cycles géo-climatiques, et la vie sur terre d'une manière générale. L'apparition des plantes sur les terres émergées s'est accompagnée de leur exposition à des contraintes spécifiques, face auxquelles de nombreuses adaptations ont été acquises. Parmi elles, l'établissement de barrières apoplastiques protectrices confère de nombreux caractères adaptatifs qui ont progressivement permis aux embryophytes de coloniser les espaces terrestres. L'investigation des voies de biosynthèse de ces polymères chez les plantes vasculaires et non vasculaires permet de comprendre leur origine et leur évolution. L'étude de la voie des phénylpropanoïdes chez les bryophytes montre ainsi la forte conservation de cette voie chez les embryophytes, et son implication dans la synthèse de précurseurs phénoliques des polymères apoplastiques, notamment la cutine des bryophytes, et la lignine des trachéophytes. Une connexion entre cette voie et le métabolisme des acides gras a été caractérisée chez *P. patens* par l'étude du clade FHT, également conservé chez les



Current Opinion in Biotechnology

Figure 40 : Origine commune et évolution des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes.

Une origine commune des polymères apoplastiques chez les embryophytes est proposée. L'apparition d'un polymère ancestral au cours de la terrestrialisation aurait constitué un contexte propice à l'émergence et à la spécialisation de nouveaux polymères apoplastiques hydrophobes des plantes terrestres au cours de leur évolution. D'après Renault *et al.*, 2019.

embryophytes pour la synthèse des polymères apoplastiques. L'investigation des mécanismes de polymérisation de la cutine des bryophytes a montré une conservation du clade CUS au sein la famille des GDSLs, dans la polymérisation de la cutine. Chez *P. patens*, ce mécanisme de polymérisation de la cutine n'est pas unique et une autre voie semble coexister, impliquant des peroxydases, des enzymes habituellement associées à la polymérisation de la lignine. Les mécanismes de polymérisation des polymères apoplastiques peuvent alors aussi avoir des origines communes, qui restent à approfondir. L'étude et la caractérisation des familles géniques impliquées dans les voies de biosynthèse des polymères apoplastiques, met donc souvent en avant leur présence exclusive chez les embryophytes, et leur conservation fonctionnelle au cours de l'évolution. Plus qu'une apparition simultanée des multiples étapes formant les voies métaboliques complexes de biosynthèse des polymères apoplastiques, je propose que l'apparition de ces polymères soit davantage le fruit d'adaptations secondaires et progressives à partir de premières adaptations cruciales à la survie des plantes sur terre. L'étude de la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes suggère l'existence d'un polymère ancestral, dont la voie de biosynthèse a pu être cooptée pour l'apparition et la diversification successives des autres polymères apoplastiques au cours de l'évolution des embryophytes et de leur complexification anatomique, par de multiples évènements de duplications et subfonctionnalisation ou néofonctionnalisation.

Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives quant à la caractérisation de la biosynthèse de la cutine les bryophytes, et la compréhension de l'évolution des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes. La découverte d'un rôle des ROS et d'une activité peroxydase dans la synthèse de la cutine de *P. patens*, possiblement régulée par une voie similaire à la voie Schengen/Gassho, ouvre la voie pour une caractérisation approfondie de cette voie potentielle. L'interaction entre les différents acteurs de cette voie pourrait notamment être appréhendée par des techniques de biologie cellulaire et de microscopie. La localisation spatio-temporelle des enzymes PRXs et CUSs peut être étudiée selon ces mêmes approches, et apporter des informations sur la manière dont le polymère est assemblé et polymérisé. L'activité biochimique des peroxydases reste à élucider, et peut éclairer l'existence d'un polymère plus complexe que jusqu'alors imaginé, dont la composition peut être explorée en ayant recours à d'autres techniques analytiques. La conservation fonctionnelle des familles géniques étudiées est souvent inférée d'après l'activité biochimique des protéines et l'analyse de mutants KO. Les expériences de trans-complémentations entre espèces bryophytes et trachéophytes apportent des informations précieuses sur ce degré de conservation. Il est notamment possible de réaliser ce type d'expérience entre *P. patens* et *A. thaliana* grâce aux outils méthodologiques dont nous

disposons. La trans-complémentation mutuelle de ces deux espèces par les gènes *FHT*, *PRX*, *CUS*, ou même « subérine synthase », peut ainsi nous informer sur la manière dont ces clades ont évolué. Enfin, la sporopollénine, l'autre polymère apoplastique présent chez les plantes non vasculaires, reste à ce jour moins étudié que la cutine. L'investigation de sa biosynthèse peut aussi apporter de nouvelles informations quant à l'évolution des polymères apoplastiques.

La poursuite de l'étude des barrières extracellulaires chez les bryophytes, permettra d'améliorer notre compréhension de l'apparition et de l'évolution des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes, qui ont façonné les grands groupes des plantes terrestres et représentent une biomasse considérable sur terre, et sont d'autre part l'objet d'intérêts agroéconomiques importants. Cette perspective illustre également la manière dont des voies métaboliques peuvent apparaître, évoluer et se diversifier en parallèle de l'évolution et de la diversification des plantes.

Protocoles et méthodologies générales

Conditions de culture des plantes

Physcomitrium patens (écotype Gransden (Rensing *et al.*, 2008) ou Reute (Hiss *et al.*, 2017)) a été cultivée en milieu liquide ou solide Knop (cf. annexe 6) complété avec les microéléments suivants : H_3BO_3 50 mmol/L, MnSO_4 50mmol/L, ZnSO_4 15mmol/L, KI 2,5 mmol/L, Na_2MoO_4 0,5 mmol/L, CuSO_4 0,05 mmol.L/, et CoCl_2 0,05 mmol/L. Pour les cultures sur milieu solide, le Knop a été solidifié avec de l'agar à 12 g/L, et les gamétophores ont été propagés sur boîtes de Pétri par repiquage de gamétophores individuels. Les cultures liquides ont été menées dans 200 mL de milieu Knop dans des Erlenmeyers de 500 mL fermés stérilement avec des bouchons SILICOSEN® (Hirschmann). Les cultures étaient inoculées par l'introduction de gamétophores ou de protonéma, et ont été maintenues sous agitation constante (120 rpm). Les cultures de protonema étaient broyées environ tous les 15 jours à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra Turrax, IKA ; 1 min à 15 000 rpm). Le milieu liquide était régulièrement changé en filtrant le protonema sur un filtre stérile (100 μm) puis en le transférant dans un nouveau milieu. Les plantes ont été maintenues à 22°C sous un cycle jour/nuit 16h/8h, avec une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

M. polymorpha et *A. agrestis* ont été cultivée en milieu solide Gamborg B5 à 0,5 X (GB/2 ; cf. annexe 6), solidifié avec de l'agar à 12 g/L. Les plantes ont été propagées sur boîtes de Pétri par repiquage d'un gemmae (*M. polymorpha*) ou d'un morceau de thalle (*A. agrestis*). Les plantes ont été maintenues dans les mêmes conditions de culture que *P. patens*.

A. thaliana a été cultivée en terre dans des pots de 7 cm de côté contenant du terreau. Les plantes ont été maintenues dans des logettes de culture sous un cycle jour/nuit 16h/8h et une hygrométrie de 80%. Les plantes étaient tutorées lors du développement des hampes florales. Peu après l'apparition des premières siliques, les plantes ont été recouvertes d'un sachet en papier afin de faciliter la future récolte des graines. Après récolte, les graines ont été mises à sécher à l'air libre pendant deux semaines au minimum.

Clonage et production des plasmides

Amplification par PCR

Les fragments d'ADN pour les clonages ont été amplifiés par PCR en utilisant le mix Phusion High Fidelity (ThermoFischer Scientific) dans un volume de 50 μL , selon les instructions du fabricant. Les températures d'hybridation des amorces (T_m) ont été calculées par l'outil TM calculator (NEB ; <https://tmcalculator.neb.com>). Les produits PCR ont ensuite

été purifiés à l'aide de billes magnétiques ayant une affinité pour l'ADN, produites par la plateforme d'analyse de l'expression génique de l'IBMP. L'ensemble des amorces utilisées pour les amplifications PCR et les clonages sont disponibles en annexe 4.

Clonage Gateway®

Les gènes ont été amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques pour ajouter les extensions Gateway *attB1* en 5' (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC) et *attB2* en 3' (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC); les nucléotides soulignés ont été ajoutés pour conserver le cadre de lecture. Les extensions *attB* permettent le clonage des produits PCR dans le vecteur d'entrée pDONR207, en réalisant une réaction de recombinaison BP (ThermoFischer Scientific) dans un volume de 5 µL, selon les instructions du fabricant. 2,5 µL de produit de réaction BP sont utilisés pour les transformations bactériennes, étalées sur milieu LB (cf. annexe 6) supplémenté en gentamicine (25 mg/L). Les plasmides obtenus ont ensuite été utilisés pour la recombinaison du gène cloné dans un vecteur d'expression, en réalisant une réaction LR (ThermoFischer Scientific), selon les instructions du fabricant et les mêmes volumes que ceux utilisés pour les réactions BP.

Clonage Gibson

Les clonages Gibson ont été réalisés dans le but d'obtenir des constructions génétiques nécessaires aux transformations de *P. patens* par recombinaison homologue. Ces constructions génétiques consistent en deux régions génomiques de 750 pb encadrant la séquence hétérologue à introduire dans le génome. Ces clonages consistent donc en l'assemblage de quatre fragments amplifiés par PCR : les deux régions homologues, la séquence hétérologue et le vecteur pGEM-T. Les amorces utilisées contiennent des séquences chevauchantes aux autres fragments, afin de permettre leur assemblage par la technologie Gibson (Gibson *et al.*, 2009). Ces amorces ont été dessinées à l'aide de l'outil NEBuilder® (<https://nebuilder.neb.com>). Après amplification par PCR et purification, les fragments ont été assemblés à l'aide du mix Gibson Assembly® (NEB) dans un volume de 5 µL, selon les instructions du fabricant. 2,5 µL des produits de réaction ont été utilisés pour les transformations bactériennes, étalées sur milieu LB (cf. annexe 6) supplémenté en carbénicilline (100 mg/L). Les plasmides obtenus ont été vérifiés par séquençage Sanger.

Clonage Golden Gate

Les clonages Golden Gate ont été réalisés dans le cadre des transformations génétiques de *P. patens* et *M. polymorpha* par CRISPR/Cas9, dans le but d'insérer les protospacers (20 nucléotides, cf. génération des lignées génétiquement modifiées) dans les vecteurs utilisés pour l'expression du gRNA. Les séquences à cloner ont été obtenues sous formes d'oligonucléotides simple-brin complémentaires (i.e. « reverse complement »), contenant les extensions CTCG en 5' et AAAC en 3', nécessaires à leur intégration dans le vecteur lors du clonage. Les amorces ont d'abord été hybridées en mélangeant 5 µL de chaque amorce à 100 µM, et en incubant le mélange dans un thermocycleur avec le programme suivant : 98°C 3 min, diminution de 98°C à la T_m à 0,5°C/min, T_m 10 min, diminution de la T_m à 20°C à 0,5°C/min. Le clonage a été réalisé dans un volume de 10 µL contenant 25 ng de plasmide pENTR-U6P-sgRNA (Mallett *et al.*, 2019) ou pMpGE-En03 (Sugano *et al.*, 2018), 1,6 µL d'amorces hybridées diluées au 1/1000^{ème}, 0,4 µL T4 DNA ligase (NEB) et 1 µL d'enzyme de restriction BsaI-HF® (NEB). Les réactions ont été incubées dans un thermocycleur pour 40 cycles de digestion (37°C, 5 min) et ligation (16°C, 5 min), terminées par 10 min à 65°C. 5 µL ont ensuite été utilisés pour les transformations bactériennes, étalées sur milieu LB supplémenté en kanamycine (50 mg/mL) ou streptomycine (75 mg/L), respectivement pour les vecteurs pENTR-U6P-sgRNA et pMpGE-En03. Les plasmides obtenus ont été vérifiés par séquençage Sanger.

Transformations bactériennes et purification des plasmides

A l'issue des clonages, la souche Top10 d'*Escherichia coli* a été transformée avec les plasmides obtenus, afin de les isoler et de les amplifier. 50 µL de bactéries chimiocompétentes ont été décongelées sur glace, et mises au contact de 2,5 µL ou 5 µL de réaction de clonage pendant 10 min sur glace. Les bactéries ont ensuite subi un choc thermique (30s à 42°C au bain-marie) et ont été replacées immédiatement sur glace pendant 2 min. Après ajout de 1ml de LB, les bactéries ont été incubées pendant 1h à 37°C, puis centrifugées à 3000 rpm pendant 30 s. Le culot a été repris dans 100 µL de LB, puis étalé sur milieu LB solide sélectif, contenant l'antibiotique adéquat. Après incubation sur la nuit à 37°C, les colonies ayant intégré le plasmide étaient visibles sur la boîte. Une colonie a été mise en culture liquide par inoculation dans 3 ml de LB sélectif, et incubée une nuit à 37 °C sous agitation (180 rpm). Le lendemain, les plasmides ont été purifiés en utilisant le kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant.

Génération des lignées génétiquement modifiées

Production des plasmides de transformation

Les lignées génétiquement transformées de *P. patens* ont été obtenues par la transfection de protoplastes avec plusieurs plasmides permettant l'induction de mutations génétiques par CRISPR/Cas9 ou l'édition du génome par recombinaison homologe assistée par CRISPR/Cas9, ainsi que la sélection des transformants. Le plasmide pACT-Cas9 permet l'expression de la protéine Cas9 sous le contrôle du promoteur ACTIN1 de riz (*O. sativa* ; Collonnier *et al.*, 2017). Pour la génération des lignées knock-out et knock-in, les protospacers des gRNA ont été choisis de manière à cibler le premier ou le dernier exon des gènes à l'aide de l'outil CRISPOR (Concordet et Haeussler, 2018 ; <http://crispor.tefor.net>). Les protospacers ont été clonés par Golden Gate dans le squelette du gRNA contenu dans le plasmide pENTR-U6P-sgRNA, qui permet leur expression sous le contrôle du promoteur U6 de *P. patens* (Mallett *et al.*, 2019). Les plasmides matrices pour la recombinaison homologe ont été obtenus par clonage Gibson dans un vecteur pGEM-T, et linéarisés avant la transfection des protoplastes. Le plasmide pRT101-NPTII confère la résistance à la généticine, utilisée pour la sélection des transformants, c'est à dire des protoplastes qui ont intégré un ou plusieurs plasmides. L'ensemble des plasmides ont été stérilisés par précipitation à l'éthanol et à l'acétate d'ammonium, puis re-suspendus dans de l'eau stérile. Des mix de transformation de 100 μ L ont été réalisés, contenant 5 μ g de plasmide pRT101-NPTII, 10 μ g de plasmide pACT-Cas9, et 15 μ g totaux de plasmides pENTR-U6P-sgRNA et/ou pGEM-T, selon le type de transformation et le nombre de gènes ciblés.

Les transformations génétiques de *M. polymorpha* ont été réalisées grâce au plasmide binaire pMpGE011 qui permet l'expression simultanée de la protéine Cas9, du gRNA et du gène de résistance au chlorsulfuron (Sugano *et al.*, 2018). Les protospacers ont été choisis de manière à cibler le premier exon à l'aide de l'outil CRISPOR (Concordet et Haeussler, 2018), et ont d'abord été clonés dans le vecteur d'entrée pMpGE03 (Sugano *et al.*, 20108) par clonage Golden Gate, puis dans le plasmide pMpGE011 par clonage Gateway[®] (réaction LR). Le plasmide d'expression obtenu a été utilisé pour transformer la souche GV3101 d'*A. tumefaciens*, alors utilisée pour la transformation génétique de *M. polymorpha*.

Transformation de *P. patens*

Les lignées génétiquement modifiées ont été obtenues par transfection de protoplastes, selon une adaptation du protocole de Hohe *et al.* (2004). Les protoplastes ont été

isolés à partir d'une culture liquide de protonema, transférée une semaine avant la transformation dans un milieu Knop contenant $1/10^{\text{ème}}$ de la concentration en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. La culture de protonema a été filtrée sur $100\ \mu\text{m}$ et placée dans une boîte de Pétri pour digérer les parois des tissus avec une solution de driselase. La veille des transformations, une solution de driselase était préparée à 0,4 % dans du milieu 0,5M (cf. annexe 6), et incubée 45 min à l'obscurité sur une plateforme rotative pour dissoudre l'enzyme. La solution a ensuite été centrifugée à 3500 g pendant 10 min et le surnageant a été filtré sur $0,22\ \mu\text{m}$. Les parois des tissus ont été digérés avec cette solution, en réunissant dans une boîte de Pétri : la culture de protonema filtrée sur $100\ \mu\text{m}$, 8 mL de solution de driselase, et 8 mL de milieu 0,5M. La boîte de Pétri a ensuite été fermée hermétiquement, et placée sous agitation (vitesse 15) à l'obscurité pendant 45 min. Les protoplastes ont été séparés du protonema non digéré par filtration sur $100\ \mu\text{m}$ puis sur $40\ \mu\text{m}$. Le filtrat a ensuite été transféré dans deux tubes en polypropylène de 12 mL et centrifugé pendant 10 minutes à 50 g (accélération et décélération : 3). Le surnageant a été enlevé et les protoplastes ont été délicatement resuspendus dans 10 mL de milieu 0,5M, avant d'être à nouveau centrifugés et remis en suspension dans 10 mL de milieu 0,5M. La concentration en protoplastes a été évaluée à l'aide d'une cellule Fuchs-Rosenthal, et les protoplastes ont à nouveau été centrifugés, et remis en suspension à une densité de $1,2 \times 10^6$ protoplastes/mL dans du milieu 3M (cf. annexe 6). La transfection des protoplastes a ensuite été réalisée en mélangeant dans un tube en polypropylène 100 μL de mix d'ADN (cf. paragraphe précédent), 250 μL de solution de protoplastes, et 350 μL de solution PEG (cf. annexe 6), dans cet ordre. L'ensemble a été mélangé délicatement en roulant les tubes, puis incubé pendant 30 min à température ambiante, en mélangeant délicatement les tubes toutes les 5 minutes. La solution contenant les protoplastes transfectés a été diluée toutes les 5 minutes en ajoutant successivement 1, 2, 3 et 4 mL de milieu 3M, mélangeant délicatement après chaque ajout. Les tubes ont ensuite été centrifugés, le surnageant a été retiré, et les protoplastes ont été resuspendus dans 3 mL de milieu de régénération (cf. annexe 6). Ces nouvelles solutions contenant les protoplastes transfectés ont finalement été transférées dans des plaques de culture à 6 puits, placées pendant 16 heures à l'obscurité dans les conditions de culture, puis sous lumière pendant 15 jours. Les protoplastes régénérés ont été transférés sur un milieu Knop solide supplémenté en généticine (G418, 25 mg/L) pour la sélection des transformants. Après deux semaines, les colonies issues de protoplastes transformés deviennent visibles, et sont individuellement repiquées sur milieu Knop standard. Lorsque la quantité de matériel est suffisante, une partie des colonies est prélevée afin d'extraire l'ADN génomique et réaliser la caractérisation moléculaire des lignées.

Transformation de *M. polymorpha*

Des lignées KO de *M. polymorpha* ont été obtenues par CRISPR/Cas9 via la transformation de thalles par *A. tumefaciens*, d'après le protocole décrit par Kubota *et al.* (2013) et Sugano *et al.* (2018). Brièvement, deux semaines après semis de gemmae individuels sur milieu GB/2, les thalles ont été coupés de manière à obtenir des zones méristématiques, et transférés sur milieu GB/2 supplémenté en saccharose (1%). Trois jours après, les thalles ont été co-cultivés en présence d'une souche d'*A. tumefaciens* transformée avec le plasmide pMpGE011, dans un milieu liquide 0M51C (cf. annexe 6) pendant 2 jours à 22°C sous agitation (130 rpm). Les thalles ont ensuite été stérilisés avec de la céfotaxime (1 mg/mL) pendant 10 min, et transférés sur milieu GB/2 supplémenté en chlorsulfuron (0,5 µM) et céfotaxime (0,1 mg/mL) pour la sélection des transformants. Lorsque la quantité de matériel est suffisante, une partie des thalles est prélevée afin d'extraire l'ADN génomique et réaliser la caractérisation moléculaire des lignées.

Caractérisation des lignées génétiquement modifiées

Extraction et purification d'ADN génomique

À la suite des transformations génétiques de *P. patens* et *M. polymorpha*, l'ADN génomique (gDNA) des transformants a été extrait en plaque 96 puits DeepWell (ThermoFisher Scientific). Un gamétophore ou un morceau de thalle a été introduit dans chaque puit contenant 250 µL de tampon Edwards (Tris-HCl pH 7,5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5 %) et une bille métallique de 3 mm. Les tissus ont ensuite été broyés au TissueLyser II (Qiagen) pendant 2 minutes à 30 Hz, et centrifugés 20 min à 300 g. 100 µL de surnageant de chaque puit ont été transférés dans une plaque 96 puits contenant 75 µL d'isopropanol, en homogénéisant le mélange par pipetages successifs. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant a été retiré en retournant la plaque, qui a ensuite été déposée à l'envers sur du papier absorbant et centrifugée pendant quelques secondes à 6 g afin d'enlever entièrement l'isopropanol. La plaque a ensuite été séchée pendant 15 minutes à 37°C et 100 µL d'eau ont été ajoutés dans chaque puit. La plaque a été incubée une nuit à 4°C et l'ADN génomique a été resolubilisé par pipetages successifs.

Génotypage par PCR et séquençage

Pour la caractérisation moléculaire des lignées knock-out, des fragments de 600 pb entourant la région ciblée par CRISPR/Cas9 ont été amplifiés par PCR, avec des amorces dessinées par l'outil CRISPOR (Concordet et Haeussler, 2018) lors du choix des protospacers. Pour les lignées knock-in, la région génomique entourant la zone de recombinaison homologue a été amplifiée. Les PCRs ont été réalisées en utilisant le mix Phusion High Fidelity (ThermoFischer Scientific) dans un volume de 20 μ L, selon les instructions du fabricant. 4 μ L de solution d'ADN génomique ont servi de matrice pour les réactions. Les températures d'hybridation des amorces (T_m) ont été calculées par l'outil TM calculator (NEB ; <https://tcalculator.neb.com>). Les produits PCR ont ensuite été purifiés à l'aide de billes magnétiques ayant une affinité pour l'ADN, produites par la plateforme d'analyse de l'expression génique de l'IBMP. Les produits PCR des lignées knock-out ont été séquencés avec l'une des deux amorces ayant servi à l'amplification. Les produits PCR des lignées knock-in ont été séquencés avec une amorce par 500 pb, selon la taille de l'amplification. Le séquençage Sanger a été réalisé par la plateforme d'analyse de l'expression génique de l'IBMP. Les résultats de séquençage ont été analysés avec le logiciel MacVector, afin de détecter la nature des mutations (lignées knock-out) ou de vérifier l'intégration du fragment de recombinaison homologue (lignées knock-in) à l'endroit désiré.

Analyse de la composition de la cutine

Culture et récolte du matériel végétal

La cutine de *P. patens* a été analysée à partir de cultures liquides de gamétophores, initiées par l'inoculation de quelques gamétophores dans un milieu Knop liquide. Après huit semaines, le matériel est récolté par filtration, et l'excès d'eau est retiré par du papier absorbant. Le matériel est ensuite introduit dans un tube Falcon 50 mL alors plongé dans l'azote liquide. La cutine de *M. polymorpha* a été analysée à partir de cultures solides sur milieu GB/2. Six semaines après semi des gemmae, les thalles sont récoltés, débarrassés de leurs rhizoïdes, et introduits dans un tube Falcon 50 mL alors plongé dans l'azote liquide. Les tissus ont été conservés à -80°C avant d'être lyophilisés.

Délipidation du matériel et dépolymérisation de la cutine

Le matériel lyophilisé a été délipidé et la cutine a été dépolymérisée par transméthylation, selon une adaptation des protocoles décrits par Renault *et al.* (2017a) et Elejalde-Palmett *et al.* (2021). Environ 40 mg de tissus lyophilisés ont été broyés au TissueLyser II (Qiagen) avec deux billes métalliques de 3 mm, pendant 2 min à 30 Hz, et délipidés par une série de solvants dans des tubes en borosilicates (Pyrex[®]). Le matériel a d'abord été incubé dans 5 mL d'isopropanol à 85°C pendant 10 minutes. Après retour à température ambiante, les tubes ont été vortexés pendant 1h à l'aide d'un vortexeur multitube (Ohaus[®] ; vitesse 5). Les tubes ont ensuite été centrifugés 2 min à 1500 g, et le surnageant a été enlevé. Trois lavages successifs ont ensuite été réalisés avec des mélanges méthanol:chloroforme (1:2, 2:1, 0:1 v/v), en étant vortexés puis centrifugés de la même manière. Après un dernier lavage au méthanol 100 % sans agitation, le matériel délipidé a été évaporé au SpeedVac (ThermoFisher Scientific) en chauffant à 35°C. Environ 5 mg de matériel délipidé ont été transférés dans un nouveau tube Pyrex[®] afin d'effectuer la dépolymérisation de la cutine par transméthylaion basique. 1 mL d'une solution de méthanol anhydre contenant 15% (v/v) d'acétate de méthyle, 6% (v/v) de méthoxide de sodium et 5 µg d'heptadécanoate (C17:0 ; standard interne) ont été ajoutés à chaque échantillon. Les tubes ont été incubés 2 h à 60°C puis ramenés à température ambiante. Les monomères de cutine ont été isolés par séparation de phase, en ajoutant 2 mL de dichlorométhane, 0,25 mL d'acide acétique glacial et 0,5 mL de NaCl 0,9% dans du Tris (100 mM, pH 8,0). Les tubes ont été vortexés et les deux phases ont été séparées par 2 min de centrifugation à 1500 g. La phase organique a été transférée dans un nouveau tube et a à nouveau été lavée avec 1 mL NaCl 0,9% dans du Tris (100 mM, pH 8,0). Après centrifugation, la phase organique a été récupérée et séchée à travers 0,5 g de sulfate de sodium anhydre, puis évaporée sous un flux d'azote à température ambiante. Les résidus secs ont été resolubilisés dans 50 µL de pyridine anhydre et 50 µL de BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide), puis incubés 10 min à 90°C sous agitation (300 rpm) pour réaliser leur dérivation. 80 µL d'échantillon ont ensuite été transférés dans un vial avec insert pour être analysés par GC-TOFMS. L'analyse du glycérol contenu dans la cutine a été réalisée de manière séparée, selon le protocole décrit par Elejalde-Palmett *et al.* (2021). Environ 5 mg de matériel délipidé ont été transférés dans un microtube de 2 mL, auquel ont été ajoutés 1 mL de méthanol anhydre contenant 50 mM de méthoxide de sodium et 2,5 µg de ribiol (standard interne). Les tubes ont été incubés une nuit à 23°C sous agitation (900 rpm). Après centrifugation (20 min à 18 000 g), 700 µL de surnageant ont été transféré vers un nouveau tube

et évaporés au SpeedVac. Les résidus secs ont été resolubilisés et dérivés au BSTFA comme précédemment, afin d'être analysés par GC-TOFMS.

Analyse en GC-TOFMS

Les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC ; Agilent GC8890) couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (TOFMS ; Leco Pegasus BT2). Le gradient de température était le suivant : 120°C 1 min, 340°C à 10°C/min, 340°C 10 min. Le gaz vecteur utilisé était l'hélium avec un débit de 1 mL/min. 1 µL d'échantillon a été injecté en mode split 1:100. La température de la ligne de transfert et de la source était maintenue à 250°C. L'ionisation a été réalisée par impact électronique à 70 eV. La gamme d'acquisition des masses était de 45 à 500 Da, avec une fréquence d'acquisition de 8 spectres/s sur la gamme de masse, et une fréquence d'extraction de 32 kHz. Les composés ont été identifiés *i)* par comparaison à des molécules standards analysées dans les mêmes conditions et/ou *ii)* par interrogation des banques de spectres de fragmentations croisées avec des indices de rétention. Après identification des composés et intégration de l'aire des pics, la quantification des composés s'est faite en corrigeant les aires obtenues par un facteur de réponse de chaque standard authentique par rapport au standard interne C17:0. Ces standards correspondent aux monomères analysés sous forme méthyl-ester. A cette fin, une quantité identique de chaque standard et de C17:0 ont été analysés par GC-TOFMS dans les mêmes conditions, et la comparaison des aires de pics obtenues a permis de calculer le facteur de réponse de chaque molécule, en masse ou en quantité de matière (annexe 7). Les standards commerciaux utilisés étaient les suivants : C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C22:0, C24:0, *p*-coumarate et caféate, tous sous forme méthyl-ester. Certaines molécules n'étant pas disponibles commercialement sous forme méthyl-ester (cinnamate, ωOH-C16 et diOH-C16), les standards ont donc été produits chimiquement à partir des formes acides libres des molécules, par transméthylation acide. Pour ce faire, 200 µg de molécule et 200 µg de C17:0 ont été introduits dans 1 mL de méthanol anhydre contenant 2,5 % d'acide sulfurique. Les réactions ont été incubées une nuit à 50°C sous agitation (900 rpm). Les formes méthyl ester formées ont ensuite été extraites par séparation de phase et dérivées au BSTFA, comme décrit précédemment, pour être analysées par GC-TOFMS dans les mêmes conditions. Ne disposant pas des standards C20:4 et triOH-C18, même sous forme acide libre, ces monomères ont été quantifiés d'après les facteurs de réponse du C20:0 et du diOH-C16, respectivement. Le glycérol a été quantifié d'après son facteur de réponse par rapport au ribitol (annexe 7). Les teneurs en monomères ont ensuite été normalisées selon l'aire du standard interne (C17:0 ou ribitol) et la masse de matériel

délipidé utilisé. A l'issue des analyses quantitatives, la quantité totale de cutine a été calculée par la somme de chaque monomère (en masse). La proportion relative des types de monomères a été calculée par la somme des types de monomères (en molarité). Le ratio OH/COOH a été calculé par la somme des fonctions hydroxyles et acides carboxyliques, calculées d'après la nature chimique de chaque monomère et leur teneur (en molarité).

Analyses métaboliques

Extraction des molécules solubles

Les analyses métaboliques ont été faites sur le même matériel lyophilisé que pour l'analyse de la cutine. Les métabolites solubles ont été extraits au méthanol/chloroforme/eau, selon une adaptation du protocole décrit par Renault *et al.* (2017a). Environ 8 mg de matériel lyophilisé ont été introduits dans un microtube de 2 mL, auxquels ont été ajoutés 500 µL de méthanol. Les tubes ont été vortexés et incubés 1h à 20°C sous agitation (1400 rpm). 250 mL de chloroforme ont été ajoutés, puis les tubes ont été vortexés et incubés 5 min à 20 °C sous agitation (1400 rpm). 500 µL d'eau ont été ajoutés, puis les tubes ont été vortexés et centrifugés 30 min à 15 000 g à 4°C. 60 µL de phase eau/méthanol ont été prélevés, insérés dans un vial avec insert, pour analyse des extraits non concentrés par UHPLC-MS/MS. 600 autres µL ont été prélevés et évaporés au SpeedVac, puis repris dans 60 µL d'eau/méthanol (50:50 v/v) et insérés dans un vial avec insert, pour analyse des extraits concentrés (10X) par UHPLC-MS/MS.

Analyse en UHPLC-MS/MS

Les métabolites ont été séparés et détectés sur un système chromatographique Dionex UltiMate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific) couplé à un spectromètre de masse en tandem EvoQ Elite LC-TQ (MS/MS), équipé d'une source d'ionisation électrospray (HESI ; Bruker). 5 µL d'échantillon ont été injectés sur une colonne C18 Cortecs UPLC HSS T3 (150 x 2.1mm, 1.6 µm ; Waters), maintenue à 35°C. La phase mobile était constituée d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B), chacun supplémenté avec de l'acide formique (0,1%). Pour l'analyse des molécules phénoliques, le débit était de 0,4 mL/min et le gradient utilisé était le suivant : 0 min 5% B, 1 min 5% B, 11,5 min 100% B (courbe 8), 13 min 100% B, 14 min 5 % B, 15 min 5% B. Pour l'analyse des molécules aliphatiques, le débit était de 0,35 mL/min et le gradient utilisé était le suivant : 0 min 5% B, 6 min 50% B, 16 min 100% B, 18 min 100% B, 18,5 min 5 % B, 20 min 5% B. Après chaque injection, l'aiguille et la boucle d'injection ont

été rincées avec une solution d'acétonitrile (25%). Pour les deux méthodes chromatographiques, les paramètres du spectromètre de masse étaient identiques. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation (35 L/h) et de désolvatation (30 L/h). Les températures d'interface et de source étaient respectivement de 300°C et 350°C. La tension de capillaire était de 3,5 kV en mode positif et négatif. Le pilotage de la chromatographie et l'acquisition des données ont respectivement été réalisées avec les logiciels MS Workstation 8 et Compass Hystar 4.1 (Bruker). Les métabolites ont été ionisés par électrospray puis détectés et quantifiés selon des transitions MRM spécifiques (annexe 8). L'intégration des aires de pics a été réalisée avec le logiciel MS Data Review (Bruker). Les valeurs obtenues ont été normalisées à la quantité de matériel lyophilisé utilisée lors de l'extraction.

Coloration au bleu de toluidine

La perméabilité des gamétophores de *P. patens* et des thalles de *M. polymorpha* a été évaluée par une coloration au bleu de toluidine (TB), selon une adaptation du protocole de Xu *et al.* (2020). Les tissus ont été prélevés à partir de plantes cultivées en milieu solide, débarrassés de leur rhizoïdes, incubés pendant 30 s dans une solution de TB (0,05%) additionnée de Tween-20 (2%) et préalablement filtrée sur 0,22 µm, puis rincés abondamment à l'eau distillée. Les tissus ont été plongés individuellement dans la solution, en veillant à ne pas immerger la partie sectionnée, qui a ensuite été enlevée avant l'extraction des pigments. Un échantillon regroupe dix gamétophores ou thalles individuels regroupés dans un tube. Les échantillons ont ensuite été broyés à l'aide d'un TissueLyser II (Qiagen) dans 400 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM) avec deux billes métalliques de 3 mm, pendant 5 minutes à 30 Hz. 800 µL d'éthanol ont ensuite été ajoutés et les échantillons ont été vortexés puis centrifugés pendant 15 min à 18 000 g. Les surnageants ont été transférés dans des cuves spectrophotométriques pour mesurer leur absorbance à 626 nm (A626) et 430 nm (A430), avec un spectrophotomètre UV-visible (CARY 300 Scan, Agilent Technologies). Le niveau d'absorption du TB dans les tissus a été évalué en calculant le rapport A626/A430.

Microscopie électronique

La cuticule des gamétophores de *P. patens* a été observée sur des coupes de phyllides, par microscopie électronique à balayage. Cette technique permet d'obtenir des résultats comparables à la microscopie électronique à transmission, couramment utilisée pour observer la cuticule. Huit semaines après repiquage, des gamétophores ont été prélevés individuellement

et incubés sous vide dans une solution contenant 50 mM de tampon phosphate (KPi pH 7,0) et 3% de glutaraldéhyde. Les échantillons ont ensuite été fixés selon la méthode « OTO-fixation » décrite par Deerinck *et al.* (2010), et inclus dans une résine EPON. Les échantillons inclus ont ensuite été sectionnés à l'aide d'un module « serial-block-face» (GATAN) puis imagés par balayage avec le microscope Zeiss Sigma VP300 opéré à une tension de 4 kV. Ce travail a été réalisé par Mathieu Erhardt à la plateforme de microscopie de l'IBMP.

Analyses statistiques et création des figures

Toutes les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 9, selon des tests multiples de Student bilatéraux non appariés. Les P-values ont été corrigées selon la méthode de Holm-Šídák. Les valeurs des moyennes, des erreurs standards et des P-value sont disponibles en annexe 9. Les photographies des plantes ont été prises avec un appareil photo LUMIX DMC-LX5 (Panasonic) et une loupe binoculaire (Stemi 508, ZEISS), puis retraitées de manière homogène avec le logiciel Inkscape. Les structures chimiques ont été dessinées avec le logiciel ChemDraw.

Références

- Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S., and Dixon, R.A.** (2004). Colocalization of l-Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase for Metabolic Channeling in Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 3098–3109.
- Akoh, C.C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H., and Shaw, J.-F.** (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research* **43**: 534–552.
- Alassimone, J., Fujita, S., Doblaz, V.G., van Dop, M., Barberon, M., Kalmbach, L., Vermeer, J.E.M., Rojas-Murcia, N., Santuari, L., Hardtke, C.S., and Geldner, N.** (2016). Polarly localized kinase SGN1 is required for Casparian strip integrity and positioning. *Nature Plants* **2**: 16113.
- Alber, A. and Ehling, J.** (2012). Cytochrome P450s in Lignin Biosynthesis. In *Advances in Botanical Research* (Elsevier), pp. 113–143.
- Almagro Armenteros, J.J., Sønderby, C.K., Sønderby, S.K., Nielsen, H., and Winther, O.** (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* **33**: 3387–3395.
- Anderson, N.A., Tobimatsu, Y., Ciesielski, P.N., Ximenes, E., Ralph, J., Donohoe, B.S., Ladisch, M., and Chapple, C.** (2015). Manipulation of Guaiacyl and Syringyl Monomer Biosynthesis in an Arabidopsis Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Mutant Results in Atypical Lignin Biosynthesis and Modified Cell Wall Structure. *Plant Cell* **27**: 2195–2209.
- Anterola, A.M. and Lewis, N.G.** (2002). Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity.: 74.
- Ariizumi, T. and Toriyama, K.** (2011). Genetic Regulation of Sporopollenin Synthesis and Pollen Exine Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 437–460.
- Badger, M.R., von Caemmerer, S., Ruuska, S., and Nakano, H.** (2000). Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 1433–1446.
- Barberon, M., Vermeer, J.E.M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T.G., Humbel, B.M., Nawrath, C., Takano, J., Salt, D.E., and Geldner, N.** (2016). Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell* **164**: 447–459.
- Bargel, H.** (2005). Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1049–1060.
- Bar-On, Y.M., Phillips, R., and Milo, R.** (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**: 6506–6511.
- Barros, J., Escamilla-Trevino, L., Song, L., Rao, X., Serrani-Yarce, J.C., Palacios, M.D., Engle, N., Choudhury, F.K., Tschaplinski, T.J., Venables, B.J., Mittler, R., and Dixon, R.A.** (2019). 4-Coumarate 3-hydroxylase in the lignin biosynthesis pathway is a cytosolic ascorbate peroxidase. *Nat Commun* **10**: 1994.
- Barros, J., Serrani-Yarce, J.C., Chen, F., Baxter, D., Venables, B.J., and Dixon, R.A.** (2016). Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis. *Nature Plants* **2**: 16050.
- Barthlott, W., Mail, M., Bhushan, B., and Koch, K.** (2017). Plant Surfaces: Structures and Functions for Biomimetic Innovations. *Nano-Micro Lett.* **9**: 23.
- Bassard, J.-E. et al.** (2012). Protein-Protein and Protein-Membrane Associations in the Lignin Pathway. *The Plant Cell* **24**: 4465–4482.

- Beeckman, T., De Rycke, R., Viane, R., and Inzé, D.** (2000). Histological Study of Seed Coat Development in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* **113**: 139–148.
- Bekker, A., Holland, H.D., Wang, P.-L., Rumble, D., Stein, H.J., Hannah, J.L., Coetzee, L.L., and Beukes, N.J.** (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* **427**: 117–120.
- Berhin, A., de Bellis, D., Franke, R.B., Buono, R.A., Nowack, M.K., and Nawrath, C.** (2019). The Root Cap Cuticle: A Cell Wall Structure for Seedling Establishment and Lateral Root Formation. *Cell* **176**: 1367-1378.e8.
- Berland, H., Albert, N.W., Stavland, A., Jordheim, M., McGhie, T.K., Zhou, Y., Zhang, H., Deroles, S.C., Schwinn, K.E., Jordan, B.R., Davies, K.M., and Andersen, Ø.M.** (2019). Auronidins are a previously unreported class of flavonoid pigments that challenges when anthocyanin biosynthesis evolved in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 20232–20239.
- Bernards, M.A., Fleming, W.D., Llewellyn, D.B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A., and Plourde, G.L.** (1999). Biochemical Characterization of the Suberization-Associated Anionic Peroxidase of Potato. *Plant Physiol.* **121**: 135–146.
- Bernards, M.A., Lopez, M.L., Zajicek, J., and Lewis, N.G.** (1995). Hydroxycinnamic Acid-derived Polymers Constitute the Polyaromatic Domain of Suberin. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 7382–7386.
- Bernards, M.A. and Razem, F.A.** (2001). The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry* **57**: 1115–1122.
- Bernards, M.A., Summerhurst, D.K., and Razem, F.A.** (2004). Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochemistry Reviews* **3**: 113–126.
- Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Bris, P.L., Borrega, N., Herve, J., Blondet, E., Balzergue, S., Lapierre, C., and Jouanin, L.** Disruption of LACCASE4 and 17 Results in Tissue-Specific Alterations to Lignification of *Arabidopsis thaliana* Stems W. *The Plant Cell*, **23**: 1124-1137.
- Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraca, L., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A.-C., Métraux, J.-P., and Nawrath, C.** (2011). A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters Is Required for the Formation of a Functional Cuticle in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**: 1958–1970.
- Bjurhager, I., Olsson, A.-M., Zhang, B., Gerber, L., Kumar, M., Berglund, L.A., Burgert, I., Sundberg, B., and Salmén, L.** (2010). Ultrastructure and Mechanical Properties of Populus Wood with Reduced Lignin Content Caused by Transgenic Down-Regulation of Cinnamate 4-Hydroxylase. *Biomacromolecules* **11**: 2359–2365.
- Blee, K., Choi, J.W., O’Connell, A.P., Jupe, S.C., Schuch, W., Lewis, N.G., and Bolwell, G.P.** (2001). Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. *Phytochemistry* **57**: 1159–1166.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M.** (2003). Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519–546.
- Bowles, A.M.C., Bechtold, U., and Paps, J.** (2020). The Origin of Land Plants Is Rooted in Two Bursts of Genomic Novelty. *Current Biology* **30**: 530-536.e2.
- Bowman, J.L. et al.** (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* **171**: 287-304.e15.

- Bowman, J.L.** (2013). Walkabout on the long branches of plant evolution. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 70–77.
- Bressendorff, S., Azevedo, R., Kenchappa, C.S., Ponce de León, I., Olsen, J.V., Rasmussen, M.W., Erbs, G., Newman, M.-A., Petersen, M., and Mundy, J.** (2016). An Innate Immunity Pathway in the Moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* **28**: 1328–1342.
- Buda, G.J., Barnes, W.J., Fich, E.A., Park, S., Yeats, T.H., Zhao, L., Domozych, D.S., and Rose, J.K.C.** (2013). An ATP Binding Cassette Transporter Is Required for Cuticular Wax Deposition and Desiccation Tolerance in the Moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* **25**: 4000–4013.
- Carella, P., Gogleva, A., Hoey, D.J., Bridgen, A.J., Stolze, S.C., Nakagami, H., and Schornack, S.** (2019). Conserved Biochemical Defenses Underpin Host Responses to Oomycete Infection in an Early-Divergent Land Plant Lineage. *Current Biology* **29**: 2282-2294.e5.
- Carpenter, E.J. et al.** (2019). Access to RNA-sequencing data from 1,173 plant species: The 1000 Plant transcriptomes initiative (1KP). *GigaScience* **8**: giz126.
- Chen, F., Tobimatsu, Y., Jackson, L., Nakashima, J., Ralph, J., and Dixon, R.A.** (2013). Novel seed coat lignins in the Cactaceae: structure, distribution and implications for the evolution of lignin diversity. *Plant J* **73**: 201–211.
- Cheng, A.-X., Gou, J.-Y., Yu, X.-H., Yang, H., Fang, X., Chen, X.-Y., and Liu, C.-J.** (2013). Characterization and Ectopic Expression of a *Populus* Hydroxyacid Hydroxycinnamoyltransferase. *Molecular Plant* **6**: 1889–1903.
- Cheng, S. et al.** (2019). Genomes of Subaerial Zygnematophyceae Provide Insights into Land Plant Evolution. *Cell* **179**: 1057-1067.e14.
- Cockell, C.S. and Raven, J.A.** (2007). Ozone and life on the Archaean Earth. *Phil. Trans. R. Soc. A* **365**: 1889–1901.
- Collonnier, C., Epert, A., Mara, K., Maclot, F., Guyon-Debast, A., Charlot, F., White, C., Schaefer, D.G., and Nogu e, F.** (2017). CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnol J* **15**: 122–131.
- Concordet, J.-P. and Haeussler, M.** (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research* **46**: W242–W245.
- Cosio, C. and Dunand, C.** (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany* **60**: 391–408.
- Creff, A. et al.** (2019). A stress-response-related inter-compartmental signalling pathway regulates embryonic cuticle integrity in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **15**: e1007847.
- Dahl, T.W., Hammarlund, E.U., Anbar, A.D., Bond, D.P.G., Gill, B.C., Gordon, G.W., Knoll, A.H., Nielsen, A.T., Schovsbo, N.H., and Canfield, D.E.** Devonian rise in atmospheric oxygen correlated to the radiations of terrestrial plants and large predatory fish. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**: 17911-17915.
- Daku, R.M., Rabbi, F., Buttigieg, J., Coulson, I.M., Horne, D., Martens, G., Ashton, N.W., and Suh, D.-Y.** (2016). PpASCL, the *Physcomitrella patens* Anther-Specific Chalcone Synthase-Like Enzyme Implicated in Sporopollenin Biosynthesis, Is Needed for Integrity of the Moss Spore Wall and Spore Viability. *PLOS ONE* **11**: e0146817.
- D’Auria, J.C.** (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 331–340.

- De Giorgi, J., Piskurewicz, U., Loubery, S., Utz-Pugin, A., Bailly, C., Mène-Saffrané, L., and Lopez-Molina, L.** (2015). An Endosperm-Associated Cuticle Is Required for Arabidopsis Seed Viability, Dormancy and Early Control of Germination. *PLoS Genet* **11**: e1005708.
- Deerinck, T.J., Bushong, E.A., Thor, A., and Ellisman, M.H.** (2010). NCMIR methods for 3D EM: A new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy. *Microscopy*: 6–8.
- Del Cortona, A. et al.** (2020). Neoproterozoic origin and multiple transitions to macroscopic growth in green seaweeds. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**: 2551–2559.
- Delaux, P.-M., Séjalon-Delmas, N., Bécard, G., and Ané, J.-M.** (2013). Evolution of the plant–microbe symbiotic ‘toolkit.’ *Trends in Plant Science* **18**: 298–304.
- Delude, C., Moussu, S., Joubès, J., Ingram, G., and Domergue, F.** (2016). Plant Surface Lipids and Epidermis Development. In *Lipids in Plant and Algae Development*, Y. Nakamura and Y. Li-Beisson, eds, *Subcellular Biochemistry*. (Springer International Publishing: Cham), pp. 287–313.
- Delwiche, C.F. and Cooper, E.D.** (2015). The Evolutionary Origin of a Terrestrial Flora. *Current Biology* **25**: R899–R910.
- Delwiche, C.F., Graham, L.E., and Thomson, N.** (1989). Lignin-Like Compounds and Sporopollenin Coleochaete, an Algal Model for Land Plant Ancestry. *Science* **245**: 399–401.
- Deshmukh, A.P., Simpson, A.J., and Hatcher, P.G.** (2003). Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **64**: 1163–1170.
- Ding, L.-N., Li, M., Wang, W.-J., Cao, J., Wang, Z., Zhu, K.-M., Yang, Y.-H., Li, Y.-L., and Tan, X.-L.** (2019). Advances in plant GDSL lipases: from sequences to functional mechanisms. *Acta Physiol Plant* **41**: 151.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M.S.S., and Wang, L.** (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* **3**: 371–390.
- Dixon, R.A. and Barros, J.** (2019). Lignin biosynthesis: old roads revisited and new roads explored. *Open Biol.* **9**: 190215.
- Dobritsa, A.A., Geanconteri, A., Shrestha, J., Carlson, A., Kooyers, N., Coerper, D., Urbanczyk-Wochniak, E., Bench, B.J., Sumner, L.W., Swanson, R., and Preuss, D.** (2011). A Large-Scale Genetic Screen in Arabidopsis to Identify Genes Involved in Pollen Exine Production. *Plant Physiology* **157**: 947–970.
- Doll, N.M., Royek, S., Fujita, S., Okuda, S., Chamot, S., Stintzi, A., Widiez, T., Hothorn, M., Schaller, A., Geldner, N., and Ingram, G.** (2020). A two-way molecular dialogue between embryo and endosperm is required for seed development. *Science* **367**: 431–435.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., and Heredia, A.** (2010). Self-assembly of supramolecular lipid nanoparticles in the formation of plant biopolyester cutin. *Mol. BioSyst.* **6**: 948.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., and Heredia, A.** (2011). The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytologist* **189**: 938–949.
- Donoghue, P.C.J.** The evolutionary emergence of land plants. *Current Biology*, **31**: 1281–1298.
- Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.

- Ehltig, J., Hamberger, B., Million-Rousseau, R., and Werck-Reichhart, D.** (2006). Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochem Rev* **5**: 239–270.
- Elejalde-Palmett, C. et al.** (2021). ABCG transporters export cutin precursors for the formation of the plant cuticle. *Current Biology* **31**: 2111-2123.e9.
- Fernández, V., Guzmán-Delgado, P., Graça, J., Santos, S., and Gil, L.** (2016). Cuticle Structure in Relation to Chemical Composition: Re-assessing the Prevailing Model. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Fernández-Pérez, F., Pomar, F., Pedreño, M.A., and Novo-Uzal, E.** (2015a). The suppression of *AtPrx52* affects fibers but not xylem lignification in *Arabidopsis* by altering the proportion of syringyl units. *Physiol Plantarum* **154**: 395–406.
- Fernández-Pérez, F., Vivar, T., Pomar, F., Pedreño, M.A., and Novo-Uzal, E.** (2015b). Peroxidase 4 is involved in syringyl lignin formation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **175**: 86–94.
- Fich, E.A., Segerson, N.A., and Rose, J.K.C.** (2016). The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annual Review of Plant Biology* **67**: 207–233.
- Fischer, W.W., Hemp, J., and Valentine, J.S.** (2016). How did life survive Earth's great oxygenation? *Current Opinion in Chemical Biology* **31**: 166–178.
- Francoz, E., Ranocha, P., Le Ru, A., Martinez, Y., Fourquaux, I., Jauneau, A., Dunand, C., and Burlat, V.** (2019). Pectin Demethylesterification Generates Platforms that Anchor Peroxidases to Remodel Plant Cell Wall Domains. *Developmental Cell* **48**: 261-276.e8.
- Frangedakis, E., Waller, M., Nishiyama, T., Tsukaya, H., Xu, X., Yue, Y., Tjahjadi, M., Gunadi, A., Van Eck, J., Li, F.-W., Szövényi, P., and Sakakibara, K.** (2021). An Agrobacterium-mediated stable transformation technique for the hornwort model *Anthoceros agrestis*. *New Phytologist* **232**: 1488–1505.
- Fraser, C.M. and Chapple, C.** (2011). The Phenylpropanoid Pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* **9**: e0152.
- Fraser, W.T., Scott, A.C., Forbes, A.E.S., Glasspool, I.J., Plotnick, R.E., Kenig, F., and Lomax, B.H.** (2012). Evolutionary stasis of sporopollenin biochemistry revealed by unaltered Pennsylvanian spores. *New Phytol* **196**: 397–401.
- Fujita, S. et al.** (2020). SCHENGEN receptor module drives localized ROS production and lignification in plant roots. *EMBO J* **39**.
- Fürst-Jansen, J.M.R., de Vries, S., and de Vries, J.** (2020). Evo-physio: on stress responses and the earliest land plants. *Journal of Experimental Botany* **71**: 3254–3269.
- Gabarayeva, N.I., Grigorjeva, V.V., and Lavrentovich, M.O.** (2020). Artificial pollen walls simulated by the tandem processes of phase separation and self-assembly *in vitro*. *New Phytol* **225**: 1956–1973.
- Gibling, M.R. and Davies, N.S.** (2012). Palaeozoic landscapes shaped by plant evolution. *Nature Geosci* **5**: 99–105.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**: 343–345.
- Girard, A.-L. et al.** (2012). Tomato GDSL1 Is Required for Cutin Deposition in the Fruit Cuticle. *Plant Cell* **24**: 3119–3134.

- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G.J., and De Cooman, L.** (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *J. Phycol.* **50**: 483–492.
- Gou, J.-Y., Yu, X.-H., and Liu, C.-J.** (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 18855–18860.
- Graça, J.** (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Front. Chem.* **3**:62.
- Graça, J. and Lamosa, P.** (2010). Linear and Branched Poly(ω -hydroxyacid) Esters in Plant Cutins. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 9666–9674.
- Graça, J. and Pereira, H.** (2000). Suberin Structure in Potato Periderm: Glycerol, Long-Chain Monomers, and Glyceryl and Feruloyl Dimers. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 5476–5483.
- Graça, J. and Santos, S.** (2006a). Glycerol-derived ester oligomers from cork suberin. *Chemistry and Physics of Lipids* **144**: 96–107.
- Graça, J. and Santos, S.** (2006b). Linear Aliphatic Dimeric Esters from Cork Suberin. *Biomacromolecules* **7**: 2003–2010.
- Grace, S.C. and Logan, B.A.** (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 1499–1510.
- Gust, A.A., Pruitt, R., and Nürnberger, T.** (2017). Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science* **22**: 779–791.
- Hansen, C.C., Nelson, D.R., Møller, B.L., and Werck-Reichhart, D.** (2021). Plant cytochrome P450 plasticity and evolution. *Molecular Plant* **14**: 1244–1265.
- Hatfield, R.D., Marita, J.M., Frost, K., Grabber, J., Ralph, J., Lu, F., and Kim, H.** (2009). Grass lignin acylation: p-coumaroyl transferase activity and cell wall characteristics of C3 and C4 grasses. *Planta* **229**: 1253–1267.
- Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., and Heredia, A.** (2008). Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *Bioessays* **30**: 273–277.
- Heredia-Guerrero, J.A., San-Miguel, M.A., Sansom, M.S.P., Heredia, A., and Benítez*, J.J.** (2009). Chemical Reactions in 2D: Self-Assembly and Self-Esterification of 9(10),16-Dihydroxypalmitic Acid on Mica Surface. *Langmuir* **25**: 6869–6874.
- Herrero, J., Fernandez-Perez, F., Yebra, T., Novo-Uzal, E., Pomar, F., Guera, A., Esteban-Carrasco, A., and Zapata, J.M.** (2013). Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin biosynthesis. *Planta*, **237**: 1599-1612.
- Hiss, M., Meyberg, R., Westermann, J., Haas, F.B., Schneider, L., Schallenberg-Rüdinger, M., Ullrich, K.K., and Rensing, S.A.** (2017). Sexual reproduction, sporophyte development and molecular variation in the model moss *Physcomitrella patens* : introducing the ecotype Reute. *Plant J* **90**: 606–620.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.** (2003). Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 95–103.
- Hong, L., Brown, J., Segerson, N.A., Rose, J.K.C., and Roeder, A.H.K.** (2017). CUTIN SYNTHASE 2 Maintains Progressively Developing Cuticular Ridges in *Arabidopsis* Sepals. *Molecular Plant* **10**: 560–574.

- Hori, K. et al.** (2014). *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications* **5**: 3978.
- Ingram, G. and Nawrath, C.** (2017). The roles of the cuticle in plant development: organ adhesions and beyond. *Journal of Experimental Botany* **68**: 5307–5321.
- Isaacson, T., Kosma, D.K., Matas, A.J., Buda, G.J., He, Y., Yu, B., Pravitasari, A., Batteas, J.D., Stark, R.E., Jenks, M.A., and Rose, J.K.C.** (2009). Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *The Plant Journal* **60**: 363–377.
- Jacobowitz, J.R., Doyle, W.C., and Weng, J.-K.** (2019). PRX9 and PRX40 Are Extensin Peroxidases Essential for Maintaining Tapetum and Microspore Cell Wall Integrity during Arabidopsis Anther Development. *Plant Cell* **31**: 848–861.
- Jakobson, L., Lindgren, L.O., Verdier, G., Laanemets, K., Brosché, M., Beisson, F., and Kollist, H.** (2016). BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in Arabidopsis. *New Phytol* **211**: 614–626.
- Jardine, P.E. et al.** (2021). Sporopollenin chemistry and its durability in the geological record: an integration of extant and fossil chemical data across the seed plants. *Palaeontology* **64**: 285–305.
- Jeffree, C.E.** (2006). The Fine Structure of the Plant Cuticle. In *Biology of the Plant Cuticle*, M. Riederer and C. Müller, eds (Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK), pp. 11–125.
- Jiao, C. et al.** (2020). The *Penium margaritaceum* Genome: Hallmarks of the Origins of Land Plants. *Cell* **181**: 1097–1111.e12.
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J.D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., and Zipfel, C.** (2014). Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Molecular Cell* **54**: 43–55.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermini, L.S.** (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* **14**: 587–589.
- Karlen, S.D. et al.** (2016). Monolignol ferulate conjugates are naturally incorporated into plant lignins. *Sci. Adv.* **2**: e1600393.
- Kenrick, P., Wellman, C.H., Schneider, H., and Edgecombe, G.D.** (2012). A timeline for terrestrialization: consequences for the carbon cycle in the Palaeozoic. *Phil. Trans. R. Soc. B* **367**: 519–536.
- Kikuta, Y., Ueda, H., Takahashi, M., Mitsumori, T., Yamada, G., Sakamori, K., Takeda, K., Furutani, S., Nakayama, K., Katsuda, Y., Hatanaka, A., and Matsuda, K.** (2012). Identification and characterization of a GDSL lipase-like protein that catalyzes the ester-forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium*- a new target for plant protection: GDSL lipase biosynthesizing pyrethrins. *The Plant Journal* **71**: 183–193.
- Kim, S.S. and Douglas, C.J.** (2013). Sporopollenin monomer biosynthesis in arabidopsis. *J. Plant Biol.* **56**: 1–6.
- Kissinger, M., Tuvia-Alkalai, S., Shalom, Y., Fallik, E., Elkind, Y., Jenks, M.A., and Goodwin, M.S.** (2005). Characterization of Physiological and Biochemical Factors Associated with Postharvest Water Loss in Ripe Pepper Fruit during Storage. *J. Hort. Sci. Biotech.* **130**: 735–741.

- Kondo, S., Hori, K., Sasaki-Sekimoto, Y., Kobayashi, A., Kato, T., Yuno-Ohta, N., Nobusawa, T., Ohtaka, K., Shimojima, M., and Ohta, H.** (2016). Primitive Extracellular Lipid Components on the Surface of the Charophytic Alga *Klebsormidium flaccidum* and Their Possible Biosynthetic Pathways as Deduced from the Genome Sequence. *Front. Plant Sci.* **7**: 952.
- Kong, L., Liu, Y., Zhi, P., Wang, X., Xu, B., Gong, Z., and Chang, C.** (2020). Origins and Evolution of Cuticle Biosynthetic Machinery in Land Plants. *Plant Physiol.* **184**: 1998–2010.
- Kriegshausser, L.** (2018). La mousse *Physcomitrella patens*, un modèle pour explorer l'évolution et l'ingénierie du métabolisme phénolique. Université de Strasbourg, thèse soutenue en septembre 2018
- Kriegshausser, L., Knosp, S., Grienenberger, E., Tatsumi, K., Gütle, D.D., Sørensen, I., Herrgott, L., Zumsteg, J., Rose, J.K.C., Reski, R., Werck-Reichhart, D., and Renault, H.** (2021). Function of the HYDROXYCINNAMOYL-CoA:SHIKIMATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE is evolutionarily conserved in embryophytes. *The Plant Cell* **33**: 1472–1491.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K.A.S., Becker, D., and Hedrich, R.** (2010). Perception of the Arabidopsis Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor AtPEPR1 and Its Close Homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 13471–13479.
- Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., and Kohchi, T.** (2013). Efficient *Agrobacterium* -Mediated Transformation of the Liverwort *Marchantia polymorpha* Using Regenerating Thalli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77**: 167–172.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., Bär, S., Voisin, D., Efremova, N., Franke, R., Schreiber, L., Saedler, H., Métraux, J.-P., and Yephremov, A.** (2006). The Epidermis-Specific Extracellular BODYGUARD Controls Cuticle Development and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 321–339.
- Kutschera, U. and Niklas, K.J.** (2007). The epidermal-growth-control theory of stem elongation: An old and a new perspective. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1395–1409.
- Labandeira, C.C.** (2013). A paleobiologic perspective on plant–insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 414–421.
- Lai, C.-P., Huang, L.-M., Chen, L.-F.O., Chan, M.-T., and Shaw, J.-F.** (2017). Genome-wide analysis of GDSL-type esterases/lipases in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **95**: 181–197.
- Lan, W., Lu, F., Regner, M., Zhu, Y., Rencoret, J., Ralph, S.A., Zakai, U.I., Morreel, K., Boerjan, W., and Ralph, J.** (2015). Tricin, a Flavonoid Monomer in Monocot Lignification. *Plant Physiology* **167**: 1284–1295.
- Lee, S.B., Yang, S.U., Pandey, G., Kim, M., Hyung, S., Choi, D., Shin, J.S., and Suh, M.C.** (2020). Occurrence of land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferases is essential for cuticle formation and gametophore development in *Physcomitrella patens*. *New Phytol* **225**: 2468–2483.
- Lee, Y. et al.** (2018). A Lignin Molecular Brace Controls Precision Processing of Cell Walls Critical for Surface Integrity in *Arabidopsis*. *Cell* **173**: 1468–1480.e9.
- Lee, Y., Rubio, M.C., Alassimone, J., and Geldner, N.** (2013). A Mechanism for Localized Lignin Deposition in the Endodermis. *Cell* **153**: 402–412.

- Lehtonen, M.T., Akita, M., Frank, W., Reski, R., and Valkonen, J.P.T.** (2012). Involvement of a Class III Peroxidase and the Mitochondrial Protein TSPO in Oxidative Burst Upon Treatment of Moss Plants with a Fungal Elicitor. *MPMI* **25**: 363–371.
- Leide, J., Hildebrandt, U., Reussing, K., Riederer, M., and Vogg, G.** (2007). The Developmental Pattern of Tomato Fruit Wax Accumulation and Its Impact on Cuticular Transpiration Barrier Properties: Effects of a Deficiency in a β -Ketoacyl-Coenzyme A Synthase (LeCER6). *Plant Physiol.* **144**: 1667–1679.
- Lenton, T.M.** (2012). First plants cooled the Ordovician. *NATURE GEOSCIENCE* **5**: 4.
- Lenton, T.M., Dahl, T.W., Daines, S.J., Mills, B.J.W., Ozaki, K., Saltzman, M.R., and Porada, P.** (2016). Earliest land plants created modern levels of atmospheric oxygen. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 9704–9709.
- Lenton, T.M., Daines, S.J., and Mills, B.J.W.** (2018). COPSE reloaded: An improved model of biogeochemical cycling over Phanerozoic time. *Earth-Science Reviews* **178**: 1–28.
- Li, F.-S., Phyto, P., Jacobowitz, J., Hong, M., and Weng, J.-K.** (2019). The molecular structure of plant sporopollenin. *Nature Plants* **5**: 41–46.
- Li, F.-W. et al.** (2020). Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nat. Plants* **6**: 259–272.
- Li, Y., Beisson, F., Koo, A.J.K., Molina, I., Pollard, M., and Ohlrogge, J.** (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 18339–18344.
- Liang, X. and Zhou, J.-M.** (2018). Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 267–299.
- Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J., and Beisson, F.** (2009). Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 22008–22013.
- Ligrone, R., Carafa, A., Duckett, J.G., Renzaglia, K.S., and Ruel, K.** (2008). Immunocytochemical detection of lignin-related epitopes in cell walls in bryophytes and the charalean alga *Nitella*. *Plant Syst Evol* **270**: 257–272.
- Ligrone, R., Duckett, J.G., and Renzaglia, K.S.** (2000). Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 795–813.
- Liu, Z., Tavares, R., Forsythe, E.S., André, F., Lugan, R., Jonasson, G., Boutet-Mercey, S., Tohge, T., Beilstein, M.A., Werck-Reichhart, D., and Renault, H.** (2016). Evolutionary interplay between sister cytochrome P450 genes shapes plasticity in plant metabolism. *Nat Commun* **7**: 13026.
- Lopez-Casado, G., Matas, A.J., Dominguez, E., Cuartero, J., and Heredia, A.** (2007). Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3875–3883.
- Lopez-Obando, M., Hoffmann, B., Géry, C., Guyon-Debast, A., Téoulé, E., Rameau, C., Bonhomme, S., and Nogué, F.** (2016). Simple and Efficient Targeting of Multiple Genes Through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *G3* **6**: 3647–3653.
- Lozano-Fernandez, J., Carton, R., Tanner, A.R., Puttick, M.N., Blaxter, M., Vinther, J., Olesen, J., Giribet, G., Edgecombe, G.D., and Pisani, D.** (2016). A molecular palaeobiological exploration of arthropod terrestrialization. *Phil. Trans. R. Soc. B* **371**: 20150133.

- Lü, S., Song, T., Kosma, D.K., Parsons, E.P., Rowland, O., and Jenks, M.A.** (2009). *Arabidopsis CER8* encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *The Plant Journal* **59**: 553–564.
- Lulai, E.C. and Corsini, D.L.** (1998). Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**: 209–222.
- Maberly, S.C.** (2014). The fitness of the environments of air and water for photosynthesis, growth, reproduction and dispersal of photoautotrophs: An evolutionary and biogeochemical perspective. *Aquatic Botany* **118**: 4–13.
- MacDougall, A.J., Rigby, M., and Ring, S.G.** (1997). Phase Separation of Plant Cell Wall Polysaccharides and Its Implications for Cell Wall Assembly'. **114**: 10.
- Mallett, D. R., Chang, M., Cheng, X., & Bezanilla, M.** (2019). Efficient and modular CRISPR-Cas9 vector system for *Physcomitrella patens*. *Plant Direct* **3**: e00168.
- Martone, P.T., Estevez, J.M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M.W., Somerville, C., and Ralph, J.** (2009). Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Current Biology* **19**: 169–175.
- Marzol, E. et al.** (2020). Class III peroxidases target extensins during root hair growth in *Arabidopsis thaliana*. (bioRxiv) <https://doi.org/10.1101/2020.02.04.932376>
- Mayer, A.** (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551–565.
- Mbadinga Mbadinga, D.L., Li, Q., Ranocha, P., Martinez, Y., and Dunand, C.** (2020). Global analysis of non-animal peroxidases provides insights into the evolution of this gene family in the green lineage. *Journal of Experimental Botany* **71**: 3350–3360.
- McDaniel, S.F.** (2021). Bryophytes are not early diverging land plants. *New Phytol*: nph.17241.
- Miguel, S. et al.** (2020). A GDSL lipase-like from *Ipomoea batatas* catalyzes efficient production of 3,5-diCQA when expressed in *Pichia pastoris*. *Commun Biol* **3**: 673.
- Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A., and Lanfear, R.** (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution* **37**: 1530–1534.
- Mittag, J., Šola, I., Rusak, G., and Ludwig-Müller, J.** (2015). *Physcomitrella patens* auxin conjugate synthetase (GH3) double knockout mutants are more resistant to *Pythium* infection than wild type. *Journal of Plant Physiology* **183**: 75–83.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490–498.
- Mizutani, M. and Ohta, D.** (2010). Diversification of P450 Genes During Land Plant Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 291–315.
- Mizutani, M., Ohta, D., and Sato, R.** Isolation of a cDNA and a Genomic Clone Encoding Cinnamate 4-Hydroxylase from *Arabidopsis* and Its Expression Manner in *Planta*. *Plant Physiology*, **113**: 755-763 9.
- Mizutani, M., Ward, E., Dimaio, J., Ohta, D., Ryals, J., and Sato, R.** (1993). Molecular Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding Mung Bean Cytochrome P450 (P450C4H) Possessing Cinnamate 4-Hydroxylase Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **190**: 875–880.

- Mølgaard, A., Kauppinen, S., and Larsen, S.** (2000). Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* **8**: 373–383.
- Molina, I., Bonaventure, G., Ohlrogge, J., and Pollard, M.** (2006). The lipid polyester composition of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* seeds. *Phytochemistry* **67**: 2597–2610.
- Molina, I. and Kosma, D.** (2015). Role of HXXXD-motif/BAHD acyltransferases in the biosynthesis of extracellular lipids. *Plant Cell Reports* **34**: 587–601.
- Molina, I., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2009). Identification of an *Arabidopsis* Feruloyl-Coenzyme A Transferase Required for Suberin Synthesis. *PLANT PHYSIOLOGY* **151**: 1317–1328.
- Molina, I., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2007). Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*: Lipid polyesters in seed coats. *The Plant Journal* **53**: 437–449.
- Morris, J.L., Leake, J.R., Stein, W.E., Berry, C.M., Marshall, J.E.A., Wellman, C.H., Milton, J.A., Hillier, S., Mannolini, F., Quirk, J., and Beerling, D.J.** (2015). Investigating Devonian trees as geo-engineers of past climates: linking palaeosols to palaeobotany and experimental geobiology. *Palaeontology* **58**: 787–801.
- Morris, J.L., Puttick, M.N., Clark, J.W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C.H., Yang, Z., Schneider, H., and Donoghue, P.C.J.** (2018). The timescale of early land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**: E2274–E2283.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P.** (2010). Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 360–376.
- Nakashima, J., Chen, F., Jackson, L., Shadle, G., and Dixon, R.A.** (2008). Multi-site genetic modification of monolignol biosynthesis in alfalfa (*Medicago sativa*): effects on lignin composition in specific cell types. *New Phytologist* **179**: 738–750.
- Nakayama, T., Shinohara, H., Tanaka, M., Baba, K., Ogawa-Ohnishi, M., and Matsubayashi, Y.** (2017). A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in *Arabidopsis* roots. *Science* **355**: 284–286.
- Naramoto, S., Hata, Y., Fujita, T., and Kyojuka, J.** (2021). The bryophytes *Physcomitrium patens* and *Marchantia polymorpha* as model systems for studying evolutionary cell and developmental biology in plants. *The Plant Cell* **0**: 1-19.
- Naranjo, M.A., Forment, J., Roldan, M., Serrano, R., and Vicente, O.** (2006). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* **29**: 1890–1900.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C., Franke, R., Nawrath, C., and Geldner, N.** (2012). Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 10101–10106.
- Nawrath, C.** (2006). Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 281–287.
- Niklas, K.J., Cobb, E.D., and Matas, A.J.** (2017). The evolution of hydrophobic cell wall biopolymers: from algae to angiosperms. *Journal of Experimental Botany* **68**: 5261–5269.
- Okuda, S., Fujita, S., Moretti, A., Hohmann, U., Doblas, V.G., Ma, Y., Pfister, A., Brandt, B., Geldner, N., and Hothorn, M.** (2020). Molecular mechanism for the recognition of sequence-

- divergent CIF peptides by the plant receptor kinases GSO1/SGN3 and GSO2. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**: 2693–2703.
- Oliver, M.J.** (2005). Desiccation Tolerance in Bryophytes: A Reflection of the Primitive Strategy for Plant Survival in Dehydrating Habitats? *Integrative and Comparative Biology* **45**: 788–799.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Bocobza, S., Franke, R.B., Schreiber, L., and Aharoni, A.** (2010). The Arabidopsis DSO/ABCG11 Transporter Affects Cutin Metabolism in Reproductive Organs and Suberin in Roots. *Molecular Plant* **3**: 563–575.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L., and Aharoni, A.** (2011). The Arabidopsis ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytologist* **190**: 113–124.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L., and Aharoni, A.** (2009). The Arabidopsis DCR Encoding a Soluble BAHD Acyltransferase Is Required for Cutin Polyester Formation and Seed Hydration Properties. **151**: 17.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., and Dunand, C.** (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* **24**: 255–265.
- Passardi, F., Penel, C., and Dunand, C.** (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**: 534–540.
- Payne, J.L. et al.** (2011). The evolutionary consequences of oxygenic photosynthesis: a body size perspective. *Photosynth Res* **107**: 37–57.
- Pfister, A. et al.** (2014). A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *eLife* **3**: e03115.
- Philippe, G., Gaillard, C., Petit, J., Geneix, N., Dalgalarrodo, M., Bres, C., Mauxion, J.-P., Franke, R., Rothan, C., Schreiber, L., Marion, D., and Bakan, B.** (2016). Ester Cross-Link Profiling of the Cutin Polymer of Wild-Type and Cutin Synthase Tomato Mutants Highlights Different Mechanisms of Polymerization. *Plant Physiol.* **170**: 807–820.
- Philippe, G., Geneix, N., Petit, J., Guillon, F., Sandt, C., Rothan, C., Lahaye, M., Marion, D., and Bakan, B.** (2020a). Assembly of tomato fruit cuticles: a cross-talk between the cutin polyester and cell wall polysaccharides. *New Phytol* **226**: 809–822.
- Philippe, G., Sørensen, I., Jiao, C., Sun, X., Fei, Z., Domozych, D.S., and Rose, J.K.** (2020b). Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. *Current Opinion in Plant Biology* **55**: 11–20.
- Pineau, E., Sauveplane, V., Grienberger, E., Bassard, J.-E., Beisson, F., and Pinot, F.** (2021). CYP77B1 a fatty acid epoxygenase specific to flowering plants. *Plant Science* **307**: 110905.
- Pineau, E., Xu, L., Renault, H., Trolet, A., Navrot, N., Ullmann, P., Légeret, B., Verdier, G., Beisson, F., and Pinot, F.** (2017). *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers. *New Phytol* **215**: 173–186.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J.B.** (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* **13**: 236–246.
- Ponce de León, I., Oliver, J.P., Castro, A., Gaggero, C., Bentancor, M., and Vidal, S.** (2007). *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* **7**: 52.

- Popper, Z.A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T., Tuohy, M.G., Kloareg, B., and Stengel, D.B.** (2011). Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 567–590.
- Porada, P., Lenton, T.M., Pohl, A., Weber, B., Mander, L., Donnadiou, Y., Beer, C., Pöschl, U., and Kleidon, A.** (2016). High potential for weathering and climate effects of non-vascular vegetation in the Late Ordovician. *Nat Commun* **7**: 12113.
- Proctor, M.C.F. and Tuba, Z.** (2002). Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities? *New Phytologist* **156**: 327–349.
- Proost, S. and Mutwil, M.** (2018). CoNekT: an open-source framework for comparative genomic and transcriptomic network analyses. *Nucleic Acids Research* **46**: W133–W140.
- Puttick, M.N., Morris, J.L., Williams, T.A., Cox, C.J., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C.H., Schneider, H., Pisani, D., and Donoghue, P.C.J.** (2018). The Interrelationships of Land Plants and the Nature of the Ancestral Embryophyte. *Current Biology* **28**: 733-745.e2.
- Quilichini, T.D., Grienberger, E., and Douglas, C.J.** (2015). The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry* **113**: 170–182.
- Rabbi, F., Renzaglia, K.S., Ashton, N.W., and Suh, D.-Y.** (2020). Reactive oxygen species are required for spore-wall formation in *Physcomitrella patens*. *Botany* **98**: 575–587.
- Rabbi, F.** (2020b). Targeted knockouts of selected GDSL esterases and class III peroxidases in the moss *Physcomitrella patens* reveal their roles in spore wall formation and germination. Faculty of Graduate Studies and Research, University of Regina, Saskatchewan. Thesis defend on June 2020.
- Ralph, J.** (2010). Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem Rev* **9**: 65–83.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Grabber, J.H., and Steinhart, H.** (2004). Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews* **3**: 79–96.
- Rani, S.H., Krishna, T.H.A., Saha, S., Negi, A.S., and Rajasekharan, R.** (2010). Defective in Cuticular Ridges (*DCR*) of *Arabidopsis thaliana*, a Gene Associated with Surface Cutin Formation, Encodes a Soluble Diacylglycerol Acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **285**: 38337–38347.
- Rautengarten, C., Ebert, B., Ouellet, M., Nafisi, M., Baidoo, E.E.K., Benke, P., Stranne, M., Mukhopadhyay, A., Keasling, J.D., Sakuragi, Y., and Scheller, H.V.** (2012). *Arabidopsis* Deficient in Cutin Ferulate Encodes a Transferase Required for Feruloylation of -Hydroxy Fatty Acids in Cutin Polyester. *PLANT PHYSIOLOGY* **158**: 654–665.
- Reddy, M.S.S., Chen, F., Shadle, G., Jackson, L., Aljoe, H., and Dixon, R.A.** (2005). Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 16573–16578.
- Renault, H. et al.** (2017a). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature Communications* **8**: 14713.
- Renault, H., De Marothy, M., Jonasson, G., Lara, P., Nelson, D.R., Nilsson, I., André, F., von Heijne, G., and Werck-Reichhart, D.** (2017b). Gene Duplication Leads to Altered Membrane Topology of a Cytochrome P450 Enzyme in Seed Plants. *Molecular Biology and Evolution* **34**: 2041–2056.

- Renault, H., Werck-Reichhart, D., and Weng, J.-K.** (2019). Harnessing lignin evolution for biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology* **56**: 105–111.
- Rencoret, J., Neiva, D., Marques, G., Gutiérrez, A., Kim, H., Gominho, J., Pereira, H., Ralph, J., and del Río, J.C.** (2019). Hydroxystilbene Glucosides Are Incorporated into Norway Spruce Bark Lignin. *Plant Physiol.* **180**: 1310–1321.
- Rensing, S.A.** (2020). How Plants Conquered Land. *Cell* **181**: 964–966.
- Rensing, S.A. et al.** (2008). The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* **319**: 64–69.
- Reski, R.** (2018). Enabling the water-to-land transition. *Nature Plants* **4**: 67–68.
- Ricci, E.** Investigating the Leaf Cuticle of the Moss *Physcomitrella Patens*.
- Río, J.C. del, Rencoret, J., Gutiérrez, A., Kim, H., and Ralph, J.** (2018). Structural Characterization of Lignin from Maize (*Zea mays* L.) Fibers: Evidence for Diferuloylputrescine Incorporated into the Lignin Polymer in Maize Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**(17): 4402–4413.
- Rojas-Murcia, N., Hématy, K., Lee, Y., Emonet, A., Ursache, R., Fujita, S., De Bellis, D., and Geldner, N.** (2020). High-order mutants reveal an essential requirement for peroxidases but not laccases in Casparian strip lignification. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**: 29166–29177.
- Roppolo, D., De Rybel, B., Tendon, V.D., Pfister, A., Alassimone, J., Vermeer, J.E.M., Yamazaki, M., Stierhof, Y.-D., Beeckman, T., and Geldner, N.** (2011). A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* **473**: 380–383.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**: 247–259.
- Salminen, T., Eklund, D., Joly, V., Blomqvist, K., Matton, D., and Edqvist, J.** (2018). Deciphering the Evolution and Development of the Cuticle by Studying Lipid Transfer Proteins in Mosses and Liverworts. *Plants* **7**: 6.
- Sauveplane, V., Kandel, S., Kastner, P.-E., Ehlting, J., Compagnon, V., Werck-Reichhart, D., and Pinot, F.** (2009). *Arabidopsis thaliana* CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants: CYP77A4, an epoxy fatty acid-forming enzyme. *FEBS Journal* **276**: 719–735.
- Savaldi-Goldstein, S., Peto, C., and Chory, J.** (2007). The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* **446**: 199–202.
- Schalk, M., Cabello-Hurtado, F., Pierrel, M.-A., Atanassova, R., Saindrenan, P., and Werck-Reichhart, D.** (1998). Piperonylic Acid, a Selective, Mechanism-Based Inactivator of the *trans*-Cinnamate 4-Hydroxylase: A New Tool to Control the Flux of Metabolites in the Phenylpropanoid Pathway1. *Plant Physiology* **118**: 209–218.
- Schilmiller, A.L., Stout, J., Weng, J.-K., Humphreys, J., Ruegger, M.O., and Chapple, C.** (2009). Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*: *Arabidopsis* C4H mutants. *The Plant Journal* **60**: 771–782.
- Schnurr, J., Shockey, J., and Browse, J.** (2004). The Acyl-CoA Synthetase Encoded by *LACS2* Is Essential for Normal Cuticle Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 629–642.
- Schreiber, L.** (2010). Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* **15**: 546–553.

- Schreiber, L. and Schönherr, J.** (2009). Water and solute permeability of plant cuticles: measurement and data analysis (Springer: Berlin ; New York).
- Schweikert, C., Liskay, A., and Schopfer, P.** (2000). Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry* **53**: 565–570.
- Seale, M.** (2020). The Fat of the Land: Cuticle Formation in Terrestrial Plants. *Plant Physiol.* **184**: 1622–1624.
- Segado, P., Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A., and Domínguez, E.** (2020). Cutinsomes and CUTIN SYNTHASE1 Function Sequentially in Tomato Fruit Cutin Deposition. *Plant Physiol.* **183**: 1622–1637.
- Selosse, M., Strullu-Derrien, C., Martin, F.M., Kamoun, S., and Kenrick, P.** (2015). Plants, fungi and oomycetes: a 400-million year affair that shapes the biosphere. *New Phytol* **206**: 501–506.
- Serra, O., Chatterjee, S., Huang, W., and Stark, R.E.** (2012). Mini-review: What nuclear magnetic resonance can tell us about protective tissues. *Plant Science* **195**: 120–124.
- Serra, O., Hohn, C., Franke, R., Prat, S., Molinas, M., and Figueras, M.** (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm: FHT function in potato periderm. *The Plant Journal* **62**: 277–290.
- Sewalt, Vjh., Ni, W., Blount, J.W., Jung, H.G., Masoud, S.A., Howles, P.A., Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1997). Reduced Lignin Content and Altered Lignin Composition in Transgenic Tobacco Down-Regulated in Expression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase or Cinnamate 4-Hydroxylase. *Plant Physiology* **115**: 41–50.
- Shi, R., Sun, Y.-H., Li, Q., Heber, S., Sederoff, R., and Chiang, V.L.** (2010). Towards a Systems Approach for Lignin Biosynthesis in *Populus trichocarpa*: Transcript Abundance and Specificity of the Monoglignol Biosynthetic Genes. *Plant and Cell Physiology* **51**: 144–163.
- Shigeto, J., Itoh, Y., Hirao, S., Ohira, K., Fujita, K., and Tsutsumi, Y.** (2015). Simultaneously disrupting *AtPrx2*, *AtPrx25* and *AtPrx71* alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem: Lignin alteration by simultaneous disruption of *AtPrx* genes. *J. Integr. Plant Biol.* **57**: 349–356.
- Shigeto, J., Nagano, M., Fujita, K., and Tsutsumi, Y.** (2014). Catalytic Profile of *Arabidopsis* Peroxidases, *AtPrx-2*, *25* and *71*, Contributing to Stem Lignification. *PLoS ONE* **9**: e105332.
- Shiu, S.-H. and Bleecker, A.B.** (2003). Expansion of the Receptor-Like Kinase/Pelle Gene Family and Receptor-Like Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**: 530–543.
- Shiu, S.-H. and Bleecker, A.B.** (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 10763–10768.
- Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P., Métraux, J.-P., and Nawrath, C.** Transgenic *Arabidopsis* Plants Expressing a Fungal Cutinase Show Alterations in the Structure and Properties of the Cuticle and Postgenital Organ Fusions. *The Plant Cell*, **12**: 721–737.
- Siegel, S.M.** (1969). EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF LIGNIN IN MOSS GAMETOPHYTES. *American Journal of Botany* **56**: 175–179.
- Smith, R.A., Schuetz, M., Karlen, S.D., Bird, D., Tokunaga, N., Sato, Y., Mansfield, S.D., Ralph, J., and Samuels, A.L.** (2017). Defining the Diverse Cell Populations Contributing to Lignification in *Arabidopsis* Stems. *Plant Physiol.* **174**: 1028–1036.

- Sørensen, I., Pettolino, F.A., Bacic, A., Ralph, J., Lu, F., O'Neill, M.A., Fei, Z., Rose, J.K.C., Domozych, D.S., and Willats, W.G.T.** (2011). The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls: *Cell-wall evolution and the Charophycean green algae*. *The Plant Journal* **68**: 201–211.
- Strotbek, C., Krinninger, S., and Frank, W.** (2013). The moss *Physcomitrella patens*: methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *Int. J. Dev. Biol.* **57**: 553–564.
- Sugano, S.S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K., and Kohchi, T.** (2018). Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS ONE* **13**: e0205117.
- Takahashi, K., Shimada, T., Kondo, M., Tamai, A., Mori, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2010). Ectopic Expression of an Esterase, Which is a Candidate for the Unidentified Plant Cutinase, Causes Cuticular Defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **51**: 123–131.
- Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M., and Machida, Y.** (2004). A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **37**: 139–146.
- Taylor, E.L., Taylor, T.N., and Krings, M.** (2009). *Paleobotany: The Biology and Evolution of Fossil Plants* (Academic Press).
- Teutschbein, J., Gross, W., Nimitz, M., Milkowski, C., Hause, B., and Strack, D.** (2010). Identification and Localization of a Lipase-like Acyltransferase in Phenylpropanoid Metabolism of Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Biological Chemistry* **285**: 38374–38381.
- The commonness of rarity: Global and future distribution of rarity across land plants** (2019). *SCIENCE ADVANCES*: 14.
- Tian, S., Fang, X., Wang, W., Yu, B., Cheng, X., Qiu, F., Mort, A.J., and Stark, R.E.** (2008). Isolation and Identification of Oligomers from Partial Degradation of Lime Fruit Cutin. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 10318–10325.
- Tobimatsu, Y., Chen, F., Nakashima, J., Escamilla-Treviño, L.L., Jackson, L., Dixon, R.A., and Ralph, J.** (2013). Coexistence but Independent Biosynthesis of Catechyl and Guaiacyl/Syringyl Lignin Polymers in Seed Coats. *The Plant Cell* **25**: 2587–2600.
- Tsuwamoto, R., Fukuoka, H., and Takahata, Y.** (2007). GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos: GASSHO gene function in embryos. *The Plant Journal* **54**: 30–42.
- Updegraff, E.P., Zhao, F., and Preuss, D.** (2009). The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen. *Sexual Plant Reproduction* **22**: 197–204.
- Ursache, R. et al.** (2021). GDSSL-domain proteins have key roles in suberin polymerization and degradation. *Nat. Plants* **7**: 353–364.
- Vanholme, R. et al.** (2013). Caffeoyl Shikimate Esterase (CSE) Is an Enzyme in the Lignin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Science* **341**: 1103–1106.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* **153**: 895–905.

- Vermeij, G.J.** (2016). Gigantism and Its Implications for the History of Life. *PLoS ONE* **11**: e0146092.
- Vignolini, S., Moyroud, E., Hingant, T., Banks, H., Rudall, P.J., Steiner, U., and Glover, B.J.** (2015). The flower of *Hibiscus trionum* is both visibly and measurably iridescent. *New Phytol* **205**: 97–101.
- de Visser, J.A.G.M., Cooper, T.F., and Elena, S.F.** (2011). The causes of epistasis. *Proc. R. Soc. B.* **278**: 3617–3624.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* **3**: 2–20.
- de Vries, J. and Archibald, J.M.** (2018). Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist* **217**: 1428–1434.
- de Vries, J., Curtis, B.A., Gould, S.B., and Archibald, J.M.** (2018). Embryophyte stress signaling evolved in the algal progenitors of land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**: E3471–E3480.
- de Vries, J., de Vries, S., Slamovits, C.H., Rose, L.E., and Archibald, J.M.** (2017). How Embryophytic is the Biosynthesis of Phenylpropanoids and their Derivatives in Streptophyte Algae? *Plant and Cell Physiology* **58**: 934–945.
- Vries, S., Fürst-Jansen, J.M.R., Irisarri, I., Dhabalia Ashok, A., Ischebeck, T., Feussner, K., Abreu, I.N., Petersen, M., Feussner, I., and Vries, J.** (2021). The evolution of the phenylpropanoid pathway entailed pronounced radiations and divergences of enzyme families. *Plant J* **107**: 975–1002.
- Wang, S. et al.** (2020). Genomes of early-diverging streptophyte algae shed light on plant terrestrialization. *Nat. Plants* **6**: 95–106.
- Wang, W., Tian, S., and Stark, R.E.** (2010). Isolation and Identification of Triglycerides and Ester Oligomers from Partial Degradation of Potato Suberin. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 1040–1045.
- Ward, P., Labandeira, C., Laurin, M., and Berner, R.A.** (2006). Confirmation of Romer’s Gap as a low oxygen interval constraining the timing of initial arthropod and vertebrate terrestrialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 16818–16822.
- Watanabe, Y., Martini, J.E.J., and Ohmoto, H.** (2000). Geochemical evidence for terrestrial ecosystems 2.6 billion years ago. *Nature* **408**: 574–578.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., and Schwede, T.** (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **46**: W296–W303.
- Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., and Yephremov, A.** (2001). Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid -hydroxylation in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 9694–9699.
- Weng, J. and Chapple, C.** (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist* **187**: 273–285.
- Weng, J.-K., Akiyama, T., Ralph, J., and Chapple, C.** (2011). Independent Recruitment of an O-Methyltransferase for Syringyl Lignin Biosynthesis in *Selaginella moellendorffii*. *The Plant Cell* **23**: 2708–2724.
- Weng, J.-K. and Chapple, C.** (2010b). The origin and evolution of lignin biosynthesis: Tansley review. *New Phytologist* **187**: 273–285.

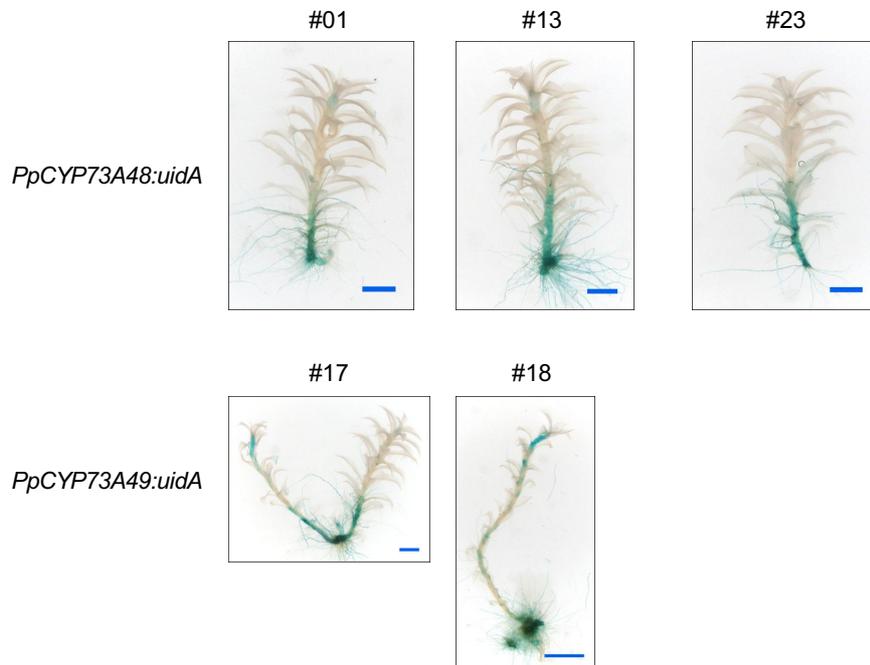
- Wickett, N.J. et al.** (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: E4859–E4868.
- Wohl, J. and Petersen, M.** (2020). Functional expression and characterization of cinnamic acid 4-hydroxylase from the hornwort *Anthoceros agrestis* in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Rep* **39**: 597–607.
- Wolf, L., Rizzini, L., Stracke, R., Ulm, R., and Rensing, S.A.** (2010). The Molecular and Physiological Responses of *Physcomitrella patens* to Ultraviolet-B Radiation. *Plant Physiology* **153**: 1123–1134.
- Xiao, F., Mark Goodwin, S., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M.A., and Zhou, J.-M.** (2004). *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J* **23**: 2903–2913.
- Xin, A. and Herburger, K.** (2021). Mini Review: Transport of Hydrophobic Polymers Into the Plant Apoplast. *Front. Plant Sci.* **11**: 590990.
- Xu, B., Taylor, L., Pucker, B., Feng, T., Glover, B.J., and Brockington, S.F.** (2020). The land plant-specific MIXTA-MYB lineage is implicated in the early evolution of the plant cuticle and the colonization of land. *New Phytologist*, **229**: 2324–2338.
- Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M., and Ohlrogge, J.** (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 12040–12045.
- Yang, W., Simpson, J.P., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M., and Ohlrogge, J.B.** (2012). A Land-Plant-Specific Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Family in *Arabidopsis*: Substrate Specificity, sn-2 Preference, and Evolution. *Plant Physiology* **160**: 638–652.
- Yang, W.-L. and Bernards, M.A.** (2007). Metabolite profiling of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers during wound-induced suberization. *Metabolomics* **3**: 147–159.
- Yeats, T.H., Huang, W., Chatterjee, S., Viart, H.M.-F., Clausen, M.H., Stark, R.E., and Rose, J.K.C.** (2014). Tomato Cutin Deficient 1 (CD1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *The Plant Journal* **77**: 667–675.
- Yeats, T.H., Martin, L.B.B., Viart, H.M.-F., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., Matas, A.J., Buda, G.J., Domozych, D.S., Clausen, M.H., and Rose, J.K.C.** (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology* **8**: 609–611.
- Yeats, T.H. and Rose, J.K.C.** (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci.* **17**: 191–198.
- Yeats, T.H. and Rose, J.K.C.** (2013). The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiol.* **163**: 5–20.
- Yi Chou, E., Schuetz, M., Hoffmann, N., Watanabe, Y., Sibout, R., and Samuels, A.L.** (2018). Distribution, mobility, and anchoring of lignin-related oxidative enzymes in *Arabidopsis* secondary cell walls. *Journal of Experimental Botany* **69**: 1849–1859.
- Zhang, B., Zhang, L., Li, F., Zhang, D., Liu, X., Wang, H., Xu, Z., Chu, C., and Zhou, Y.** (2017). Control of secondary cell wall patterning involves xylan deacetylation by a GDSL esterase. *Nature Plants* **3**: 17017.

- Zhang, Z., Ober, J.A., and Kliebenstein, D.J.** (2006). The Gene Controlling the Quantitative Trait Locus *EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1* Alters Glucosinolate Hydrolysis and Insect Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**: 1524–1536.
- Zhao, Q., Nakashima, J., Chen, F., Yin, Y., Fu, C., Yun, J., Shao, H., Wang, X., Wang, Z.-Y., and Dixon, R.A.** LACCASE Is Necessary and Nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in *Arabidopsis* C W.: 13.
- Zinkl, G. M., Zwiebel, B. I., Grier, D. G., & Preuss, D.** (1999). Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development*, **126(23)**, 5431-5440.

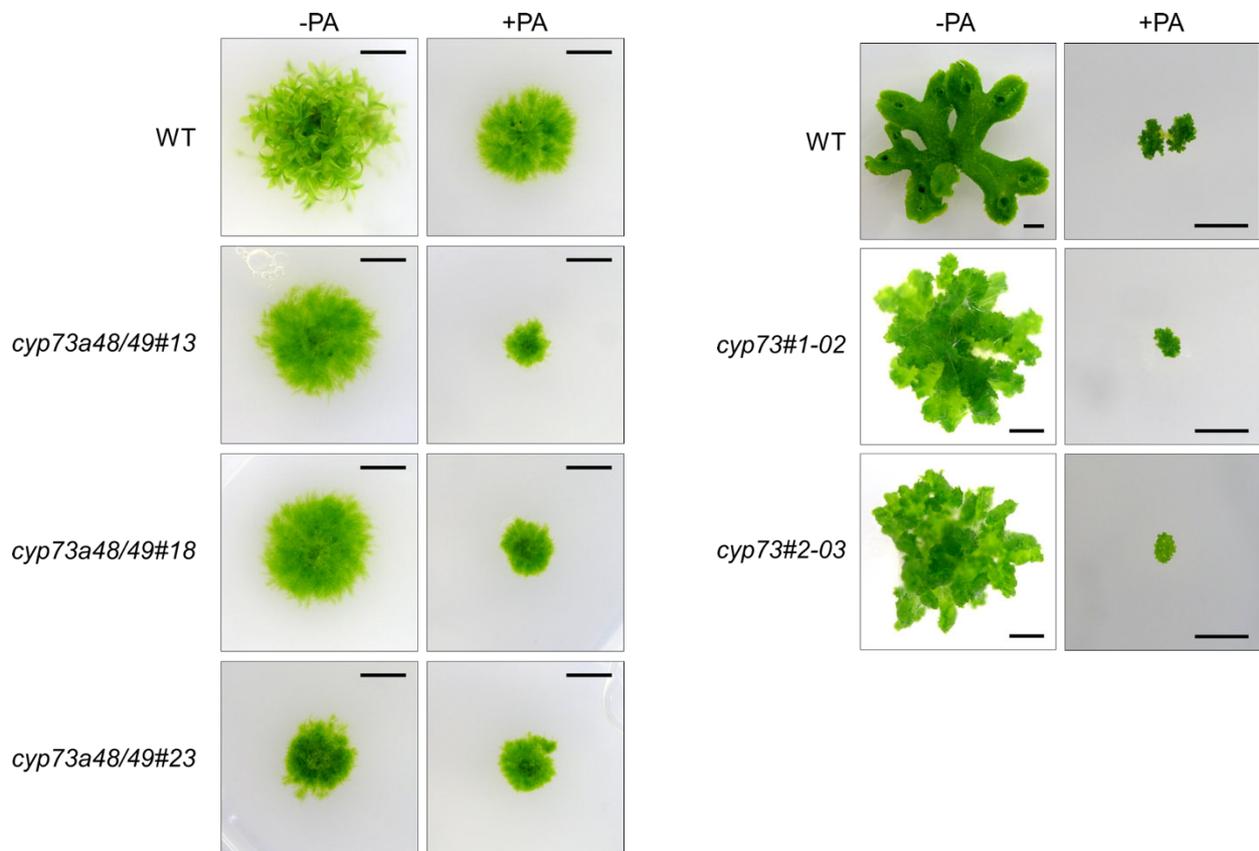
Annexes

Annexe 1 : Phénotypes des lignées knock-out et knock-in

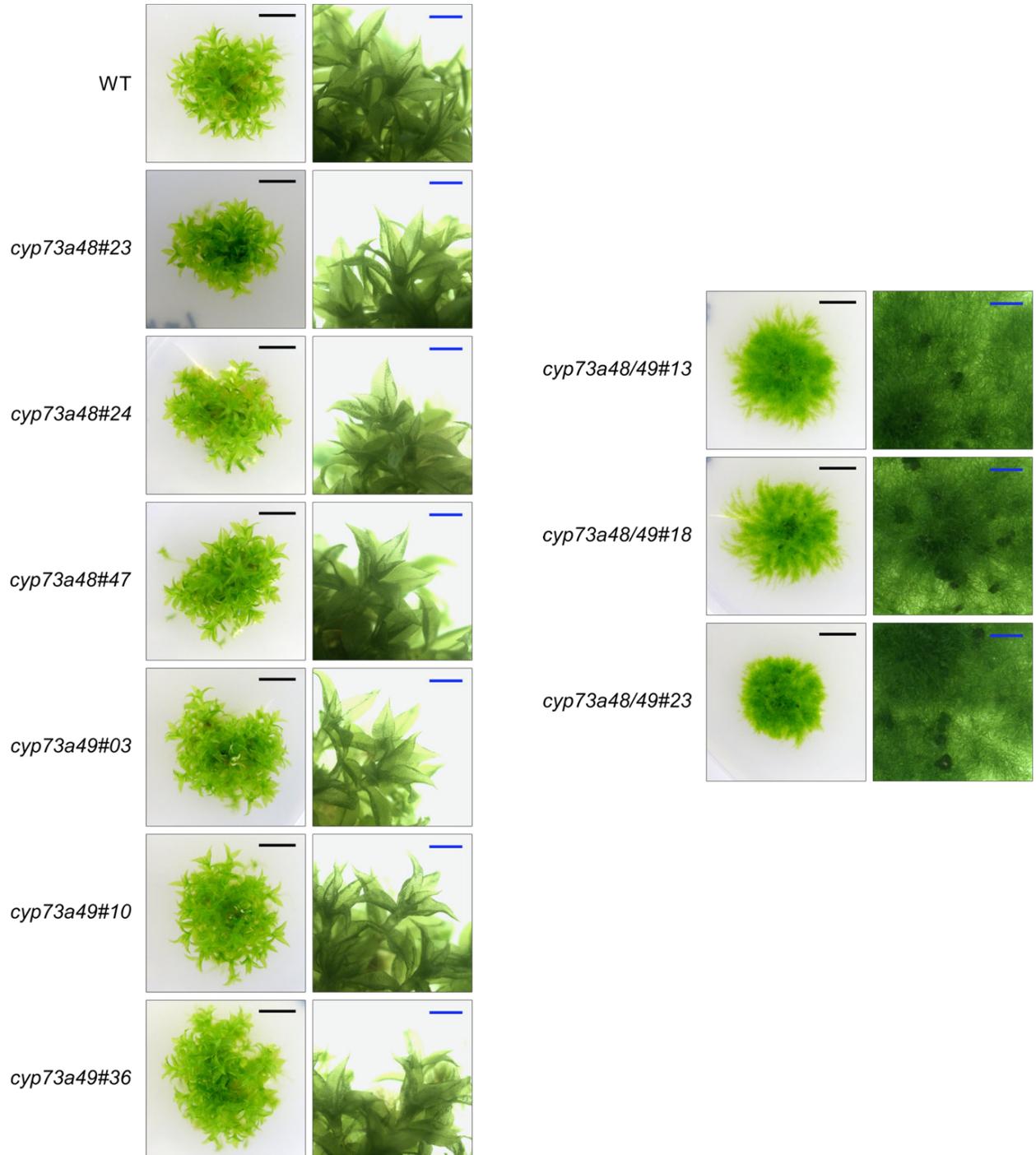
PpCYP73:uidA



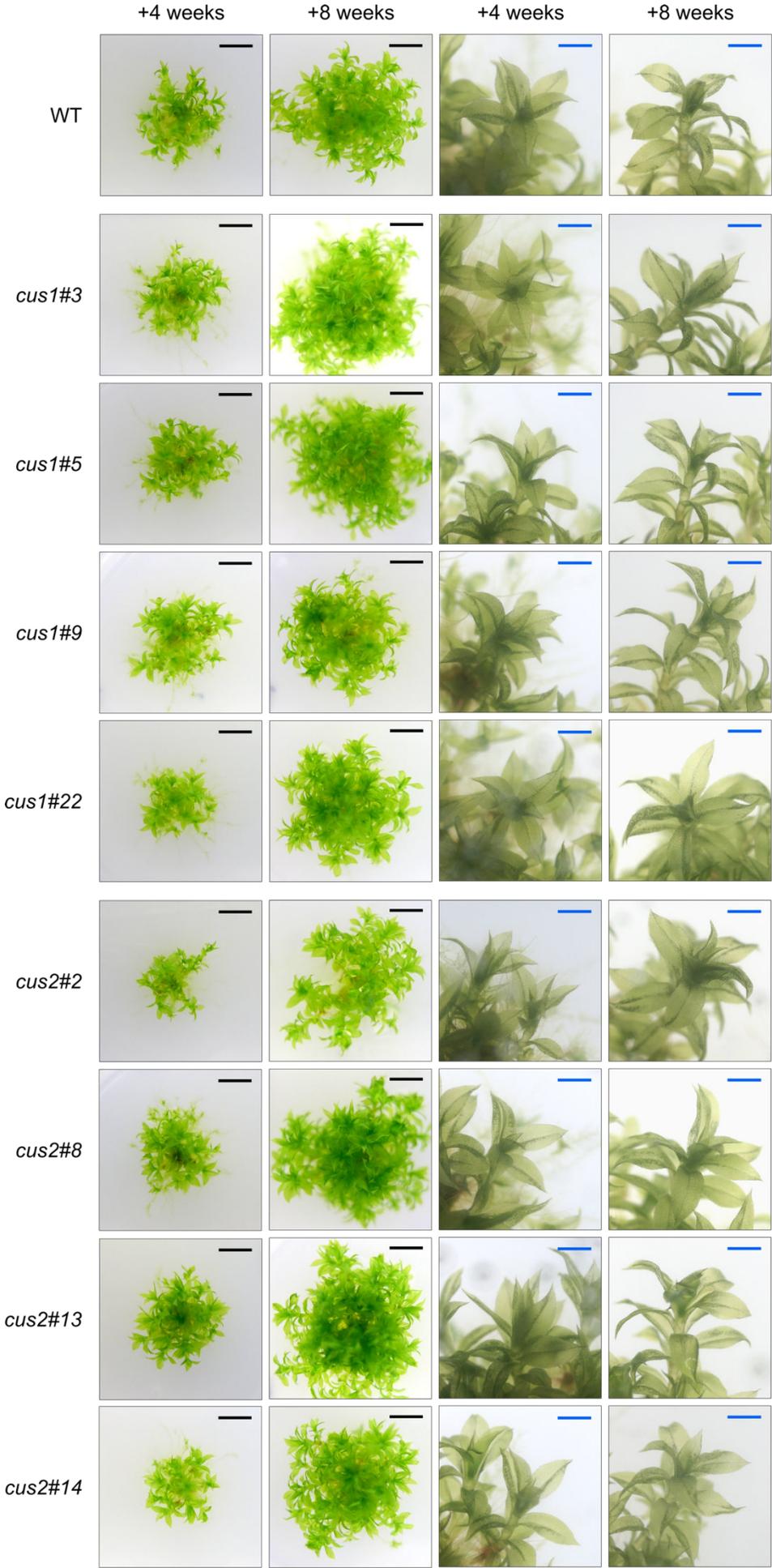
Ppcyp73a48/a49 et *Mpcyp73a1* traités à l'acide pipéronylique (PA)



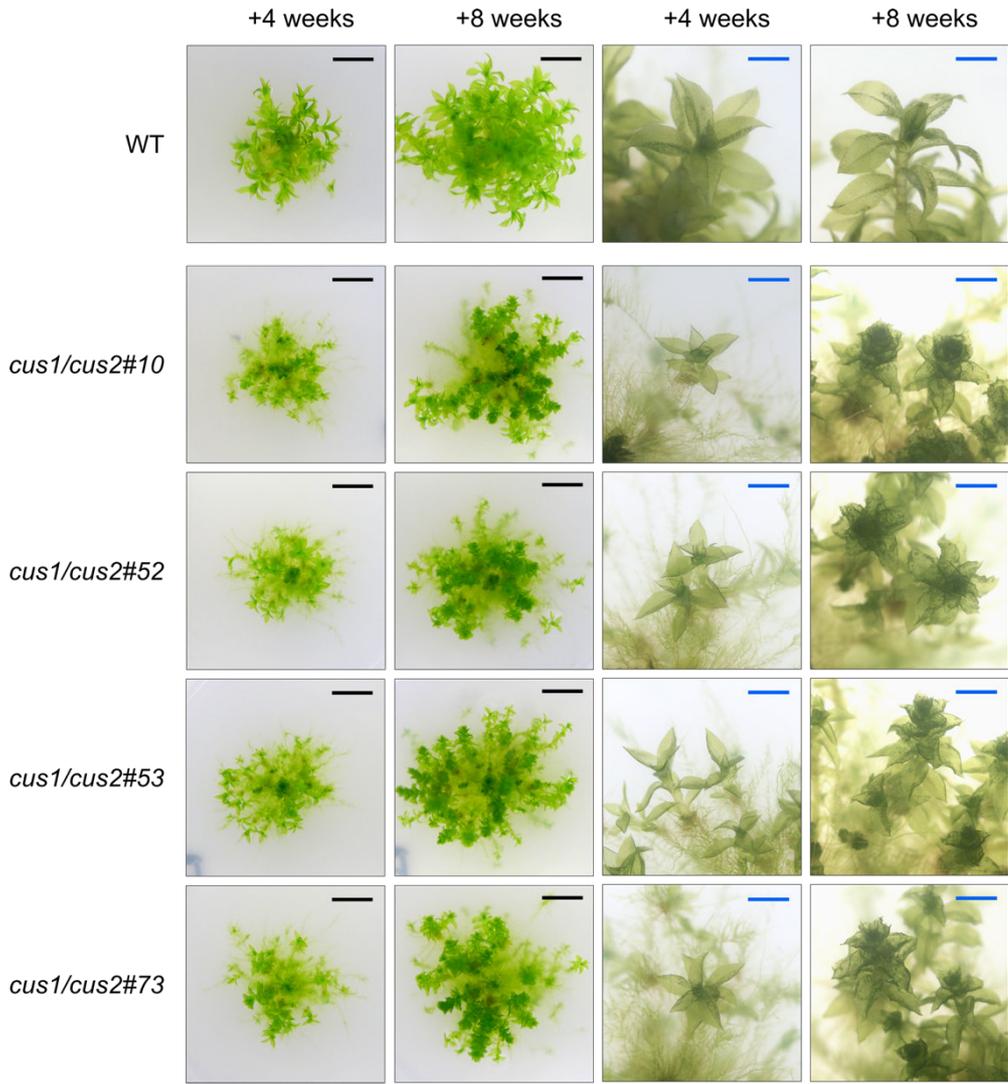
KO *Ppcyp73*



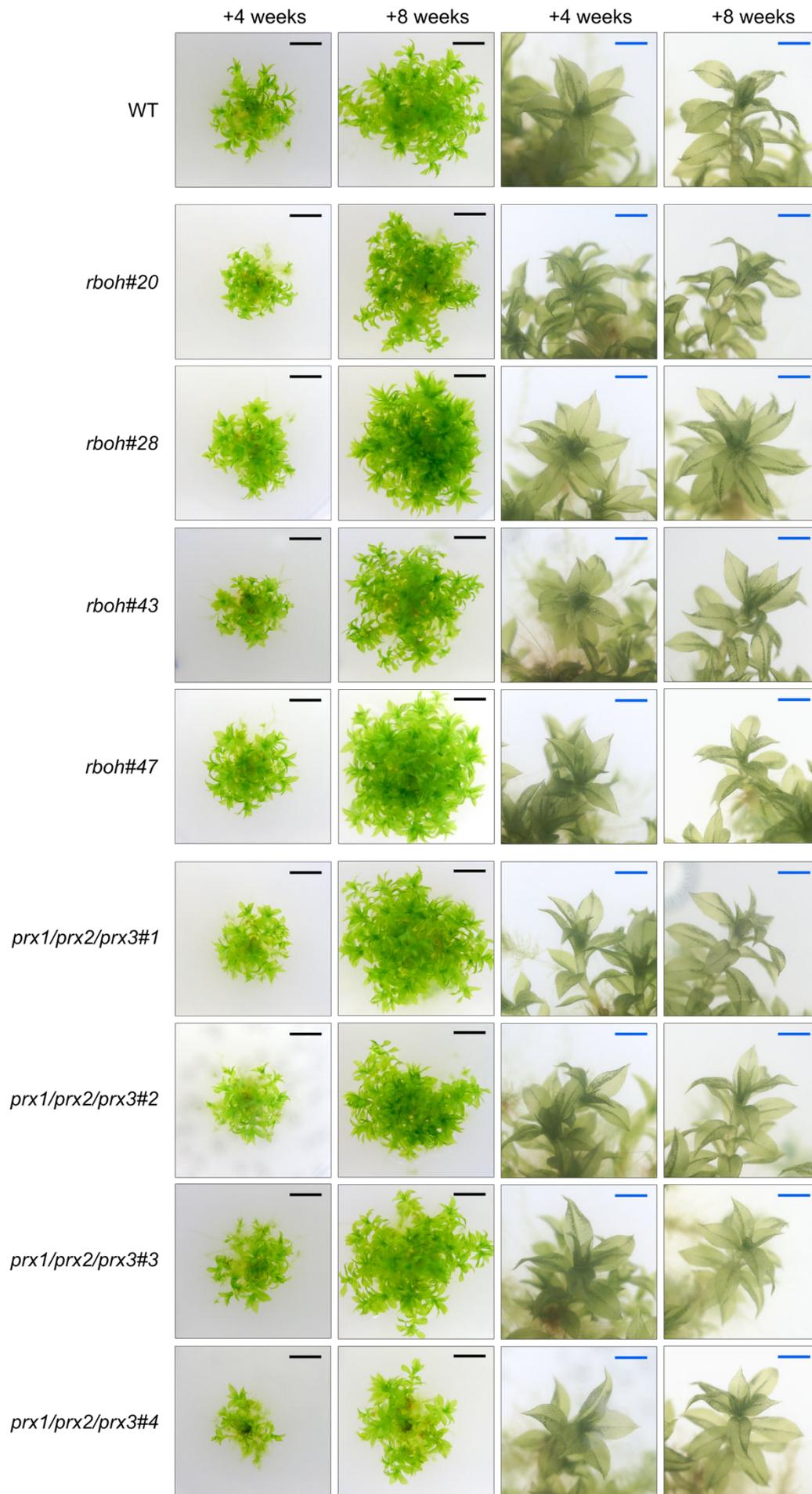
KO *Ppcus1* et *Ppcus2*



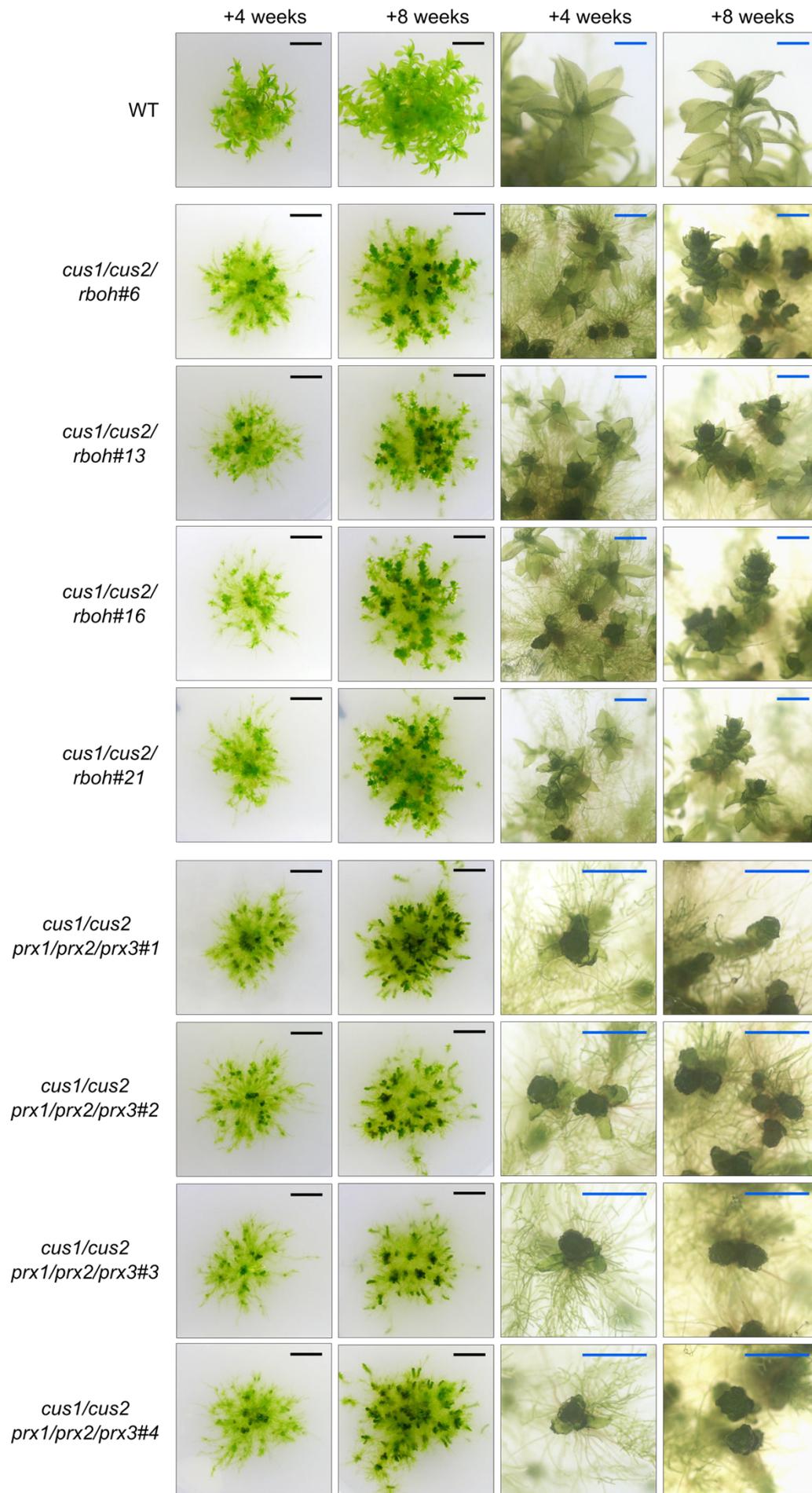
KO *Ppcus1/cus2*



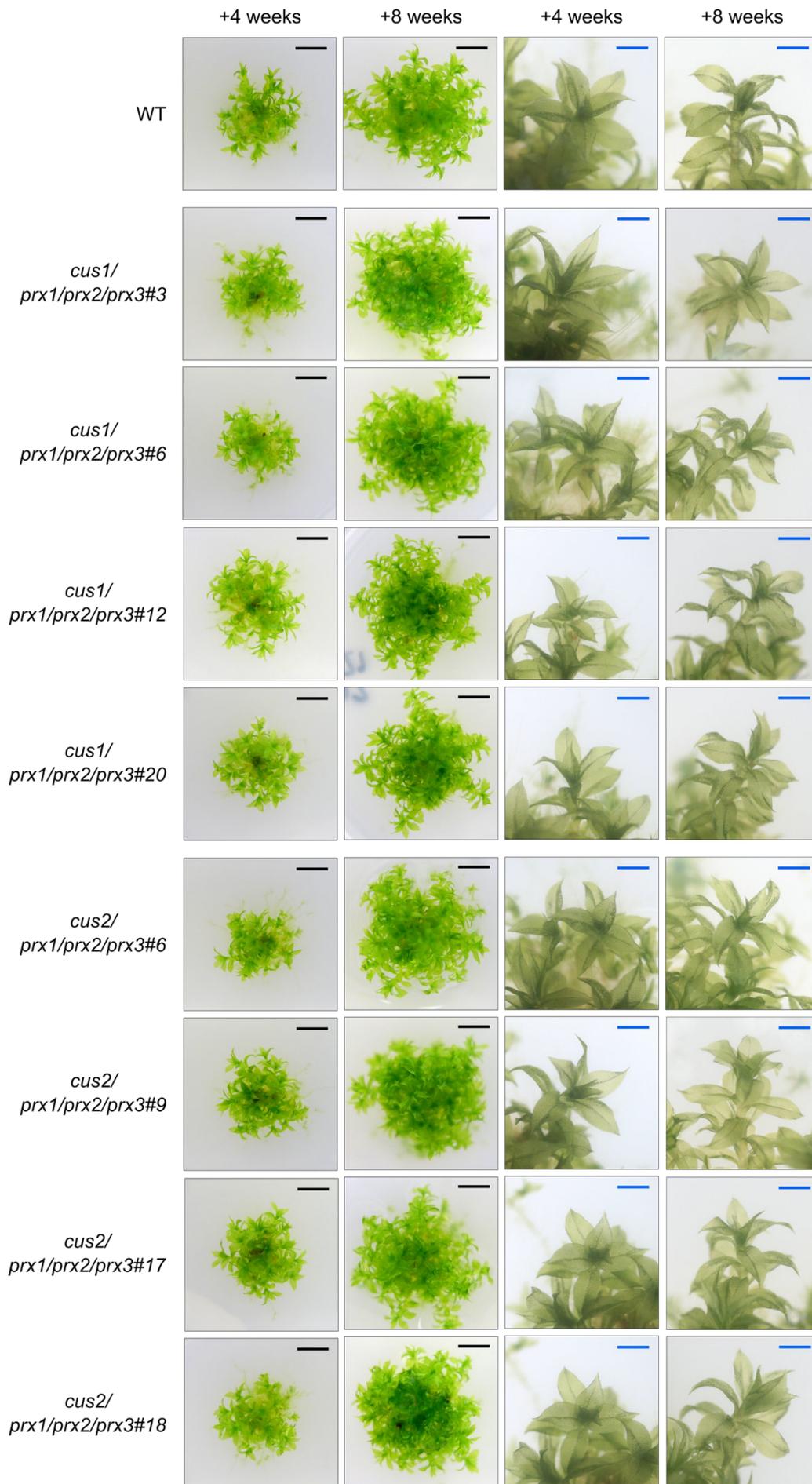
KO *Pprboh* et *Pprpx*



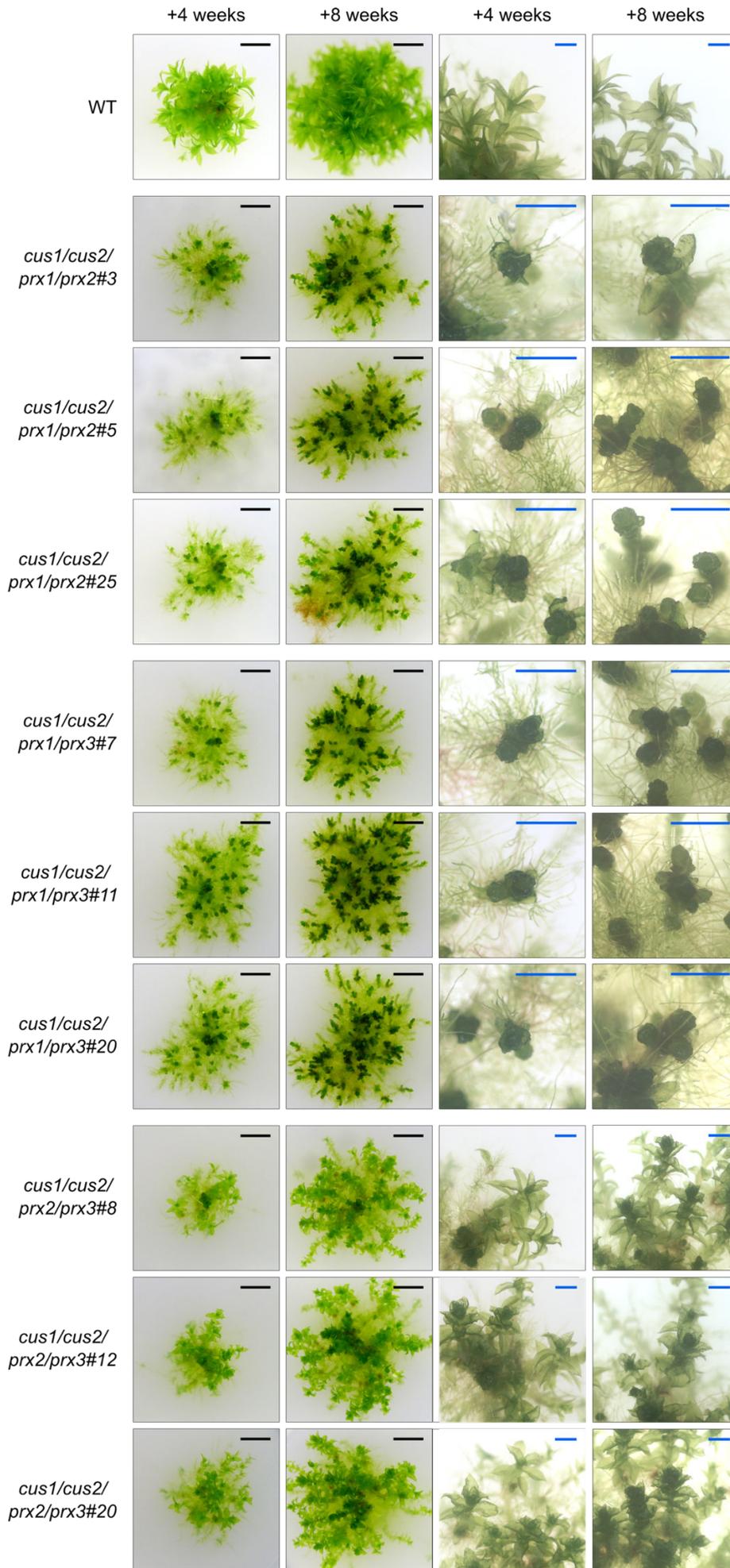
KO *Ppcus/rboh* et *Ppcus/prx*



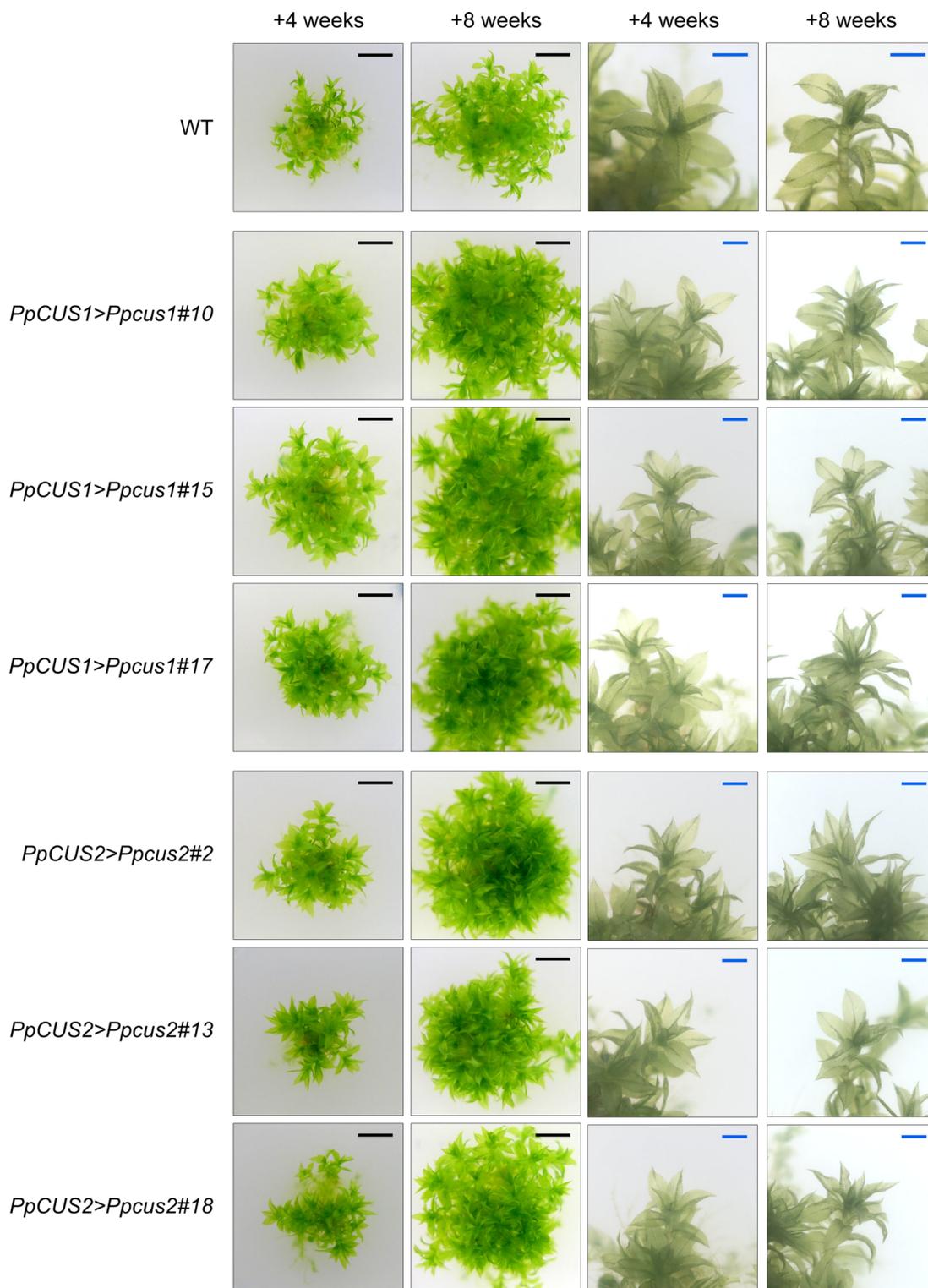
KO *Ppcus1/prx1/prx2/prx3* et *Ppcus2/prx1/prx2/prx3*



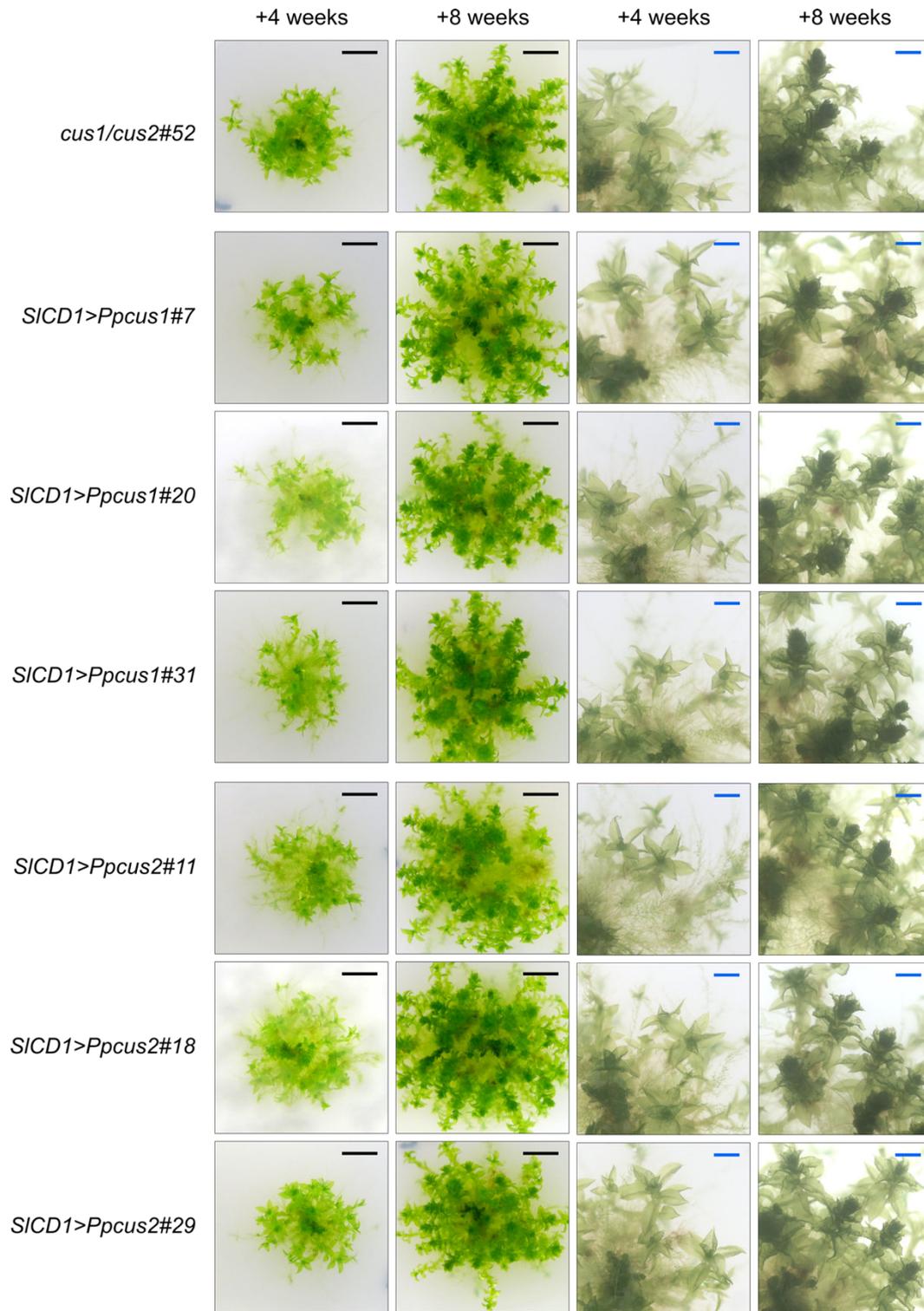
KO *Ppcus1/cus2/prx1/prx2*, *Ppcus1/cus2/prx1/prx3* et *Ppcus1/cus2/prx2/prx3*



PpCUS1>Ppcus1 et *PpCUS2>Ppcus2*



SICD1>Ppcus1 et *SICD1>Ppcus2*

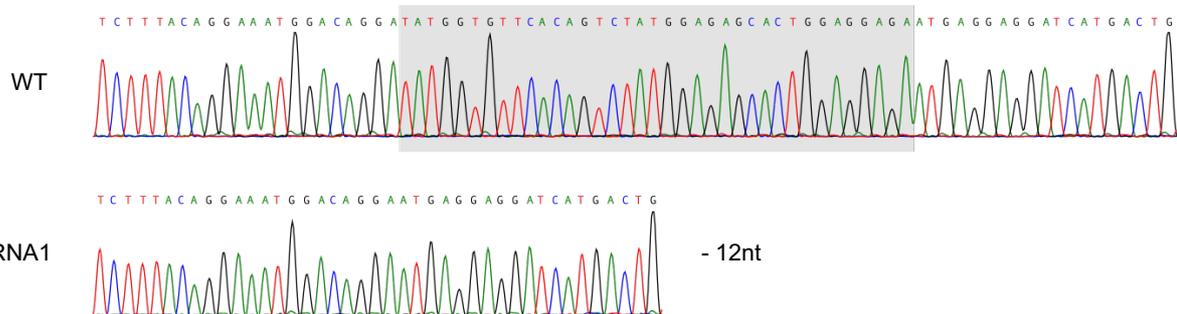


Annexe 2 : Caractérisation moléculaire des lignées KO CRISPR/Cas9

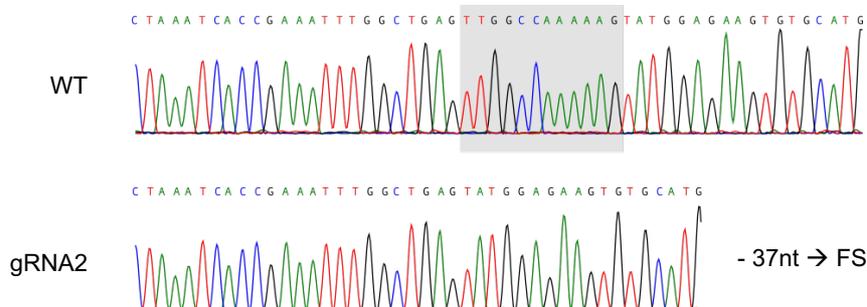
Le séquençage de la région génomique ciblée par CRISPR/Cas9 permet d'identifier la nature des mutations induites, et de connaître la conséquence sur les protéines, notamment l'éventuel décalage du cadre de lecture qui entraîne l'apparition de codons Stop prématurés : « frame shift » (FS).

MpCYP73A1

cyp73a1 #1-2



cyp73a1 #2-3



PpCUS1

Reference	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGAGCGC-----CACAGGTGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	
WT	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGAGCGC-----CACAGGTGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	
<i>cus1</i> #3	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGA-----GCGCAGGGAAAGAAGA	- 17 nt → FS
<i>cus1</i> #5	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGAGTGTCTTGGTCCAGGTGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	+ 9 nt → FS
<i>cus1</i> #9	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGAGCGC-----CTCAGGTGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	- 14 nt, 1 substitution → FS
<i>cus1</i> #22	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACA-----TGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	- 17 nt → FS
<i>cus1/cus2</i> #10	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGA-----GCGCAGGGAAAGAAGA	- 12 nt → FS
<i>cus1/cus2</i> #52	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAA-----ACAGGTGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	- 11 nt → FS
<i>cus1/cus2</i> #53	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGA-----GCGCAGGGAAAGAAGA	- 17 nt → FS
<i>cus1/cus2</i> #73	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACA-----TGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	- 16 nt → FS
<i>cus/prx</i> #1	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATT-----GAGGCGCAGGGAAAGAAGA	- 16 nt → FS
<i>cus/prx</i> #2	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGAGCGCAA----CACAGGTGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	+ 2 nt → FS
<i>cus/prx</i> #3	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGAGCGCT----CACAGGTGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAA	1 substitution → FS
<i>cus/prx</i> #4	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATT-----GAGGCGCAGGGAAAGAAGA	- 16 nt → FS
<i>cus1/prx1/2/3</i> #3	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGA-----GCGCAGGGAAAGAAGA	- 17 nt → FS
<i>cus1/prx1/2/3</i> #6	ATCTTGGAA< - - - - ->ACAGGTGTGGAGGCGCAGGGAAAGAAGA	- 33 nt, 2 substitutions
<i>cus1/prx1/2/3</i> #12	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGAGCGT-----GT-----GAGGCGCAGGGAAAGAAGA	3 substitutions → FS
<i>cus1/prx1/2/3</i> #20	ATCTTGGTCATTGGTGTAGTCATGGCAATAACATTGA-----GCGCAGGGAAAGAAGA	- 17 nt → FS

PpCUS2

Reference	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGAAGCG-----CA-GG-G-GA-AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	
WT	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGAAGCG-----CA-GG-G-GA-AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	
<i>cus2</i> #2	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGT-----AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 14 nt → FS
<i>cus2</i> #8	GGTGGCATTGAGCGGC-----C-----CA-GG-G-GA-AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 15 nt → FS
<i>cus2</i> #13	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGAAGCG-----G-GA-AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 4 nt → FS
<i>cus2</i> #14	TATTGTCATGGGTATCATTTGTGAATTACCG-----AA-----A-ACAAACCCCCACCTACCTTACGGCCTGAC	- 4 nt
<i>cus1/cus2</i> #10	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGA-----GCGACCTTCATCCTGGG	- 21 nt
<i>cus1/cus2</i> #52	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGT-----AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 14 nt → FS
<i>cus1/cus2</i> #53	GGTGGCATTGA-----GG-G-GA-AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 22 nt → FS
<i>cus1/cus2</i> #73	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGAAGCG-----at-tg<- - - ->CCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 11 nt, 3 substitutions → FS
<i>cus/prx</i> #1	GGTGTCTATTGAGCGGTACTTGTGAACAAC-----AAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 11 nt
<i>cus/prx</i> #2	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGT-----AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 14 nt
<i>cus/prx</i> #3	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGT-----AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 14 → FS
<i>cus/prx</i> #4	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGA-----AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 11 nt
<i>cus2/prx1/2/3</i> #6	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGAAGCG-----G-GA-AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 4 nt → FS
<i>cus2/prx1/2/3</i> #9	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGT-----AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 14 nt
<i>cus2/prx1/2/3</i> #17	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGAAGCGGATAATCCAGGTGCGATAGAAGCCCCGGCGACCTTCATGTTGCC	+ 12 nt, 5 substitutions → FS
<i>cus2/prx1/2/3</i> #18	GGTGGCATTGAGCGGCACCTTGTGTAGAAGCG-----GA-AGAAGCCCCGGCGACCTTCATCCTGGG	- 5 nt → FS

PpRBOH

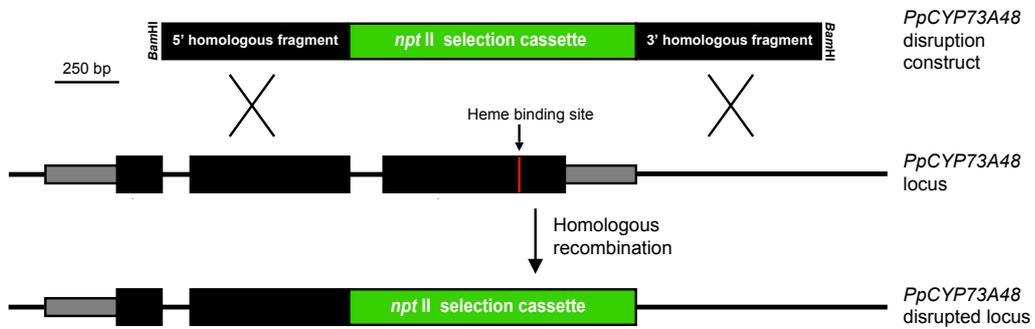
Reference	:AATTGGAACGAATATGGATACTCGCCCTGTGGATGTCGGTCATGGCGGCTCT:	
WT	:AATTGGAACGAATATGGATACTCGCCCTGTGGATGTCGGTCATGGCGGCTCT:	
<i>rboh</i> #20	:AATTGGAACGAATATGGATAC-----TCGGTCATGGCGGCTCT:	- 14 nt → FS
<i>rboh</i> #28	:AATTGGAACGAATA-----TGTGGATGTCGGTCATGGCGGCTCT:	- 13 nt → FS
<i>rboh</i> #43	:AATTGGAACGAATATGGATACTCG--CCTGTGGATGTCGGTCATGGCGGCTCT:	- 1 nt → FS
<i>rboh</i> #47	:AATTGGAACGAATATGGATACTCG-----A--TCGGTCATGGCGGCTCT:	- 13 nt → FS
<i>cus/rboh</i> #6	:AATTGGAACGAATATGGATACTCG--CTGTGGATGTCGGTCATGGCGGCTCT:	- 2 nt → FS
<i>cus/rboh</i> #13	:AATTGGAACGAATA-----TGGATGTCGGTCATGGCGGCTCT:	- 15 nt
<i>cus/rboh</i> #16	:AATTGGAACGAATATGGATAC-----TCGGTCATGGCGGCTCT:	- 14 nt → FS
<i>cus/rboh</i> #21	:AATTGGAACGAATATGGATACTCG--CCTGTGGATGTCGGTCATGGCGGCTCT:	- 1 nt → FS

PpPRX1

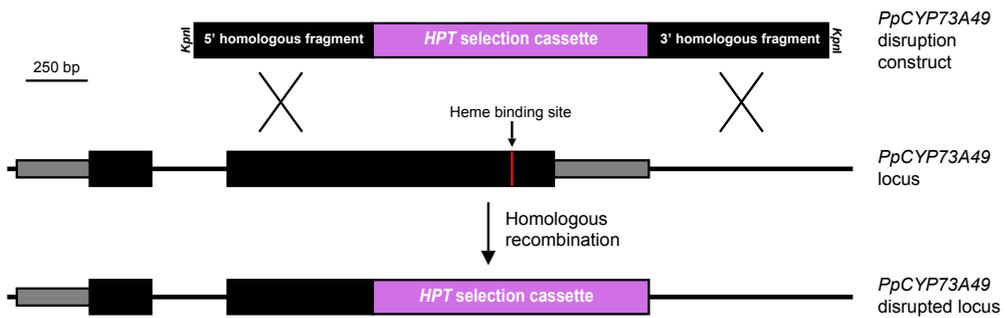
Reference	GAGAGCACTGGCAG-TC-----T--GGTTGGTCAT--TGCGCAGTCTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	
WT	GAGAGCACTGGCAG-TC-----T--GGTTGGTCAT--TGCGCAGTCTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	
<i>prx1/3</i> #22	GAGAGCACTGGCAG-TC-----TATGGTTGGTCAT--TGCGCAGTCTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	+ 2 nt → FS
<i>prx1/3</i> #49	GAGAGCACTGGCAG<- - - - ->CGCAGG,	- 39 nt → FS
<i>cus1/2/prx1/2</i> #3	GAGAGCACTGGCAG-----T-----CTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	- 20 nt → FS
<i>cus1/2/prx1/2</i> #5	GAGAGCACTGTCA--TA-----T--GCATGGCCATCATAGGCAGCTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	- 1 nt, 9 substitutions → FS
<i>cus1/2/prx1/2</i> #21	GAGAGCACTGGCA-----GTCAT--TGCGCAGTCTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	- 9 nt → FS
<i>cus1/2/prx1/3</i> #7	GAGAGCACTGGCAG-TCAGATAT--GGTTGGTCAT--TGCGCAGTCTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	+ 5 nt → FS
<i>cus1/2/prx1/3</i> #11	GAGAGCACTGGCAG-----T-----CTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	- 20 nt → FS
<i>cus1/2/prx1/3</i> #20	GAGAGCACT-----GGTTGGTCAT--TGCGCAGTCTGCTGCAGATAGTGGCAGCGCAGG,	- 8 nt → FS

Annexe 3 : Production des mutants *Ppcyp73* par recombinaison homologue

PpCYP73A48



PpCYP73A49



Annexe 4 : Listes des oligonucléotides utilisés

Les amorces en minuscule ont été impliquées dans les techniques de clonage.

ID	Name	Sequence (5'>3')
RT-qPCR		
HR849	Pp3c19_1800_qF1	ATGCTTGCATTGCAGTGCTG
HR855	Pp3c27_3270_qF1	AATTACGGTGCCTTATCC
HR571	Pp1s168_84V6_qF1	TTGCAGAGCTCGTGAACAAC
HR572	Pp1s168_84V6_qR1	GAGCTTGTGTTGTAGGTGTCCG
HR573	Pp1s298_4V6_qF1	AGAGGCACAAAAGAAGGGAGAG
HR574	Pp1s298_4V6_qR1	TTCACAAGCTCCGCAATTCC
SK0561	MpACT7_qF	AGGCATCTGGTATCCACGAG
SK0562	MpACT7_qR	ACATGGTTCCTCCAGAC
SK0563	MpEF1a_qF	CCGAGATCCTGACCAAGG
SK0564	MpEF1a_qR	GAGGTGGTACTCAGCGAAG
SK0565	Mapoly0081s0008_qF	GCGCTCAAGGACAAGAGACT
SK0566	Mapoly0081s0008_qR	TGAAGTCGATGGCCACCTTC
SK0567	Mapoly0081s0009_qF	ATGAGCTGGACACGGTTCTG
SK0568	Mapoly0081s0009_qR	TTCACCACCGCGTCAAATA
SK0569	Mapoly0163s0018_qF	TATCCTCGGTCGTGGACACT
SK0570	Mapoly0163s0018_qR	AGAAGGGGAATGGCCATGTG
protospacers for CRISPR/Cas9 (Golgen Gate cloning)		
HR1279	MpCYP73A1_gRNA1_Bsal_F	ctcgGCTGAGTTGGCCAAAAAGTA
HR1280	MpCYP73A1_gRNA1_Bsal_R	aaacTACTTTTTGGCCAACTCAGC
HR1281	MpCYP73A1_gRNA2_Bsal_F	ctcgGATATGGTGTTCACAGTCTActcg
HR1282	MpCYP73A1_gRNA2_Bsal_R	aaacTAGACTGTGAACACCATATC
SK0446	Pp3c14_19530_gRNA_Bsal_F	ccatGCAATAACATTGAGCGCCAC
SK0447	Pp3c14_19530_gRNA_Bsal_R	aaacGTGGCGCTCAATGTTATTGC
SK0450	Pp3c17_21660_gRNA_Bsal_F	ccatGCACTTGTGTAGAAGCGCAG
SK0451	Pp3c17_21660_gRNA_Bsal_R	aaacCTGCGCTTCTACACAAGTGC
SK0376	Pp3c3_30190_gRNA_Bsal_F	ccatGAGAGCACTGGCAGTCTGGT
SK0377	Pp3c3_30190_gRNA_Bsal_R	aaacACCAGACTGCCAGTGTCTC
SK0378	Pp3c9_18550_gRNA_Bsal_F	CCATGCGAGCTCAAAATATAGGGC
SK0379	Pp3c9_18550_gRNA_Bsal_R	AAACCGCCTATATTTTGAGCTCGC
SK0543	Pp3c9_18550_gRNA_Bsal_F#2	ccatGGACTTCAGCAGGCGAAGCT
SK0544	Pp3c9_18550_gRNA_Bsal_R#2	aaacAGCTTCGCCTGCTGAAGTCC
SK0549	Pp3c9_18550_gRNA_Bsal_F#3	ccatGGCGGAGTCTTGCTTCGTGG
SK0550	Pp3c9_18550_gRNA_Bsal_R#3	aaacCCACGAAGCAAGACTCCGCC
SK0454	Pp3c20_22940_gRNA_Bsal_F	ccatGAATATGGATACTCGCCCTG
SK0455	Pp3c20_22940_gRNA_Bsal_R	aaacCAGGGCGAGTATCCATATTC
SK0609	Pp3c14_19530_gRNA_RH1_Bsal_F	ccatGACACTTACTGACGAGATCT
SK0610	Pp3c14_19530_gRNA_RH1_Bsal_R	aaacAGATCTCGTCAGTAAGTGTC
SK0611	Pp3c17_21660_gRNA_RH1_Bsal_F	ccatGGGACTTACTGACAAGATCG
SK0612	Pp3c17_21660_gRNA_RH1_Bsal_R	aaacCGATCTTGTGTAAGTCCC
Genotyping CRISPR/Cas9 lines (Sequencing)		
HR1283	MpCYP73A1_gRNA1-2_screen_F	GCTTCAAGCAGCAGCATGTT
HR1284	MpCYP73A1_gRNA1-2_screen_R	ACATCATGAGCTGCAGCCTT
SK0448	Pp3c14_19530_ontarget#2_F	TTCGAAACCCTTCAGCAGG
SK0449	Pp3c14_19530_ontarget#2_R	CGGAACCAAATGCACACTGC
SK0452	Pp3c17_21660_ontarget#2_F	ACTTGCCTTGGCGGTATCGTA

SK0453	Pp3c17_21660_ontarget#2_R	AGCAGCAAACGGGACTTACT
SK0380	Pp3c3_30190_ontarget_F	TCTCGCAAGTCATGTGCGACC
SK0381	Pp3c3_30190_ontarget_R	TCCGTCCAAAAGGACTGACG
SK0545	Pp3c9_18550_ontarget_F#2	GCTAGGCCTCTGCAATTTGC
SK0546	Pp3c9_18550_ontarget_R#2	AATGACCCCGAACAAAGCCT
SK0404	Pp3c23_8110_ontarget_F	TCGCAACCAGTTCATCTGCT
SK0405	Pp3c23_8110_ontarget_R	CGAAGCTTGTGGGAGAGGTT
SK0456	Pp3c20_22940_ontarget_F	GCTGAAGAAGGCTGAGGAGG
SK0457	Pp3c20_22940_ontarget_R	GCGTCGGCTACATTGAGGTA
Gene cloning (Gateway®)		
HR438	Pp1s298_4V6_AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGGCACAATAACGAT
HR439	Pp1s298_4V6_AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGACGGCAAGAGGTCTGG
HR436	Pp1s168_84V6_AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGAGCAGGATGGAAGGA
HR437	Pp1s168_84V6_AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGCGATGGGTTTCAGAC
HR445	Pp1s158_96V6_AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAAAGCCAACAGTTGTTCCG
HR446	Pp1s158_96V6_AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAATTCCTCGGCCTCAAGACC
HR440	Pp1s315_29V6_AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGGAAGCCAATGGGC
HR441	Pp1s315_29V6_AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGCTCTCGGCCTTGTG
0SK084	Pp3c14_19530_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAAGTTTAGAAAATCAGC
0SK085	Pp3c14_19530_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACATGGCTAGCAACTGG
0SK086	Pp3c17_21660_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAAGGCCAGCTGATAGT
0SK087	Pp3c17_21660_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACATGGCCAGCAATG
Site Directed Mutagenesis		
HR642	Pp1s298_4V6_R225A_F	GAGCCAACCGACTGGCCTCCCCGTTAAGTG
HR643	Pp1s298_4V6_R225A_R	CACTTAACGGGGAGGCCAGTCGGTTGGCTC
SK0385	sk241_SDM_F	GTCATAACTTTGGCTTGCAGTCTTACTCCGACGAAAA
SK0386	sk241_SDM_R	TTTTCGTCGGAGTAAACTCGCAAGCCAAAGTTATTGAC
SK0387	sk242_SDM_F	CGGGGTGCACAACTTCGGCTTGCGAAC
SK0388	sk242_SDM_R	GTTTCGAAGCCGAAGTTGTCGACCCCG
Homologous recombination (Gibson cloning)		
HR487	pGEM-T_Easy_F	TCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTG
HR488	pGEM-T_Easy_R	GCCCTATAGTGAGTCGTATTAC
HR489	Pp1s298_fragment1_F	aatacgactcactatagggcGGATCCCTCTCATGTTTTGGTTGAATG
HR490	Pp1s298_fragment1_R	gtcatagctgTTCGCTCATCGACAAAATG
HR491	NPTII_Pp1s298_F	atgagcgaaaCAGCTATGACCATGATTACGC
HR492	NPTII_Pp1s298_R	ggaatgtgcaTTGGGTAACGCCAGGGTT
HR493	Pp1s298_fragment2_F	cgttacccaaTGCACATTCATGCCAAC
HR494	Pp1s298_fragment2_R	tatttaggtgacactatagaGGATCCTGTAATGTTGGTGCATTAACAAATAA
HR501	Pp1s168_fragment1_F	aatacgactcactatagggcGGTACCTCGTCAAAGCTGAAATGCTTC
HR502	Pp1s168_fragment1_R	cggaagcttGCCTGGGTCCCAAGGTTG
HR503	HPT_Pp1s168_F	ggacccagggcAAGCTTGCCGCCAAGGAT
HR504	HPT_Pp1s168_R	ttggcaacgaGGATCCCGATCTAGTAACATAGATG
HR505	Pp1s168_fragment2_F	atcggatccTCGTTGCCAACACTTTTTTC
HR506	Pp1s168_fragment2_R	tatttaggtgacactatagaGGTACCAAAAATCCATAACTTTGATACTTATTC
SK0572	315-RH1-CUS1_fwd	ggcggatccAAGAGAGTTTCATGTTTCATGCTTG
SK0573	315-RH1-CUS1_rev	aactgcatTTTGTCTCTCCGCGGTG
SK0574	315-CDS-CUS1_fwd	gagagacaaaATGGCAAGTTTAGAAAATCAG
SK0575	315-CDS-CUS1_rev	aaggggagaaTTACATGGCTAGCAACTG
SK0576	315-RH2_pGEMT-CUS1_fwd	agccatgtaaTTCTCCCTTTATTCTTACC
SK0577	315-RH2_pGEMT-CUS1_rev	aaactcttGGATCCGCCCTATAGTGAG
SK0578	316-RH1-CUS2_fwd	ggcggatccCCTCCCTGGGTCCCAGTTTTTTC
SK0579	316-RH1-CUS2_rev	ggccttcatGCTTGCTTTCTTCTCACCTC
SK0580	316-CDS-CUS2_fwd	aaaggcaagcATGAAAGGCCAGCTGATAG
SK0581	316-CDS-CUS2_rev	gcgagacatTCACATGGCCAGCAATGTG

SK0582	316-RH2_pGEMT-CUS2_fwd	ggccatgtgaATGTCTCCGCCAAATTAC
SK0583	316-RH2_pGEMT-CUS2_rev	cccagggaggGGATCCGCCCTATAGTGAG
SK0584	317-RH1-CUS1_fwd	ggcgatgccAAGAGAGTTTCATGTTTCATGCTTG
SK0585	317-RH1-CUS1_rev	gtgtggccatTTTGTCTCTCCGCGGTCCG
SK0586	317-CDS-CD1_fwd	gagagacaaaATGGCCACACCTACTATTATTTTG
SK0587	317-CDS-CD1_rev	aaggggagaaTTATGCATGTGAATCCATAGC
SK0588	317-RH2-pGEMT-CUS1_fwd	acatgcataaTTCTCCCCTTTATTCTTCACC
SK0589	317-RH2-pGEMT-CUS1_rev	aaactctcttGGATCCGCCCTATAGTGAG
SK0590	318-RH1-CUS2_fwd	ggcgatgccCCTCCCTGGGTCCAGTTTTTTC
SK0591	318-RH1-CUS2_rev	gtgtggccatGCTTGCCTTTCTTTCTCACCTC
SK0592	318-CDS-CD1_fwd	aaaggaagcATGGCCACACCTACTATTATTTTG
SK0593	318-CDS-CD1_rev	gcgagacatTTATGCATGTGAATCCATAGC
SK0594	318-RH2-pGEMT-CUS2_fwd	acatgcataaATGTCTCCGCCAAATTAC
SK0595	318-RH2-pGEMT-CUS2_rev	cccagggaggGGATCCGCCCTATAGTGAG
Genotyping homologous recombination lines (Sequencing)		
HR520	NPTII_cassette_1368F	CGCCCGGTTCTTTTTGTCAA
HR521	NPTII_cassette_1729R	CCCTGATGCTCTTCGTCCAG
HR522	Pp1s298_transfo_358F	GAGGCGAATCATGACAGTGC
HR523	Pp1s298_transfo_2723R	TGGTTTCTCAACAGCAGCT
HR526	HPT_cassette_1402F	CAAGACCTGCCTGAAACCGA
HR527	HPT_cassette_1791R	GGCGACCTCGTATTGGGAAT
HR528	Pp1s168_transfo_407F	GCGCGTTATCCAGGATCTCA
HR529	Pp1s168_transfo_2785R	CCCTTTTCTTTTGGGTACTGTT
SK0620	PpCUS1>PpCUS1_5'_F	GCGACGTTTCTCGGTGAGTT
SK0623	PpCUS1>PpCUS1_3'_R	CAGATACCGAAATCATAACAGCTCC
SK0624	PpCUS2>PpCUS2_5'_F	GAGTGCCGCTCGTTATCACC
SK0627	PpCUS2>PpCUS2_3'_R	CCAGGCTTCATTAATGTCCAGC
SK0628	SICD1>PpCUS1>5'_F	CTCGCCTTGACTCTTTCAGGT
SK0631	SICD1>PpCUS1>3'_R	TGCTCACATGAACTCTGCCT
SK0632	SICD1>PpCUS2_5'_F	CACATTCAGCTGGCTGCAAG
SK0635	SICD1>PpCUS2_3'_R	GTGAGCACGGCACATTGG
SK0636	SICD1>PpCUS1/2_5'_F_seq	TCTTGTTGATTTTGGAGTGGCT
SK0637	SICD1>PpCUS1_3'_R_seq	GGTCCTTGTCACAACATGC
SK0638	SICD1>PpCUS2_3'_R_seq	TGCCCTCTCAGATGGATGGA
SK0639	PpCUS1>PpCUS1_3'_F_seq	AAACCCATGTTGCAGAGCCT
SK0640	PpCUS2>PpCUS2_3'_F_seq	TACATGGCAGTCACCACCAG

Annexe 5 : Co-expression des gènes étudiés

Les données de co-expression des gènes étudiés ont été obtenues sur phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) à partir des données transcriptomiques (RNA-Seq) de Perroud *et al.* (2018 ; doi: 10.1111/tpj.13940).

PpCYP73A48 (Pp3c4_21680)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c4_21680	cinnamate-4-hydroxylase	1
Pp3c5_24610	SAUR-like auxin-responsive protein family	0,892832
Pp3c21_5260	-	0,889481
Pp3c13_7880	-	0,884138
Pp3c6_7200	ralf-like 34	0,882419
Pp3c20_11510	-	0,880324
Pp3c3_13650	Oligosaccharyltransferase complex/magnesium transporter family protein	0,878843
Pp3c1_22560	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,873588
Pp3c1_17870	GDLS-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,872693
Pp3c4_15250	Ribosomal protein S19 family protein	0,87192
Pp3c1_21740	translocon at inner membrane of chloroplasts 21	0,869065
Pp3c11_15230	Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase family protein	0,868273
Pp3c3_32650	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	0,867305
Pp3c20_21510	-	0,866421
Pp3c14_6070	ATP-binding cassette A2	0,866173
Pp3c14_26100	cellulose synthase-like D3	0,86412
Pp3c10_6460	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,862294
Pp3c18_1530	GDLS-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,860387
Pp3c23_18100	60S acidic ribosomal protein family	0,859956
Pp3c5_16070	Ribosomal protein S26e family protein	0,858882
Pp3c8_16130	Ribosomal protein L14p/L23e family protein	0,858528
Pp3c7_13960	Uncharacterised protein family (UPF0497)	0,858401
Pp3c17_11570	-	0,858388
Pp3c16_410	Ribosomal protein L19e family protein	0,854922
Pp3c19_20870	-	0,853989
Pp3c5_1480	-	0,853677
Pp3c7_11870	Mitochondrial substrate carrier family protein	0,852757
Pp3c15_5090	Cupredoxin superfamily protein	0,85262
Pp3c2_32270	-	0,852536
Pp3c17_11550	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	0,852024
Pp3c8_16960	Protein of unknown function (DUF3537)	0,850621
Pp3c8_19540	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,84734
Pp3c9_2300	ARM repeat superfamily protein	0,84725
Pp3c16_11530	-	0,846874
Pp3c1_33050	-	0,84642
Pp3c22_21090	Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein	0,845621
Pp3c12_23480	-	0,845596
Pp3c19_8770	Phosphate-responsive 1 family protein	0,844758
Pp3c5_23940	uclacyanin 1	0,844575
Pp3c20_19140	Ribosomal protein L4/L1 family	0,844112
Pp3c1_14310	CBS / octicosapeptide/Phox/Bemp1 (PB1) domains-containing protein	0,8436
Pp3c3_36450	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	0,843447
Pp3c4_15290	Ribosomal protein S4	0,842422
Pp3c23_8770	plant U-box 14	0,841473
Pp3c12_8120	Lactate/malate dehydrogenase family protein	0,83867
Pp3c19_18770	Subtilase family protein	0,836135
Pp3c5_17110	RING/U-box superfamily protein	0,833667
Pp3c9_14720	Ribosomal protein L19e family protein	0,827615
Pp3c8_22380	60S acidic ribosomal protein family	0,823204
Pp3c14_6710	Pectin lyase-like superfamily protein	0,821127
Pp3c13_23630	Ribosomal protein L2 family	0,820421

PpCYP73A49 (Pp3c25_10190)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c25_10190	cinnamate-4-hydroxylase	1
Pp3c7_22740	Class-II DAHP synthetase family protein	0,884887
Pp3c10_16540	Lung seven transmembrane receptor family protein	0,862553
Pp3c19_13170	4-coumarate:CoA ligase 3	0,857024
Pp3c9_23630	ubiquitin-conjugating enzyme 36	0,849071
Pp3c18_20200	Aldolase-type TIM barrel family protein	0,840668
Pp3c12_8440	cytochrome P450, family 98, subfamily A, polypeptide 3	0,839726
Pp3c9_26150	Complex I subunit NDUFS6	0,833448
Pp3c10_17120	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein	0,829266
Pp3c12_4500	Reticulon family protein	0,828303
Pp3c12_14410	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	0,828301
Pp3c5_24760	Phosphoglycerate mutase family protein	0,827883
Pp3c22_6530	Pyruvate kinase family protein	0,827688
Pp3c20_1120	BES1/BZR1 homolog 4	0,826489
Pp3c12_4180	Uncharacterised protein family SERF	0,825959
Pp3c11_9290	phosphate transporter 3;1	0,824426
Pp3c6_10280	triosephosphate isomerase	0,821574
Pp3c17_12000	Core-2/1-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	0,821471
Pp3c21_9770	small and basic intrinsic protein 1A	0,821194
Pp3c22_10130	ATP-dependent caseinolytic (Cip) protease/crotonase family protein	0,819766
Pp3c2_23830	ARF-GAP domain 8	0,819587
Pp3c2_15200	glyoxal oxidase-related protein	0,81855
Pp3c2_32600	tRNA arginine adenosine deaminase	0,818018
Pp3c16_6380	Sugar isomerase (SIS) family protein	0,817806
Pp3c17_16900	dsRNA-binding protein 2	0,817679
Pp3c5_15640	acyl-activating enzyme 18	0,817433
Pp3c21_9940	glutamate-ammonia ligases;catalytics;glutamate-ammonia ligases	0,817343
Pp3c23_11380	RNA 3'-terminal phosphate cyclase/enolpyruvate transferase, alpha/beta	0,816876
Pp3c9_12820	-	0,813299
Pp3c24_13440	Protein of unknown function (DUF1421)	0,809296
Pp3c1_18830	PHE ammonia lyase 1	0,807863
Pp3c8_15610	phosphofructokinase 5	0,80704
Pp3c3_27940	WRKY DNA-binding protein 2	0,806669
Pp3c17_15590	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	0,805247
Pp3c2_34820	vacuolar sorting receptor 3	0,804295
Pp3c2_23100	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,802087
Pp3c3_11990	Insulinase (Peptidase family M16) protein	0,801816
Pp3c26_7270	Oligosaccharyltransferase complex/magnesium transporter family protein	0,800656
Pp3c11_22940	maturase K	0,799637
Pp3c18_17380	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein	0,799412
Pp3c1_16900	ATP-citrate lyase A-3	0,797445
Pp3c10_15520	phosphoglycerate kinase	0,79707
Pp3s48_50	3'-5'-exoribonuclease family protein	0,794938
Pp3c1_7220	-	0,792744
Pp3c5_4350	Protein kinase superfamily protein	0,791088
Pp3c11_3700	Ribosomal protein L10 family protein	0,790302
Pp3c4_20940	Lactate/malate dehydrogenase family protein	0,789722
Pp3c4_25770	Chalcone-flavanone isomerase family protein	0,789526
Pp3c5_4240	GRIM-19 protein	0,786274
Pp3c7_30	-	0,784607
Pp3c1_24350	alanine:glyoxylate aminotransferase	0,784459

PpHCT (Pp3c2_29140)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c2_29140	hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyl transferase	1
Pp3c18_6360	4-coumarate:CoA ligase 3	0,898324
Pp3c23_10340	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,87769
Pp3c24_10150	XB3 ortholog 5 in Arabidopsis thaliana	0,871531
Pp3c13_16030	polygalacturonase 2	0,866391
Pp3c1_27530	-	0,859002
Pp3c22_19010	cytochrome P450, family 98, subfamily A, polypeptide 3	0,85809
Pp3c12_21430	PLAC8 family protein	0,854079
Pp3c11_2770	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	0,841251
Pp3c16_15310	polygalacturonase 1	0,835887
Pp3c2_19180	exocyst complex component 84B	0,823784
Pp3c20_23750	-	0,809631
Pp3c21_9220	Prolyl oligopeptidase family protein	0,806746
Pp3c2_18480	cell division control 2	0,804517
Pp3c22_6940	-	0,79972
Pp3c7_7840	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	0,796909
Pp3c7_24870	-	0,796176
Pp3c7_430	Fasciclin-like arabinogalactan family protein	0,792027
Pp3c11_6250	Fatty acid hydroxylase superfamily	0,790929
Pp3c10_14420	Protein kinase superfamily protein	0,788268
Pp3c9_870	-	0,787761
Pp3c3_15592	-	0,787412
Pp3c16_19010	-	0,785644
Pp3c8_490	-	0,781153
Pp3c6_17920	Bestrophin-like protein	0,779984
Pp3c11_8020	phragmoplast orienting kinesin 1	0,778354
Pp3c2_29950	-	0,775805
Pp3c24_15330	methyl esterase 13	0,775093
Pp3c19_11220	aldehyde dehydrogenase 3H1	0,774416
Pp3c25_7770	plectin-related	0,773189
Pp3c3_28520	meristematic receptor-like kinase	0,771324
Pp3c10_24680	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	0,769644
Pp3c20_5390	beta glucosidase 40	0,76813
Pp3c3_2610	-	0,767921
Pp3c23_14680	methyl esterase 13	0,766987
Pp3c5_6640	-	0,765684
Pp3c20_23430	Chlorophyll A-B binding family protein	0,765261
Pp3c26_7190	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,764167
Pp3c10_11360	Ankyrin repeat family protein	0,763599
Pp3c3_19890	polygalacturonase 2	0,763568
Pp3c6_17860	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	0,762399
Pp3c3_2190	-	0,761794
Pp3c3_37980	acyl-CoA synthetase 5	0,760234
Pp3c1_31401	-	0,756138
Pp3c8_25260	adenosine kinase 1	0,752414
Pp3c4_10010	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	0,75168
Pp3c22_260	GNS1/SUR4 membrane protein family	0,749612
Pp3c3_30140	-	0,749111
Pp3c6_23290	syntaxin of plants 73	0,749009
Pp3c6_5010	fatty acyl-ACP thioesterases B	0,745781
Pp3c4_19290	-	0,731658

PpFHT (Pp3c14_6190)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c14_6190	HXXXD-type acyl-transferase family protein	1
Pp3c16_22890	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,966818
Pp3c2_30400	cytochrome P450, family 703, subfamily A, polypeptide 2	0,966522
Pp3c19_19870	-	0,957376
Pp3c3_1540	glyoxal oxidase-related protein	0,955393
Pp3c9_18550	Peroxidase superfamily protein	0,954315
Pp3c3_30190	Peroxidase superfamily protein	0,952789
Pp3c6_8800	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,951864
Pp3c4_3290	IQ-domain 2	0,944386
Pp3c4_6580	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,938081
Pp3c8_7390	-	0,932125
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	0,93169
Pp3c17_9350	IQ-domain 31	0,926143
Pp3c17_12850	Protein of unknown function, DUF538	0,924161
Pp3c20_22940	respiratory burst oxidase protein F	0,92002
Pp3c14_150	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,917354
Pp3c2_37800	-	0,917177
Pp3c7_3350	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,91618
Pp3c7_23300	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,915195
Pp3c16_8540	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 17 precursor	0,913624
Pp3c5_1510	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	0,913273
Pp3c27_870	-	0,909993
Pp3c10_5480	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,90944
Pp3c2_16180	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,909236
Pp3c13_4480	Chitinase family protein	0,908141
Pp3c1_26250	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,907971
Pp3c14_13750	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	0,90519
Pp3c22_21420	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,902508
Pp3c11_6660	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,900426
Pp3c5_23400	Pectin lyase-like superfamily protein	0,897107
Pp3c4_3140	Patched family protein	0,896472
Pp3c3_28930	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,895808
Pp3c9_5100	-	0,894638
Pp3c3_35240	Pectin lyase-like superfamily protein	0,887871
Pp3c6_11450	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	0,88213
Pp3c6_29200	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	0,880856
Pp3c11_23110	-	0,880244
Pp3c21_16990	Pectate lyase family protein	0,879256
Pp3c3_36100	Phosphate-responsive 1 family protein	0,878965
Pp3c3_14110	NSP-interacting kinase 2	0,878313
Pp3c10_20140	Pectin lyase-like superfamily protein	0,877749
Pp3c25_15360	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein	0,876997
Pp3c6_4610	-	0,876783
Pp3c16_22860	-	0,875671
Pp3c26_3590	ABC-2 type transporter family protein	0,873927
Pp3c12_15740	MATE efflux family protein	0,872891
Pp3c21_11170	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	0,872397
Pp3c14_25780	GDGL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,872138
Pp3c16_20960	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,87144
Pp3c19_18560	GRAS family transcription factor	0,870929
Pp3c12_15120	IQ-domain 3	0,870873

PpCUS1 (Pp3c14_19530)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c14_19530	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	1
Pp3c4_3440	AWPM-19-like family protein	0,982167
Pp3c19_15950	Oxysterol-binding family protein	0,980774
Pp3c25_10500	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,974772
Pp3c11_23110	-	0,9717
Pp3c17_21660	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,970368
Pp3c3_35240	Pectin lyase-like superfamily protein	0,969394
Pp3c8_5520	Peroxidase superfamily protein	0,963185
Pp3c15_22510	Peroxidase superfamily protein	0,957055
Pp3c5_24630	-	0,954261
Pp3c18_19660	expansin A9	0,935296
Pp3c2_31420	-	0,933629
Pp3c4_28828	-	0,931922
Pp3c22_17100	CYCLIN D1;1	0,924341
Pp3c23_21230	-	0,917163
Pp3c6_17540	-	0,917096
Pp3c17_19460	Stigma-specific Stig1 family protein	0,909134
Pp3c3_9830	Remorin family protein	0,908691
Pp3c13_7700	BTB/POZ domain-containing protein	0,905769
Pp3c21_8200	-	0,904822
Pp3c19_19870	-	0,899621
Pp3c9_7310	-	0,899278
Pp3c22_5810	-	0,895201
Pp3c10_9070	-	0,886888
Pp3c7_22969	-	0,88601
Pp3c5_8630	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,884762
Pp3c2_2920	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,88122
Pp3c26_3590	ABC-2 type transporter family protein	0,880564
Pp3c9_14340	-	0,879978
Pp3c26_15180	-	0,879653
Pp3c20_2380	cytokinin oxidase/dehydrogenase 1	0,876965
Pp3c6_4610	-	0,876701
Pp3c12_23390	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,870334
Pp3c17_1780	growth-regulating factor 2	0,867199
Pp3c13_20360	expansin A9	0,865365
Pp3c12_3720	growth-regulating factor 2	0,864995
Pp3c11_11470	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,859513
Pp3c1_13200	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,854683
Pp3c11_6660	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,850594
Pp3c17_19670	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	0,84821
Pp3c12_25410	-	0,845589
Pp3c14_20550	Chalcone and stilbene synthase family protein	0,83671
Pp3c22_21710	-	0,836022
Pp3c14_13750	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	0,828675
Pp3c3_33340	-	0,82813
Pp3c2_28960	-	0,825157
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	0,822731
Pp3c27_870	-	0,821008
Pp3c4_11900	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	0,814827
Pp3c14_18440	expansin A14	0,808711
Pp3c20_9009	-	0,808359

PpCUS2 (Pp3c17_21660)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c17_21660	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	1
Pp3c4_3440	AWPM-19-like family protein	0,928458
Pp3c11_23110	-	0,917139
Pp3c8_5520	Peroxidase superfamily protein	0,892786
Pp3c14_19530	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,892506
Pp3c15_22510	Peroxidase superfamily protein	0,884577
Pp3c25_10500	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,8832
Pp3c3_35240	Pectin lyase-like superfamily protein	0,876613
Pp3c18_19660	expansin A9	0,87614
Pp3c3_9830	Remorin family protein	0,862285
Pp3c19_15950	Oxysterol-binding family protein	0,859056
Pp3c19_19870	-	0,855032
Pp3c13_7700	BTB/POZ domain-containing protein	0,852457
Pp3c5_24630	-	0,852093
Pp3c10_9070	-	0,845931
Pp3c26_3590	ABC-2 type transporter family protein	0,840015
Pp3c22_17100	CYCLIN D1;1	0,83616
Pp3c12_23390	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,835639
Pp3c27_870	-	0,832264
Pp3c2_31420	-	0,831343
Pp3c6_4610	-	0,830158
Pp3c4_28828	-	0,826616
Pp3c6_29200	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	0,824685
Pp3c2_2920	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,824348
Pp3c7_17580	Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	0,824261
Pp3c1_13200	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,822567
Pp3c8_7390	-	0,817395
Pp3c7_22969	-	0,817041
Pp3c1_38330	IQ-domain 6	0,816506
Pp3c17_19460	Stigma-specific Stig1 family protein	0,815113
Pp3c11_6660	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,811989
Pp3c14_6190	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,811541
Pp3c6_17540	-	0,810351
Pp3c5_8630	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,809493
Pp3c12_9480	glyoxal oxidase-related protein	0,808214
Pp3c10_20140	Pectin lyase-like superfamily protein	0,8047
Pp3c16_22890	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,803481
Pp3c21_8200	-	0,801829
Pp3c9_7310	-	0,796364
Pp3c15_24050	KH domain-containing protein / zinc finger (CCCH type) family protein	0,795403
Pp3c20_9009	-	0,794327
Pp3c14_20550	Chalcone and stilbene synthase family protein	0,793157
Pp3c6_11450	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	0,79173
Pp3c3_34230	-	0,791668
Pp3c14_26040	SCAR homolog 2	0,78903
Pp3c7_15590	microtubule-associated proteins 65-1	0,784451
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	0,782056
Pp3c25_11700	-	0,775725
Pp3c3_33340	-	0,775393
Pp3c20_2380	cytokinin oxidase/dehydrogenase 1	0,765597
Pp3c2_28960	-	0,753197

PpRBOH (Pp3c20_22940)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c20_22940	respiratory burst oxidase protein F	1
Pp3c17_9350	IQ-domain 31	0,981728
Pp3c3_30190	Peroxidase superfamily protein	0,974905
Pp3c14_6190	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,966593
Pp3c9_18550	Peroxidase superfamily protein	0,96473
Pp3c12_3090	Plant stearyl-acyl-carrier-protein desaturase family protein	0,962838
Pp3c3_14110	NSP-interacting kinase 2	0,959097
Pp3c3_1540	glyoxal oxidase-related protein	0,957066
Pp3c4_3140	Patched family protein	0,953751
Pp3c17_12850	Protein of unknown function, DUF538	0,953229
Pp3c2_30400	cytochrome P450, family 703, subfamily A, polypeptide 2	0,942274
Pp3c5_1510	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	0,942258
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	0,941025
Pp3c3_36100	Phosphate-responsive 1 family protein	0,936112
Pp3c4_6580	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,930185
Pp3c16_22890	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,927065
Pp3c9_5100	-	0,92455
Pp3c2_37800	-	0,921535
Pp3c1_11310	-	0,91903
Pp3c11_6660	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,917513
Pp3c3_28930	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,917356
Pp3c4_3290	IQ-domain 2	0,916836
Pp3c1_26250	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,910654
Pp3c7_15580	microtubule-associated proteins 65-1	0,904318
Pp3c6_8800	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,897701
Pp3c14_9450	-	0,897135
Pp3c22_21420	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,896999
Pp3c3_33250	-	0,893955
Pp3c7_3350	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,891592
Pp3c15_23600	-	0,889096
Pp3c19_19870	-	0,887312
Pp3c14_25780	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,885308
Pp3c7_16400	-	0,884731
Pp3c3_3690	-	0,883266
Pp3c14_150	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,879363
Pp3c23_22550	lipase 1	0,874782
Pp3c10_5480	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,871113
Pp3c13_4480	Chitinase family protein	0,871035
Pp3c16_22860	-	0,871011
Pp3c6_7030	CHASE domain containing histidine kinase protein	0,870954
Pp3c8_7390	-	0,859321
Pp3c19_18560	GRAS family transcription factor	0,85906
Pp3c3_2190	-	0,857121
Pp3c2_16180	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,856514
Pp3c24_3340	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,855286
Pp3c18_7000	ABC-2 type transporter family protein	0,854698
Pp3c3_31550	-	0,852321
Pp3c7_23300	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,851878
Pp3c3_12740	IQ-domain 1	0,851433
Pp3c13_1650	-	0,850154
Pp3c9_4680	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein	0,849927

PpLRR-RLK1 (Pp3c4_6580)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c4_6580	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	1
Pp3c3_1540	glyoxal oxidase-related protein	0,955704
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	0,948548
Pp3c9_18550	Peroxidase superfamily protein	0,946326
Pp3c14_150	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,944592
Pp3c16_22890	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,938122
Pp3c14_6190	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,938081
Pp3c3_30190	Peroxidase superfamily protein	0,937439
Pp3c4_3140	Patched family protein	0,936939
Pp3c2_30400	cytochrome P450, family 703, subfamily A, polypeptide 2	0,936763
Pp3c13_4480	Chitinase family protein	0,931778
Pp3c7_23300	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,931521
Pp3c17_12850	Protein of unknown function, DUF538	0,93125
Pp3c17_9350	IQ-domain 31	0,92656
Pp3c3_28930	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,923691
Pp3c22_21420	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,922148
Pp3c9_5100	-	0,921409
Pp3c7_15580	microtubule-associated proteins 65-1	0,918545
Pp3c6_8800	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,916941
Pp3c1_26250	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,912296
Pp3c17_6440	pectin methylesterase PCR fragment F	0,911439
Pp3c11_6660	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,911265
Pp3c15_23600	-	0,908508
Pp3c8_7390	-	0,907068
Pp3c21_16990	Pectate lyase family protein	0,906584
Pp3c5_1510	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	0,904343
Pp3c3_36100	Phosphate-responsive 1 family protein	0,900596
Pp3c19_19870	-	0,90005
Pp3c14_25780	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,899445
Pp3c16_22860	-	0,899212
Pp3c6_17560	Remorin family protein	0,899022
Pp3c20_22940	respiratory burst oxidase protein F	0,897135
Pp3c13_13360	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,896834
Pp3c14_13711	-	0,893243
Pp3c16_8540	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 17 precursor	0,892934
Pp3c2_37800	-	0,892296
Pp3c14_13750	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	0,890839
Pp3c2_16180	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,890801
Pp3c1_6510	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,889677
Pp3c7_3350	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,887839
Pp3c25_10760	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,886488
Pp3c6_19970	crinkly4	0,886298
Pp3c4_3290	IQ-domain 2	0,883485
Pp3c21_11220	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,882769
Pp3c15_7400	early nodulin-like protein 1	0,882608
Pp3c1_17360	ERECTA-like 1	0,881107
Pp3c11_26130	beta glucosidase 42	0,877315
Pp3c5_23400	Pectin lyase-like superfamily protein	0,876136
Pp3c3_35240	Pectin lyase-like superfamily protein	0,873241
Pp3c3_13080	Protein of unknown function (DUF1218)	0,872812
Pp3c15_7150	cellulose synthase 1	0,87261

PpLRR-RLK2 (Pp3c22_21420)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c22_21420	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	1
Pp3c13_4480	Chitinase family protein	0,980663
Pp3c17_12850	Protein of unknown function, DUF538	0,98062
Pp3c4_3140	Patched family protein	0,974878
Pp3c3_1540	glyoxal oxidase-related protein	0,971347
Pp3c26_2880	Chitinase family protein	0,971325
Pp3c15_7400	early nodulin-like protein 1	0,971028
Pp3c7_23300	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,962617
Pp3c17_9350	IQ-domain 31	0,962114
Pp3c7_3350	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,958827
Pp3c6_17560	Remorin family protein	0,958608
Pp3c1_6510	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,958261
Pp3c6_8800	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,957926
Pp3c21_16990	Pectate lyase family protein	0,957089
Pp3c3_13080	Protein of unknown function (DUF1218)	0,956923
Pp3c7_15580	microtubule-associated proteins 65-1	0,956044
Pp3c16_8540	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 17 precursor	0,953677
Pp3c24_3340	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,953273
Pp3c3_12740	IQ-domain 1	0,952227
Pp3c3_28930	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,949578
Pp3c3_27980	glycosyl hydrolase 9A1	0,94807
Pp3c25_15360	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein	0,94537
Pp3c5_23400	Pectin lyase-like superfamily protein	0,941141
Pp3c14_25780	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,941085
Pp3c18_19720	expansin A1	0,940933
Pp3c21_11170	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	0,940246
Pp3c16_20960	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,939342
Pp3c11_26130	beta glucosidase 42	0,938955
Pp3c2_37800	-	0,938782
Pp3c4_6580	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,936579
Pp3c1_26250	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,936374
Pp3c3_36100	Phosphate-responsive 1 family protein	0,93372
Pp3c14_150	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,930904
Pp3c18_14410	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,930398
Pp3c16_3130	-	0,926793
Pp3c2_16180	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,925764
Pp3c11_1180	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein	0,925259
Pp3c12_25610	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,923594
Pp3c9_4450	proline transporter 2	0,923276
Pp3c15_23600	-	0,922148
Pp3c4_2380	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	0,921824
Pp3c22_12040	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	0,920428
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	0,920386
Pp3c2_16710	-	0,920217
Pp3c10_22140	Core-2/l-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	0,91957
Pp3c6_25650	-	0,918118
Pp3c14_13750	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	0,914841
Pp3c16_8400	Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored	0,914441
Pp3c14_20550	Chalcone and stilbene synthase family protein	0,912346
Pp3c25_4180	ralf-like 34	0,910949
Pp3c6_18850	-	0,909233

PpPRX1 (Pp3c3_30190)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c3_30190	Peroxidase superfamily protein	1
Pp3c9_18550	Peroxidase superfamily protein	0,986694
Pp3c14_6190	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,981728
Pp3c17_12850	Protein of unknown function, DUF538	0,97181
Pp3c5_1510	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	0,971617
Pp3c8_7390	-	0,966204
Pp3c4_6580	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,963204
Pp3c1_26250	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,961713
Pp3c20_22940	respiratory burst oxidase protein F	0,961052
Pp3c16_22890	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,958378
Pp3c19_19870	-	0,952438
Pp3c6_8800	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,951046
Pp3c3_1540	glyoxal oxidase-related protein	0,946315
Pp3c2_30400	cytochrome P450, family 703, subfamily A, polypeptide 2	0,946268
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	0,942823
Pp3c14_150	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,940466
Pp3c17_9350	IQ-domain 31	0,937439
Pp3c3_36100	Phosphate-responsive 1 family protein	0,936295
Pp3c9_5100	-	0,934622
Pp3c15_23600	-	0,931678
Pp3c5_23400	Pectin lyase-like superfamily protein	0,929655
Pp3c4_3140	Patched family protein	0,928643
Pp3c7_3350	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,927575
Pp3c6_11450	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	0,926758
Pp3c22_21420	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,926701
Pp3c13_4480	Chitinase family protein	0,925493
Pp3c20_5780	expansin A15	0,911975
Pp3c9_18809	-	0,908274
Pp3c16_8540	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 17 precursor	0,907997
Pp3c4_22920	Stigma-specific Stig1 family protein	0,89981
Pp3c2_16180	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,898879
Pp3c27_870	-	0,890406
Pp3c13_8450	-	0,889102
Pp3c19_18560	GRAS family transcription factor	0,887891
Pp3c11_1180	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein	0,88762
Pp3c3_9780	-	0,884614
Pp3c7_15580	microtubule-associated proteins 65-1	0,883354
Pp3c10_5480	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,8818
Pp3c7_23300	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,88179
Pp3c12_13340	-	0,880243
Pp3c2_37800	-	0,879881
Pp3c21_16990	Pectate lyase family protein	0,875481
Pp3c15_7400	early nodulin-like protein 1	0,870835
Pp3c4_3290	IQ-domain 2	0,869785
Pp3c16_22860	-	0,869127
Pp3c18_14410	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,867318
Pp3c21_1850	expansin A1	0,866036
Pp3c6_19970	crinkly4	0,865084
Pp3c11_22660	Jajoba acyl CoA reductase-related male sterility protein	0,864776
Pp3c14_24850	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,862648
Pp3c1_6510	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,861314

PpPRX2 (Pp3c9_18550)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c9_18550	Peroxidase superfamily protein	1
Pp3c3_30190	Peroxidase superfamily protein	0,961713
Pp3c3_1540	glyoxal oxidase-related protein	0,954315
Pp3c14_6190	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,947539
Pp3c5_1510	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	0,946834
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	0,943612
Pp3c2_30400	cytochrome P450, family 703, subfamily A, polypeptide 2	0,94285
Pp3c4_6580	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,938565
Pp3c17_12850	Protein of unknown function, DUF538	0,935874
Pp3c17_9350	IQ-domain 31	0,931852
Pp3c1_26250	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,929499
Pp3c8_7390	-	0,928774
Pp3c16_22890	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,924452
Pp3c6_8800	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,921191
Pp3c2_37800	0	0,920789
Pp3c4_3140	-	0,91903
Pp3c2_16180	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,918218
Pp3c20_22940	respiratory burst oxidase protein F	0,915955
Pp3c3_36100	Phosphate-responsive 1 family protein	0,915647
Pp3c5_23400	Pectin lyase-like superfamily protein	0,914715
Pp3c7_3350	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,913739
Pp3c1_6510	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,913625
Pp3c7_23300	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,906908
Pp3c14_150	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,906576
Pp3c11_1180	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein	0,905781
Pp3c19_19870	-	0,904497
Pp3c16_8540	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 17 precursor	0,90124
Pp3c13_4480	Chitinase family protein	0,900047
Pp3c22_21420	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,899946
Pp3c21_16990	Pectate lyase family protein	0,897529
Pp3c16_22860	-	0,89468
Pp3c1_11310	-	0,893072
Pp3c25_10760	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,893002
Pp3c9_5100	-	0,891162
Pp3c9_3880	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9	0,890472
Pp3c3_14110	NSP-interacting kinase 2	0,887646
Pp3c24_3340	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,886606
Pp3c10_5480	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,883656
Pp3c20_5780	expansin A15	0,882904
Pp3c15_23600	-	0,878205
Pp3c16_20960	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,876657
Pp3c4_3290	IQ-domain 2	0,87643
Pp3c16_3130	-	0,876377
Pp3c1_33130	Pectin lyase-like superfamily protein	0,875077
Pp3c25_4690	gibberellin 20-oxidase 3	0,874496
Pp3c9_18809	-	0,873133
Pp3c21_11170	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	0,872572
Pp3c11_6660	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,872248
Pp3c3_3640	Fasciclin-like arabinogalactan family protein	0,871743
Pp3c18_19720	expansin A1	0,871584
Pp3c18_14410	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,871578

PpPRX3 (Pp3c23_8110)

Gene ID	Annotation	Coexpression (Pearson correlation factor)
Pp3c23_8110	Peroxidase family protein	1
Pp3c4_6580	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,971386
Pp3c3_36100	Phosphate-responsive 1 family protein	0,968938
Pp3c9_18550	Peroxidase superfamily protein	0,968868
Pp3c7_23300	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,968663
Pp3c17_9350	IQ-domain 31	0,968421
Pp3c3_1540	glyoxal oxidase-related protein	0,965573
Pp3c3_28930	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,963413
Pp3c14_6190	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,961052
Pp3c14_150	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,960501
Pp3c13_4480	Chitinase family protein	0,958261
Pp3c2_37800	-	0,958186
Pp3c14_13750	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	0,958068
Pp3c21_16990	Pectate lyase family protein	0,957989
Pp3c4_3140	Patched family protein	0,957066
Pp3c3_30190	Peroxidase superfamily protein	0,956826
Pp3c22_21420	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,95558
Pp3c16_22860	-	0,954941
Pp3c7_3350	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,952453
Pp3c16_8540	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 17 precursor	0,951529
Pp3c7_15580	microtubule-associated proteins 65-1	0,949452
Pp3c6_8800	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0,948548
Pp3c11_6660	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,948176
Pp3c3_35240	Pectin lyase-like superfamily protein	0,947539
Pp3c11_1180	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein	0,945778
Pp3c3_3640	Fasciclin-like arabinogalactan family protein	0,945398
Pp3c17_12850	Protein of unknown function, DUF538	0,941727
Pp3c20_22940	respiratory burst oxidase protein F	0,940468
Pp3c19_19870	-	0,93643
Pp3c2_30400	cytochrome P450, family 703, subfamily A, polypeptide 2	0,935552
Pp3c25_4690	gibberellin 20-oxidase 3	0,928637
Pp3c14_13711	-	0,923967
Pp3c16_22890	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,919016
Pp3c2_16180	3-ketoacyl-CoA synthase 11	0,915177
Pp3c6_18540	-	0,910406
Pp3c8_7390	-	0,908186
Pp3c9_4450	proline transporter 2	0,905
Pp3c3_14110	NSP-interacting kinase 2	0,904772
Pp3c21_8200	-	0,901021
Pp3c14_25780	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,900891
Pp3c22_15860	-	0,895915
Pp3c5_23400	Pectin lyase-like superfamily protein	0,889539
Pp3c17_17970	fatty acid hydroxylase 2	0,887255
Pp3c15_23600	-	0,887073
Pp3c2_9340	cytochrome P450, family 704, subfamily B, polypeptide 1	0,885942
Pp3c24_15730	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 3	0,882024
Pp3c4_12460	STRUBBELIG-receptor family 8	0,875501
Pp3c6_600	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	0,875204
Pp3c4_22920	Stigma-specific Stig1 family protein	0,873852
Pp3c8_7420	Cellulose synthase family protein	0,87139
Pp3c14_24850	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,870742

Annexe 6 : Listes des milieux et solutions utilisés

Milieu LB : Peptone 10 g/L ; Extrait de levure 5 g/L ; NaCl 10 g/L.

Milieu Knop : Le milieu Knop contient les éléments minéraux suivants : KH_2PO_4 250 mg/L ; KCl 250 mg/L ; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 250 mg/L ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 100 mg/L, préparé à partir de solutions mères à 100X. 12 mg/L de $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ sont introduits au moment de préparer les milieux, avant d'ajuster le pH à 5,8 avec du KOH. Les milieux solides sont supplémentés avec de l'agar (12g/L). Les milieux sont stérilisés par autoclavage.

Milieu Gamborg B5 ½ (GB/2) : Le milieu GB/2 est préparé à partir d'un mix commercial d'éléments minéraux (Gamborg B5), solubilisés dans l'eau à une concentration mère 10X. Les milieux contiennent du Gamborg B5 à 0,5X final, 0,5 g/L de MES (acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique) utilisé à une concentration 1/2, et le pH est ajusté à 5,5 avec du KOH. Les milieux solides sont supplémentés avec de l'agar (12g/L). Les milieux sont stérilisés par autoclavage.

Milieu 0M51C : Le milieu 0M51C contient un mix commercial d'éléments minéraux (051MC) à 1X final, 0,5 g/L de MES, 20g/L de sucrose et 1g/L de Casamino Acids. Le pH est ajusté à 5,5 avec du KOH, et les milieux sont stérilisés par autoclavage.

Milieu 0,5M : 91,1 g de mannitol sont dissous dans 800 mL d'eau. Le pH est ajusté à 5,8 avec du KOH, et l'osmolarité est mesurée et ajustée si besoin à 580 mOs par l'ajout d'eau ou de mannitol. Le milieu est stérilisé par autoclavage.

Milieu 3M : 3,05 g de MgCl_2 , 1 g de MES et 87,4 g de mannitol sont dissous dans 800 mL d'eau. Le pH est ajusté à 5,6 avec du KOH, et l'osmolarité est mesurée et ajustée si besoin à 580 mOs par l'ajout d'eau ou de mannitol. Le milieu est stérilisé par autoclavage.

Solution de PEG : 10 g de PEG 4000 sont dissous dans 25 mL de milieu 3M en chauffant à 50°C sous agitation. La solution est stérilisée par filtration sur 0,22 μm .

Milieu de régénération : 50 g/L de glucose et 30 g/L de mannitol sont dissous dans du milieu Knop. Le pH est ajusté à 5,8 avec du KOH, et la solution est stérilisée par filtration sur 0,22 μm .

Annexe 7 : Facteurs de réponse des monomères de cutine en GC-TOFMS

Les facteurs de réponses ont été calculés à partir de standards sous forme méthyl-ester (ME) commerciaux (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C22:0, C24:0, *p*-coumarate et caféate) ou synthétisés chimiquement à partir des formes acide libre (cinnamate, ω OH-C16 et diOH-C16). Des quantités identiques de molécules ont été analysées à GC-TOFMS, et le rapport des aires obtenues par rapport au C17:0 a permis de calculer un facteur de réponse pour chaque molécule, en masse ou en molarité. De la même manière, un facteur de réponse a été calculé pour le glycérol par rapport au ribitol. Les aires obtenues lors de l'analyse compositionnelle de la cutine ont été divisées par ces facteurs de réponse.

Standard	Response factor (molarity)	Response factor (mass)
ribitol	1,00	1,00
glycerol	1,05	0,64
C17:0	1,00	1,00
cinnamate ME	2,11	1,16
<i>p</i> -coumarate ME	2,78	1,83
caffeate ME	0,84	0,60
ferulate ME	1,23	0,95
C14:0 ME	0,58	0,52
C16:0 ME	0,61	0,61
C18:0 ME	0,61	0,68
C18:1 ME	1,16	1,27
C18:2 ME	3,74	4,07
C18:3 ME	0,76	0,82
C20:0 ME	0,62	0,75
C20:4 ME	0,62	0,75
C22:0 ME	0,62	0,82
C24:0 ME	0,64	0,90
ω OHC16 ME	2,13	2,14
diOH-C16 ME	1,52	1,62
triOH-C18 ME	1,52	1,62

Annexe 8 : Transitions MRM utilisées en UHPLC-MS/MS

Standard	Molecular weight	Ionization mode	Collision energy	Precursor ion	Product ion
<i>t</i> -cinnamate	148,0	Neg.	9	147,0	103,2
<i>p</i> -coumarate	164,2	Neg.	9	163,0	119,0
caffeate	180,2	Neg.	18	179,0	135,1
<i>p</i> -coumaroyl-threoante	233,0	Pos.	10	283,0	147,0
caffeoyl-threonate	298,1	Pos.	38	299,0	89,0
<i>p</i> -coumaroyl-shikimate	362,3	Neg.	8	320,9	147,0
2-MHG	362,2	Pos.	6	363,0	345,2
coumaroyl-palmitate	418,2	Neg.	22	417,2	145,1
coumaroyl-hydroxypalmitate	434,2	Neg.	19	433,2	145,1
caffeoyl-palmitate	434,2	Neg.	22	433,2	161,0
caffeoyl-hydroxypalmitate	450,2	Neg.	24	449,2	161,0

Annexe 9 : Résultats des analyses statistiques

Figure 14B

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48/a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
<i>PpCYP73A48</i>	0,000080	1,762	0,005600	1,756	0,1068	16,44	4,000	0,000160
<i>PpCYP73A49</i>	0,205788	11,78	21,46	-9,678	6,413	1,509	4,000	0,205788
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
<i>PpCYP73A48</i>	0,380641	1,762	2,020	-0,2587	0,2628	0,9844	4,000	0,380641
<i>PpCYP73A49</i>	0,000381	11,78	0,02930	11,76	1,064	11,05	4,000	0,000763
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48/a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
<i>PpCYP73A48</i>	-	1,762	nd	-	-	-	-	-
<i>PpCYP73A49</i>	0,000467	11,78	0,2698	11,51	1,097	10,49	4,000	0,000467

Figure 14D

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,509011	0,6009	0,5369	0,06400	0,08837	0,7242	4,000	0,509011
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,000004	0,6009	1,926	-1,325	0,03866	34,27	4,000	0,000004

Figure 15B

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,209775	1,000	0,8643	0,1357	0,09090	1,493	4,000	0,610055
pC4T	0,496461	1,000	0,8813	0,1187	0,1589	0,7472	4,000	0,746448
C2T	0,332245	1,000	0,9051	0,09490	0,08610	1,102	4,000	0,702250
C4T	0,697257	1,000	0,9680	0,03201	0,07654	0,4182	4,000	0,746448
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,926914	1,000	1,007	-0,007448	0,07628	0,09764	4,000	0,926914
pC4T	0,101731	1,000	0,7331	0,2669	0,1261	2,117	4,000	0,193113
C2T	0,001880	1,000	0,4260	0,5740	0,07871	7,292	4,000	0,005628
C4T	0,000999	1,000	0,2993	0,7007	0,08136	8,613	4,000	0,003990
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48/a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,000063	1,000	0,000	1,000	0,05727	17,46	4,000	0,000253
pC4T	0,001238	1,000	0,000	1,000	0,1228	8,141	4,000	0,001238
C2T	0,000152	1,000	0,000	1,000	0,07150	13,99	4,000	0,000455
C4T	0,000191	1,000	0,000	1,000	0,07580	13,19	4,000	0,000455

Figure 15C

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
<i>t</i> -cinnamate	-	nd	nd	-	-	-	-	-
<i>p</i> -coumarate	0,610115	186,2	179,8	6,417	11,62	0,5524	4,000	0,836432
caffeate	0,595564	582,2	567,8	14,44	25,08	0,5758	4,000	0,836432
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
<i>t</i> -cinnamate	-	nd	87,43	-	-	-	-	-
<i>p</i> -coumarate	0,428968	186,2	212,7	-26,47	30,11	0,8791	4,000	0,428968
caffeate	0,000217	582,2	224,2	358,0	28,03	12,77	4,000	0,000650
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48/a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
<i>t</i> -cinnamate	-	nd	111,0	-	-	-	-	-
<i>p</i> -coumarate	0,000006	186,2	0,000	186,2	6,007	31,01	4,000	0,000013
caffeate	0,000002	582,2	0,000	582,2	13,76	42,31	4,000	0,000006

Figure 15D

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,524163	397,1	414,3	-17,23	24,72	0,6970	4,000	0,998749
<i>p</i> -coumarate	0,681081	77,67	73,80	3,867	8,741	0,4424	4,000	0,998749
caffeate	0,103623	128,3	166,4	-38,10	18,14	2,100	4,000	0,758799
C16:0	0,668996	1306	1334	-27,83	60,42	0,4606	4,000	0,998749
C18:0	0,969877	214,1	214,8	-0,7000	17,42	0,04018	4,000	0,998749
C18:1	0,600237	185,4	175,3	10,13	17,83	0,5683	4,000	0,998749
C18:2	0,365732	142,7	157,9	-15,20	14,91	1,019	4,000	0,989463
C18:3	0,763790	90,67	85,87	4,800	14,92	0,3217	4,000	0,998749
C20:0	0,769105	134,7	130,4	4,233	13,48	0,3142	4,000	0,998749
C22:0	0,645248	169,3	187,8	-18,53	37,29	0,4970	4,000	0,998749
C24:0	0,077392	167,1	148,4	18,70	7,913	2,363	4,000	0,676228
ω OH-C16	0,550898	119,8	114,3	5,533	8,508	0,6504	4,000	0,998749
diOH-C16	0,165894	1423	1359	64,27	37,98	1,692	4,000	0,886589
OHC18:1	0,289410	62,13	54,67	7,467	6,119	1,220	4,000	0,976676
triOH-C18	0,030371	530,6	465,9	64,70	19,70	3,285	4,000	0,370373
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,623891	397,1	420,6	-23,47	44,24	0,5304	4,000	0,979990
<i>p</i> -coumarate	0,140095	77,67	85,63	-7,967	4,337	1,837	4,000	0,595700
caffeate	0,009743	128,3	57,67	70,60	15,22	4,639	4,000	0,084344
C16:0	0,002296	1306	1029	277,1	40,08	6,914	4,000	0,027205
C18:0	0,004693	214,1	166,0	48,10	8,444	5,696	4,000	0,046992
C18:1	0,056131	185,4	138,4	47,00	17,64	2,664	4,000	0,370067

C18:2	0,468532	142,7	134,1	8,567	10,71	0,8000	4,000	0,957598
C18:3	0,894645	90,67	89,00	1,667	11,82	0,1411	4,000	0,998489
C20:0	0,065423	134,7	97,30	37,37	14,83	2,519	4,000	0,377263
C22:0	0,885254	169,3	163,6	5,667	36,86	0,1537	4,000	0,998489
C24:0	0,000328	167,1	132,0	35,13	3,059	11,49	4,000	0,004257
ω OH-C16	0,000132	119,8	179,8	-60,03	4,143	14,49	4,000	0,001976
diOH-C16	0,004366	1423	1027	395,7	68,11	5,810	4,000	0,046992
OHC18:1	0,958061	62,13	62,53	-0,4000	7,149	0,05596	4,000	0,998489
triOH-C18	0,000235	530,6	372,7	157,9	12,63	12,51	4,000	0,003286
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a48/a49</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,001583	397,1	246,5	150,6	19,73	7,632	4,000	0,006316
<i>p</i> -coumarate	0,000032	77,67	0,000	77,67	3,753	20,69	4,000	0,000387
caffeate	0,000597	128,3	0,000	128,3	13,03	9,846	4,000	0,004170
C16:0	0,000024	1306	521,2	784,8	35,26	22,26	4,000	0,000314
C18:0	0,000116	214,1	84,80	129,3	8,629	14,98	4,000	0,001040
C18:1	0,000353	185,4	39,30	146,1	12,96	11,27	4,000	0,002818
C18:2	0,002987	142,7	81,77	60,90	9,453	6,442	4,000	0,008934
C18:3	0,065599	90,67	63,13	27,53	10,94	2,517	4,000	0,065599
C20:0	0,000622	134,7	5,633	129,0	13,25	9,742	4,000	0,004170
C22:0	0,014600	169,3	18,10	151,2	36,69	4,121	4,000	0,028987
C24:0	0,000079	167,1	35,87	131,3	7,963	16,49	4,000	0,000793
ω OH-C16	0,000055	119,8	27,40	92,40	5,110	18,08	4,000	0,000605
diOH-C16	0,000004	1423	64,77	1358	38,50	35,28	4,000	0,000054
OHC18:1	0,000783	62,13	6,100	56,03	6,107	9,175	4,000	0,004170
triOH-C18	<0,000001	530,6	5,967	524,6	5,701	92,02	4,000	0,000001

Figure 16B

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #1-2	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
<i>MpCYP73A1</i>	0,042106	2,068	2,552	-0,4840	0,1880	2,574	6,000	0,082439
<i>MpCYP73A2</i>	0,437294	0,05661	0,06296	-0,006350	0,007633	0,8319	6,000	0,437294
<i>MpCYP73A3</i>	0,016872	0,01397	0,01048	0,003493	0,001066	3,278	6,000	0,049768
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #2-3	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
<i>MpCYP73A1</i>	0,407512	2,068	1,953	0,1152	0,1294	0,8904	6,000	0,648958
<i>MpCYP73A2</i>	0,428767	0,05661	0,06748	-0,01086	0,01280	0,8484	6,000	0,648958
<i>MpCYP73A3</i>	0,074345	0,01397	0,01063	0,003340	0,001548	2,157	6,000	0,206864

Figure 16D

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #1-2	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,002218	0,9840	0,6565	0,3275	0,06420	5,102	6,000	0,002218
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #2-3	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,046633	0,9840	0,7295	0,2545	0,1019	2,498	6,000	0,046633

Figure 16E

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #1-2	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
thallus area	<0,000001	7,069	0,7813	6,288	0,3190	19,71	59,00	<0,000001
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #2-3	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
thallus area	<0,000001	7,069	0,03125	7,038	0,2560	27,49	59,00	<0,000001

Figure 16F

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #1-2	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
gemmae cup / plant	<0,000001	442,1	111,5	330,6	12,32	26,84	59,00	<0,000001
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #2-3	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
gemmae cup / plant	<0,000001	442,1	81,06	361,0	10,83	33,32	59,00	<0,000001

Figure 16G

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #1-2	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,001522	2,809	1,699	1,109	0,2019	5,495	6,000	0,012110
<i>t</i> -cinnamate	<0,000001	0,000	2,239	-2,239	0,07644	29,30	6,000	0,000001
<i>p</i> -coumarate	0,000464	8,330	5,186	3,144	0,4568	6,883	6,000	0,004166
ferulate	0,002329	3,004	1,973	1,031	0,2041	5,052	6,000	0,016188
C14:0	0,861770	0,1067	0,1052	0,001541	0,008482	0,1817	6,000	0,861770
C16:0	0,000389	2,903	1,423	1,479	0,2081	7,109	6,000	0,003887
C18:0	0,000107	0,1603	0,09154	0,06880	0,007668	8,972	6,000	0,001285
C18:2	0,035645	0,1880	0,2578	-0,06982	0,02587	2,699	6,000	0,135137
C18:3	0,147586	0,1381	0,1783	-0,04017	0,02417	1,662	6,000	0,380629
C20:0	0,004909	0,1095	0,06676	0,04277	0,009870	4,334	6,000	0,029094
C22:0	0,015337	0,08785	0,04731	0,04055	0,01209	3,354	6,000	0,074368
C24:0	0,238333	0,1642	0,1217	0,04254	0,03249	1,309	6,000	0,419863
ω OH-C16	0,000172	0,2611	0,1032	0,1579	0,01915	8,248	6,000	0,001887

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cyp73a1</i> #2-3	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,000801	2,809	1,675	1,134	0,1824	6,216	6,000	0,006387
<i>t</i> -cinnamate	0,000023	0,000	3,064	-3,064	0,2609	11,74	6,000	0,000276
<i>p</i> -coumarate	0,066069	8,330	7,173	1,157	0,5157	2,243	6,000	0,239218
ferulate	0,001921	3,004	1,850	1,154	0,2198	5,250	6,000	0,011469
C14:0	0,000201	0,1067	0,04495	0,06178	0,007705	8,017	6,000	0,002008
C16:0	0,000362	2,903	1,374	1,528	0,2121	7,206	6,000	0,003251
C18:0	0,000012	0,1603	0,05978	0,1006	0,007618	13,20	6,000	0,000152
C18:2	0,084032	0,1880	0,2298	-0,04186	0,02023	2,069	6,000	0,239218
C18:3	0,627590	0,1381	0,1485	-0,01032	0,02020	0,5110	6,000	0,627590
C20:0	0,001248	0,1095	0,05341	0,05612	0,009827	5,711	6,000	0,008702
C22:0	0,007910	0,08785	0,04063	0,04723	0,01208	3,908	6,000	0,038929
C24:0	0,163640	0,1642	0,1126	0,05168	0,03257	1,587	6,000	0,300503
ω OH-C16	0,000075	0,2611	0,08884	0,1723	0,01801	9,566	6,000	0,000820

Figure 26B

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,064664	0,3885	0,6309	-0,2424	0,1073	2,259	6,000	0,064664

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,000722	0,3885	0,5408	-0,1522	0,02401	6,339	6,000	0,000722

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,000001	0,3885	1,445	-1,057	0,05350	19,76	6,000	0,000001

Figure 27B

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,021525	1,521	2,292	-0,7704	0,2497	3,085	6,000	0,212869
<i>p</i> -coumarate	0,313980	0,9835	1,132	-0,1486	0,1352	1,099	6,000	0,940293
caffeate	0,857324	2,012	2,057	-0,04495	0,2395	0,1877	6,000	0,996310
C14:0	0,648470	0,04668	0,04973	-0,003052	0,006364	0,4796	6,000	0,994083
C16:0	0,423020	4,581	4,752	-0,1717	0,1998	0,8596	6,000	0,963105
C18:0	0,296923	1,262	1,219	0,04305	0,03769	1,142	6,000	0,940293
C18:2	0,641553	0,9985	0,9736	0,02494	0,05090	0,4900	6,000	0,994083
C18:3	0,192854	0,08905	0,07707	0,01198	0,008170	1,467	6,000	0,882639
C20:0	0,000049	0,6179	0,8233	-0,2055	0,01995	10,30	6,000	0,000734
C20:4	0,956470	0,1537	0,1541	-0,0003916	0,006881	0,05690	6,000	0,996310
C22:0	0,000083	0,2997	0,3885	-0,08875	0,009448	9,393	6,000	0,001157
C24:0	0,845473	0,2990	0,3004	-0,001385	0,006804	0,2035	6,000	0,996310
ω OH-C16	0,000976	0,1482	0,09673	0,05146	0,008595	5,987	6,000	0,012609
diOH-C16	0,002739	4,142	3,042	1,100	0,2249	4,890	6,000	0,032380

triOH-C8	0,203045	1,373	1,242	0,1314	0,09198	1,429	6,000	0,882639
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,828429	1,521	1,592	-0,07136	0,3152	0,2264	6,000	0,999133
<i>p</i> -coumarate	0,042878	0,9835	1,131	-0,1472	0,05750	2,561	6,000	0,481785
caffeate	0,211784	2,012	1,710	0,3012	0,2155	1,397	6,000	0,942490
C14:0	0,543974	0,04668	0,05099	-0,004310	0,006703	0,6430	6,000	0,996774
C16:0	0,956189	4,581	4,566	0,01475	0,2575	0,05727	6,000	0,999133
C18:0	0,314161	1,262	1,210	0,05168	0,04705	1,098	6,000	0,984208
C18:2	0,471330	0,9985	0,9533	0,04529	0,05893	0,7685	6,000	0,996774
C18:3	0,185026	0,08905	0,07679	0,01226	0,008187	1,497	6,000	0,930036
C20:0	0,323302	0,6179	0,5939	0,02395	0,02226	1,076	6,000	0,984208
C20:4	0,655917	0,1537	0,1491	0,004653	0,009930	0,4686	6,000	0,996774
C22:0	0,488107	0,2997	0,2908	0,008900	0,01205	0,7385	6,000	0,996774
C24:0	0,965212	0,2990	0,2985	0,0005135	0,01129	0,04546	6,000	0,999133
ω OH-C16	0,094542	0,1482	0,1263	0,02192	0,01105	1,984	6,000	0,751026
diOH-C16	0,856964	4,142	4,219	-0,07668	0,4076	0,1881	6,000	0,999133
triOH-C8	0,554184	1,373	1,516	-0,1425	0,2276	0,6263	6,000	0,996774
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,000073	1,521	3,972	-2,451	0,2555	9,591	6,000	0,000881
<i>p</i> -coumarate	0,000082	0,9835	1,742	-0,7587	0,08062	9,411	6,000	0,000899
caffeate	0,201715	2,012	1,669	0,3425	0,2390	1,433	6,000	0,362741
C14:0	0,028727	0,04668	0,02921	0,01747	0,006103	2,862	6,000	0,110050
C16:0	0,000212	4,581	2,749	1,832	0,2306	7,942	6,000	0,002116
C18:0	0,000003	1,262	0,5584	0,7033	0,04301	16,35	6,000	0,000050
C18:2	0,010204	0,9985	0,7752	0,2233	0,06051	3,690	6,000	0,059684
C18:3	0,001999	0,08905	0,05499	0,03406	0,006539	5,208	6,000	0,013912
C20:0	0,086159	0,6179	0,5545	0,06338	0,03091	2,051	6,000	0,236845
C20:4	0,326774	0,1537	0,1446	0,009159	0,008580	1,068	6,000	0,362741
C22:0	0,021548	0,2997	0,3519	-0,05223	0,01694	3,084	6,000	0,103195
C24:0	0,000328	0,2990	0,2437	0,05531	0,007541	7,336	6,000	0,002949
ω OH-C16	0,001068	0,1482	0,08479	0,06340	0,01077	5,885	6,000	0,008510
diOH-C16	0,000005	4,142	1,064	3,078	0,2042	15,07	6,000	0,000075
triOH-C8	0,000047	1,373	0,6222	0,7508	0,07231	10,38	6,000	0,000607

Figure 27C

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,572941	4661	4549	112,2	188,2	0,5960	6,000	0,572941
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,661433	4661	4805	-144,7	314,3	0,4604	6,000	0,661433
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value

total cutin content	0,000288	4661	2940	1721	229,1	7,510	6,000	0,000288
---------------------	----------	------	------	------	-------	-------	-------	----------

Figure 27D

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,007242	8,121	12,32	-4,201	1,054	3,985	6,000	0,021570
% phenolics	0,076382	16,12	17,15	-1,022	0,4780	2,138	6,000	0,146929
% FAs	0,180081	45,17	47,00	-1,826	1,204	1,517	6,000	0,180081
% OH-aliph	0,000101	30,59	23,54	7,049	0,7774	9,068	6,000	0,000404
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,735172	8,121	8,535	-0,4140	1,168	0,3544	6,000	0,915613
% phenolics	0,302248	16,12	15,43	0,6902	0,6117	1,128	6,000	0,762969
% FAs	0,709506	45,17	44,52	0,6510	1,666	0,3907	6,000	0,915613
% OH-aliph	0,483864	30,59	31,51	-0,9272	1,243	0,7460	6,000	0,862503
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,000003	8,121	27,22	-19,10	1,128	16,94	6,000	0,000008
% phenolics	0,000102	16,12	23,30	-7,172	0,7920	9,055	6,000	0,000203
% FAs	0,000447	45,17	37,37	7,796	1,125	6,930	6,000	0,000447
% OH-aliph	<0,000001	30,59	12,11	18,48	0,3962	46,63	6,000	<0,000001

Figure 27E

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,403870	1,411	1,462	-0,05057	0,05632	0,8978	6,000	0,403870
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,665278	1,411	1,451	-0,03996	0,08788	0,4548	6,000	0,665278
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,000040	1,411	2,106	-0,6945	0,06501	10,68	6,000	0,000040

Figure 28D

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,164041	1,000	0,7725	0,2275	0,1435	1,585	6,000	0,164041
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,211379	1,000	0,7666	0,2334	0,1669	1,399	6,000	0,211379

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,186164	1,000	1,338	-0,3383	0,2267	1,493	6,000	0,186164

Figure 28E

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,340923	1,000	1,331	-0,3310	0,3201	1,034	6,000	0,811312
pC4T	0,175565	1,000	1,464	-0,4643	0,3024	1,535	6,000	0,619126
C2T	0,564999	1,000	1,175	-0,1747	0,2869	0,6088	6,000	0,811312
C4T	0,347639	1,000	1,313	-0,3127	0,3069	1,019	6,000	0,811312
pCS	0,889916	1,000	1,051	-0,05134	0,3555	0,1444	6,000	0,889916

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,568616	1,000	0,7915	0,2085	0,3458	0,6030	6,000	0,816659
pC4T	0,944050	1,000	1,022	-0,02213	0,3025	0,07317	6,000	0,944050
C2T	0,296410	1,000	1,316	-0,3164	0,2767	1,143	6,000	0,754937
C4T	0,124475	1,000	0,4591	0,5409	0,3030	1,785	6,000	0,485551
pCS	0,431907	1,000	0,8163	0,1837	0,2181	0,8423	6,000	0,816659

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,512205	1,000	0,8045	0,1955	0,2807	0,6965	6,000	0,526890
pC4T	0,312170	1,000	0,8286	0,1714	0,1554	1,103	6,000	0,526890
C2T	0,148524	1,000	1,456	-0,4559	0,2751	1,657	6,000	0,382671
C4T	0,050529	1,000	0,3548	0,6452	0,2645	2,439	6,000	0,187306
pCS	0,020241	1,000	0,3525	0,6475	0,2067	3,133	6,000	0,097192

Figure 34C

Variable	P-value	Mean of 0	Mean of 200 μ M	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,075005	0,4417	0,3339	0,1078	0,05010	2,151	6,000	0,075005

Variable	P-value	Mean of 0	Mean of 500 μ M	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,000855	0,4417	0,8032	-0,3615	0,05889	6,139	6,000	0,000855

Variable	P-value	Mean of 0	Mean of 1000 μ M	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,000606	0,4417	1,125	-0,6833	0,1043	6,549	6,000	0,000606

Figure 35B

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
----------	---------	------------	--------------------------	------------	------------------	---------	----	------------------

A626/A430	0,000001	0,3885	1,445	-1,057	0,05350	19,76	6,000	0,000001
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,032923	0,3885	0,5977	-0,2091	0,07582	2,758	6,000	0,032923
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>prx1/2/3</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,097294	0,3885	0,4617	-0,07315	0,03727	1,963	6,000	0,097294
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,000010	0,3885	1,920	-1,532	0,1138	13,46	6,000	0,000010
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	<0,000001	0,3885	1,629	-1,240	0,05185	23,92	6,000	<0,000001
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,008426	1,445	1,920	-0,4748	0,1232	3,853	6,000	0,008426
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
A626/A430	0,040094	1,445	1,629	-0,1832	0,07018	2,610	6,000	0,040094

Figure 36A

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,000073	1,521	3,972	-2,451	0,2555	9,591	6,000	0,000881
<i>p</i> -coumarate	0,000082	0,9835	1,742	-0,7587	0,08062	9,411	6,000	0,000899
caffeate	0,201715	2,012	1,669	0,3425	0,2390	1,433	6,000	0,362741
C14:0	0,028727	0,04668	0,02921	0,01747	0,006103	2,862	6,000	0,110050
C16:0	0,000212	4,581	2,749	1,832	0,2306	7,942	6,000	0,002116
C18:0	0,000003	1,262	0,5584	0,7033	0,04301	16,35	6,000	0,000050
C18:2	0,010204	0,9985	0,7752	0,2233	0,06051	3,690	6,000	0,059684
C18:3	0,001999	0,08905	0,05499	0,03406	0,006539	5,208	6,000	0,013912
C20:0	0,086159	0,6179	0,5545	0,06338	0,03091	2,051	6,000	0,236845
C20:4	0,326774	0,1537	0,1446	0,009159	0,008580	1,068	6,000	0,362741
C22:0	0,021548	0,2997	0,3519	-0,05223	0,01694	3,084	6,000	0,103195
C24:0	0,000328	0,2990	0,2437	0,05531	0,007541	7,336	6,000	0,002949
ω OH-C16	0,001068	0,1482	0,08479	0,06340	0,01077	5,885	6,000	0,008510
diOH-C16	0,000005	4,142	1,064	3,078	0,2042	15,07	6,000	0,000075
triOH-C8	0,000047	1,373	0,6222	0,7508	0,07231	10,38	6,000	0,000607
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,619398	1,521	1,279	0,2420	0,4622	0,5235	6,000	0,979016
<i>p</i> -coumarate	0,622960	0,9835	1,044	-0,06074	0,1172	0,5181	6,000	0,979016
caffeate	0,484161	2,012	1,837	0,1742	0,2336	0,7455	6,000	0,963477
C14:0	0,792090	0,04668	0,04491	0,001771	0,006427	0,2756	6,000	0,979016
C16:0	0,231611	4,581	4,222	0,3591	0,2699	1,331	6,000	0,928252

C18:0	0,196060	1,262	1,166	0,09535	0,06556	1,454	6,000	0,927108
C18:2	0,867840	0,9985	0,9862	0,01230	0,07082	0,1737	6,000	0,979016
C18:3	0,209734	0,08905	0,07633	0,01272	0,009053	1,405	6,000	0,927108
C20:0	0,134702	0,6179	0,5736	0,04428	0,02563	1,728	6,000	0,847540
C20:4	0,256827	0,1537	0,1735	-0,01977	0,01578	1,253	6,000	0,928252
C22:0	0,115681	0,2997	0,2784	0,02131	0,01159	1,838	6,000	0,821136
C24:0	0,241710	0,2990	0,2796	0,01944	0,01497	1,299	6,000	0,928252
ω OH-C16	0,069250	0,1482	0,1253	0,02294	0,01038	2,209	6,000	0,659203
diOH-C16	0,300750	4,142	3,830	0,3121	0,2757	1,132	6,000	0,928252
triOH-C8	0,272341	1,373	1,260	0,1128	0,09334	1,208	6,000	0,928252
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>prx1/2/3</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,061730	1,521	0,8783	0,6428	0,2804	2,293	6,000	0,471216
<i>p</i> -coumarate	0,262540	0,9835	1,053	-0,06935	0,05610	1,236	6,000	0,781881
caffeate	0,267061	2,012	1,688	0,3234	0,2644	1,223	6,000	0,781881
C14:0	0,308739	0,04668	0,04048	0,006199	0,005575	1,112	6,000	0,781881
C16:0	0,049083	4,581	4,018	0,5629	0,2288	2,461	6,000	0,434316
C18:0	0,161840	1,262	1,178	0,08398	0,05265	1,595	6,000	0,747321
C18:2	0,548606	0,9985	0,9600	0,03857	0,06070	0,6354	6,000	0,796244
C18:3	0,033505	0,08905	0,06941	0,01964	0,007154	2,745	6,000	0,379423
C20:0	0,157982	0,6179	0,5773	0,04060	0,02518	1,612	6,000	0,747321
C20:4	0,961504	0,1537	0,1541	-0,0004091	0,008131	0,05032	6,000	0,961504
C22:0	0,045737	0,2997	0,2727	0,02702	0,01075	2,513	6,000	0,434316
C24:0	0,170375	0,2990	0,2834	0,01554	0,009980	1,557	6,000	0,747321
ω OH-C16	0,100113	0,1482	0,1295	0,01870	0,009629	1,942	6,000	0,613017
diOH-C16	0,042878	4,142	3,514	0,6276	0,2451	2,561	6,000	0,434316
triOH-C8	0,018490	1,373	1,134	0,2390	0,07457	3,205	6,000	0,244171
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,012308	1,521	4,196	-2,675	0,7570	3,534	6,000	0,071611
<i>p</i> -coumarate	0,000002	0,9835	1,902	-0,9189	0,04950	18,56	6,000	0,000022
caffeate	0,309521	2,012	1,762	0,2501	0,2253	1,110	6,000	0,309521
C14:0	0,005121	0,04668	0,02320	0,02348	0,005467	4,295	6,000	0,035999
C16:0	0,000073	4,581	2,486	2,095	0,2181	9,602	6,000	0,000803
C18:0	0,000001	1,262	0,4763	0,7854	0,04094	19,18	6,000	0,000019
C18:2	0,001815	0,9985	0,6927	0,3058	0,05761	5,308	6,000	0,016220
C18:3	0,058134	0,08905	0,05938	0,02967	0,01270	2,336	6,000	0,112888
C20:0	0,026591	0,6179	0,5233	0,09456	0,03237	2,921	6,000	0,102197
C20:4	0,037468	0,1537	0,1339	0,01985	0,007460	2,661	6,000	0,108245
C22:0	0,004572	0,2997	0,3763	-0,07656	0,01740	4,399	6,000	0,035999
C24:0	0,000878	0,2990	0,2325	0,06647	0,01088	6,108	6,000	0,008746
ω OH-C16	0,014444	0,1482	0,1144	0,03384	0,009943	3,403	6,000	0,071611
diOH-C16	0,000005	4,142	0,9043	3,238	0,2123	15,25	6,000	0,000065
triOH-C8	0,000026	1,373	0,5061	0,8669	0,07562	11,46	6,000	0,000317
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value

glycerol	0,025391	1,521	4,251	-2,730	0,9234	2,957	6,000	0,074256
<i>p</i> -coumarate	0,232659	0,9835	1,153	-0,1691	0,1274	1,327	6,000	0,411188
caffeate	0,005555	2,012	1,017	0,9950	0,2357	4,221	6,000	0,027469
C14:0	0,004176	0,04668	0,01423	0,03246	0,007238	4,484	6,000	0,024794
C16:0	0,000031	4,581	1,815	2,766	0,2478	11,16	6,000	0,000370
C18:0	0,000001	1,262	0,2894	0,9723	0,05020	19,37	6,000	0,000018
C18:2	0,000114	0,9985	0,5410	0,4575	0,05156	8,873	6,000	0,001254
C18:3	0,000154	0,08905	0,03789	0,05116	0,006081	8,414	6,000	0,001535
C20:0	0,002159	0,6179	0,3560	0,2619	0,05105	5,129	6,000	0,017138
C20:4	0,013150	0,1537	0,1282	0,02557	0,007349	3,480	6,000	0,051572
C22:0	0,233474	0,2997	0,3456	-0,04585	0,03461	1,325	6,000	0,411188
C24:0	0,000213	0,2990	0,1934	0,1056	0,01331	7,934	6,000	0,001916
ω OH-C16	0,003277	0,1482	0,2016	-0,05342	0,01133	4,715	6,000	0,022712
diOH-C16	0,000003	4,142	0,5566	3,585	0,2156	16,63	6,000	0,000042
triOH-C8	0,000008	1,373	0,3455	1,028	0,07272	14,13	6,000	0,000102
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,768325	3,972	4,196	-0,2242	0,7275	0,3082	6,000	0,932594
<i>p</i> -coumarate	0,089850	1,742	1,902	-0,1602	0,07930	2,020	6,000	0,676888
caffeate	0,593025	1,669	1,762	-0,09247	0,1639	0,5643	6,000	0,932594
C14:0	0,100545	0,02921	0,02320	0,006013	0,003101	1,939	6,000	0,688273
C16:0	0,155272	2,749	2,486	0,2631	0,1619	1,625	6,000	0,740740
C18:0	0,079898	0,5584	0,4763	0,08205	0,03898	2,105	6,000	0,661328
C18:2	0,163712	0,7752	0,6927	0,08250	0,05200	1,587	6,000	0,740740
C18:3	0,717757	0,05499	0,05938	-0,004385	0,01157	0,3790	6,000	0,932594
C20:0	0,466334	0,5545	0,5233	0,03118	0,04009	0,7776	6,000	0,918889
C20:4	0,134306	0,1446	0,1339	0,01069	0,006180	1,730	6,000	0,726925
C22:0	0,335619	0,3519	0,3763	-0,02433	0,02325	1,047	6,000	0,913999
C24:0	0,374694	0,2437	0,2325	0,01115	0,01163	0,9588	6,000	0,913999
ω OH-C16	0,013218	0,08479	0,1144	-0,02956	0,008507	3,475	6,000	0,180940
diOH-C16	0,121142	1,064	0,9043	0,1600	0,08868	1,805	6,000	0,725093
triOH-C8	0,074423	0,6222	0,5061	0,1160	0,05381	2,157	6,000	0,661328
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
glycerol	0,766566	3,972	4,251	-0,2794	0,8994	0,3107	6,000	0,945509
<i>p</i> -coumarate	0,005935	1,742	1,153	0,5896	0,1417	4,161	6,000	0,046504
caffeate	0,010492	1,669	1,017	0,6524	0,1779	3,667	6,000	0,071170
C14:0	0,038314	0,02921	0,01423	0,01499	0,005667	2,644	6,000	0,132406
C16:0	0,003430	2,749	1,815	0,9343	0,2001	4,670	6,000	0,030450
C18:0	0,001470	0,5584	0,2894	0,2690	0,04862	5,533	6,000	0,019657
C18:2	0,002054	0,7752	0,5410	0,2342	0,04521	5,180	6,000	0,020524
C18:3	0,001481	0,05499	0,03789	0,01710	0,003096	5,525	6,000	0,019657
C20:0	0,012405	0,5545	0,3560	0,1985	0,05627	3,528	6,000	0,071170
C20:4	0,034885	0,1446	0,1282	0,01641	0,006045	2,715	6,000	0,132406
C22:0	0,871881	0,3519	0,3456	0,006377	0,03789	0,1683	6,000	0,945509

C24:0	0,011225	0,2437	0,1934	0,05031	0,01394	3,610	6,000	0,071170
ω OH-C16	0,000025	0,08479	0,2016	-0,1168	0,01009	11,57	6,000	0,000375
diOH-C16	0,001883	1,064	0,5566	0,5077	0,09634	5,270	6,000	0,020524
triOH-C8	0,001417	0,6222	0,3455	0,2767	0,04966	5,572	6,000	0,019657

Figure 36B

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,000288	4661	2940	1721	229,1	7,510	6,000	0,000288
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,871489	4661	4621	39,67	235,0	0,1688	6,000	0,871489
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>prx1/2/3</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,081678	4661	4161	500,1	239,4	2,089	6,000	0,081678
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,000183	4661	2746	1914	234,8	8,153	6,000	0,000183
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,000036	4661	2284	2377	219,2	10,85	6,000	0,000036
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,375667	2940	2746	193,7	202,5	0,9567	6,000	0,375667
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
total cutin content	0,011858	2940	2284	656,5	184,2	3,565	6,000	0,011858

Figure 36C

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,000003	8,121	27,22	-19,10	1,128	16,94	6,000	0,000008
% phenolics	0,000102	16,12	23,30	-7,172	0,7920	9,055	6,000	0,000203
% FAs	0,000447	45,17	37,37	7,796	1,125	6,930	6,000	0,000447
% OH-aliph	<0,000001	30,59	12,11	18,48	0,3962	46,63	6,000	<0,000001
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,669010	8,121	7,200	0,9203	2,049	0,4493	6,000	0,963739
% phenolics	0,549668	16,12	16,79	-0,6671	1,053	0,6337	6,000	0,958873
% FAs	0,857241	45,17	45,60	-0,4284	2,281	0,1878	6,000	0,979620
% OH-aliph	0,863357	30,59	30,41	0,1751	0,9749	0,1796	6,000	0,979620
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>prx1/2/3</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,088312	8,121	5,486	2,634	1,296	2,033	6,000	0,309147
% phenolics	0,314711	16,12	17,13	-1,001	0,9127	1,097	6,000	0,440076

% FAs	0,205882	45,17	47,43	-2,261	1,594	1,418	6,000	0,440076
% OH-aliph	0,175780	30,59	29,96	0,6281	0,4093	1,535	6,000	0,440076
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,001223	8,121	28,69	-20,57	3,588	5,733	6,000	0,003092
% phenolics	0,003358	16,12	25,78	-9,659	2,059	4,691	6,000	0,003358
% FAs	0,001032	45,17	34,93	10,24	1,728	5,923	6,000	0,003092
% OH-aliph	<0,000001	30,59	10,59	19,99	0,5959	33,56	6,000	<0,000001
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,000448	8,121	36,57	-28,45	4,107	6,928	6,000	0,001343
% phenolics	0,125431	16,12	19,75	-3,624	2,036	1,780	6,000	0,125431
% FAs	0,001846	45,17	33,76	11,41	2,156	5,291	6,000	0,003689
% OH-aliph	<0,000001	30,59	9,917	20,67	0,4325	47,79	6,000	<0,000001
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,690698	27,22	28,69	-1,469	3,516	0,4177	6,000	0,690698
% phenolics	0,282606	23,30	25,78	-2,487	2,108	1,180	6,000	0,485345
% FAs	0,134703	37,37	34,93	2,439	1,411	1,728	6,000	0,352118
% OH-aliph	0,046832	12,11	10,59	1,517	0,6080	2,495	6,000	0,174575
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
% glycerol	0,060115	27,22	36,57	-9,349	4,044	2,312	6,000	0,169722
% phenolics	0,139772	23,30	19,75	3,548	2,085	1,701	6,000	0,204193
% FAs	0,107920	37,37	33,76	3,609	1,912	1,888	6,000	0,204193
% OH-aliph	0,002767	12,11	9,917	2,191	0,4491	4,880	6,000	0,011023

Figure 36D

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,000040	1,411	2,106	-0,6945	0,06501	10,68	6,000	0,000040
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,705940	1,411	1,369	0,04185	0,1057	0,3958	6,000	0,705940
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>prx1/2/3</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,075079	1,411	1,264	0,1478	0,06874	2,150	6,000	0,075079
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,010497	1,411	2,218	-0,8063	0,2199	3,667	6,000	0,010497
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,004432	1,411	2,703	-1,292	0,2917	4,428	6,000	0,004432
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,625069	2,106	2,218	-0,1118	0,2171	0,5148	6,000	0,625069

Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
OH/COOH ratio	0,084798	2,106	2,703	-0,5973	0,2896	2,062	6,000	0,084798

Figure 36F

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,512205	1,000	0,8045	0,1955	0,2807	0,6965	6,000	0,526890
pC4T	0,312170	1,000	0,8286	0,1714	0,1554	1,103	6,000	0,526890
C2T	0,148524	1,000	1,456	-0,4559	0,2751	1,657	6,000	0,382671
C4T	0,050529	1,000	0,3548	0,6452	0,2645	2,439	6,000	0,187306
pCS	0,020241	1,000	0,3525	0,6475	0,2067	3,133	6,000	0,097192
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,288948	1,000	0,6253	0,3747	0,3222	1,163	6,000	0,747504
pC4T	0,684245	1,000	0,9128	0,08722	0,2042	0,4270	6,000	0,847097
C2T	0,608971	1,000	0,8463	0,1537	0,2850	0,5395	6,000	0,847097
C4T	0,242153	1,000	0,6245	0,3755	0,2894	1,297	6,000	0,747504
pCS	0,240634	1,000	0,6971	0,3029	0,2326	1,302	6,000	0,747504
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>prx1/prx2/prx3</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,854927	1,000	1,057	-0,05732	0,3003	0,1909	6,000	0,980160
pC4T	0,327791	1,000	1,241	-0,2414	0,2267	1,065	6,000	0,795818
C2T	0,983213	1,000	0,9931	0,006896	0,3144	0,02193	6,000	0,983213
C4T	0,729285	1,000	0,8987	0,1013	0,2793	0,3627	6,000	0,980160
pCS	0,187830	1,000	0,6783	0,3217	0,2165	1,486	6,000	0,646627
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,002871	1,000	2,540	-1,540	0,3180	4,843	6,000	0,014272
pC4T	0,239225	1,000	1,199	-0,1992	0,1525	1,307	6,000	0,421221
C2T	0,987738	1,000	0,9952	0,004810	0,3003	0,01602	6,000	0,987738
C4T	0,148990	1,000	0,5549	0,4451	0,2689	1,655	6,000	0,383683
pCS	0,006667	1,000	0,1638	0,8362	0,2061	4,058	6,000	0,026403
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,019411	0,8045	2,194	-1,389	0,4388	3,166	6,000	0,093359
pC4T	0,616871	0,8286	1,010	-0,1818	0,3448	0,5274	6,000	0,616871
C2T	0,264666	1,456	1,136	0,3203	0,2604	1,230	6,000	0,593284
C4T	0,059794	0,3548	0,6793	-0,3245	0,1401	2,316	6,000	0,218568
pCS	0,259093	0,3525	0,3233	0,02921	0,02344	1,246	6,000	0,593284
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
pC2T	0,000045	0,8045	2,540	-1,736	0,1660	10,46	6,000	0,000224
pC4T	0,000403	0,8286	1,199	-0,3706	0,05247	7,064	6,000	0,001612

C2T	0,012471	1,456	0,9952	0,4607	0,1308	3,523	6,000	0,018535
-----	----------	-------	--------	--------	--------	-------	-------	----------

Figure 36G

Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
2-MHG	0,909553	15433	15751	-317,5	2680	0,1185	6,000	0,909553
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
2-MHG	0,346371	15433	12673	2760	2702	1,022	6,000	0,346371

Figure 36H

Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,186164	1,000	1,338	-0,3383	0,2267	1,493	6,000	0,186164
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,459804	1,000	0,8774	0,1226	0,1552	0,7896	6,000	0,459804
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>prx1/prx2/prx3</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,494086	1,000	0,8766	0,1234	0,1695	0,7279	6,000	0,494086
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,124640	1,000	1,346	-0,3465	0,1942	1,784	6,000	0,124640
Variable	P-value	Mean of WT	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,519218	1,000	0,7270	0,2730	0,3988	0,6845	6,000	0,519218
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/rboh</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,972588	1,338	1,346	-0,008185	0,2285	0,03582	6,000	0,972588
Variable	P-value	Mean of <i>cus1/cus2</i>	Mean of <i>cus/prx</i>	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P-value
caffeoyl-hydroxypalmitate	0,192657	1,338	0,7270	0,6113	0,4166	1,467	6,000	0,192657

Étude de la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, une contribution à la compréhension de l'évolution des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes

Résumé

Il y a environ 500 millions d'années, une lignée de plantes aquatiques a commencé à coloniser les espaces terrestres. Cet événement évolutif, appelé *terrestrialisation*, est à l'origine de l'émergence et de la diversification des plantes terrestres, ainsi que d'une profonde modification des cycles géo-climatiques, et de la diversification des autres règnes du vivant. L'apparition des premières plantes terrestres s'est accompagnée de nombreuses adaptations, parmi lesquelles figurent la capacité à synthétiser des polymères apoplastiques hydrophobes, notamment la cutine, un polymère lipidique qui confère une imperméabilité aux plantes et leur permet de survivre dans un environnement desséchant. L'étude de la biosynthèse de la cutine chez les bryophytes, qui représentent le stade non-vasculaire de l'évolution des plantes terrestres, permet de comprendre comment ces polymères ont pu apparaître et évoluer chez les plantes terrestres. Les travaux présentés ici, menés sur plusieurs familles géniques de la voie des phénylpropanoïdes, démontrent que la synthèse des précurseurs phénoliques des polymères structuraux est apparue chez les premières plantes terrestres et a été conservée au cours des 500 millions d'années d'évolution qui ont suivi. Une étude fonctionnelle de la famille « cutine synthase » (CUS) chez les bryophytes a par ailleurs montré l'origine commune et la conservation d'un mécanisme essentiel de polymérisation de la cutine chez les plantes terrestres. Ce travail a été poursuivi par l'identification d'une voie faisant intervenir des gènes de type peroxydase (PRX) dans la biosynthèse de la cutine de l'espèce bryophyte *Physcomitrium patens*, cette famille d'enzymes étant en partie responsable de la polymérisation de la lignine, un polymère phénolique des plantes terrestres vasculaires. Ces travaux apportent ainsi de nouvelles informations sur la manière dont la cutine est apparue lors de l'émergence des plantes terrestres, et a contribué au succès de cette transition évolutive majeure. Enfin, ces travaux illustrent et supportent également l'hypothèse d'une origine commune des polymères apoplastiques hydrophobes des plantes, dont les voies de biosynthèse et de polymérisation se sont diversifiées et spécialisées par la suite au cours de l'évolution.

Mots-clés : Evolution des plantes, *terrestrialisation*, cutine, phénylpropanoïdes, cutine synthase, peroxydase

Abstract

About 500 million years ago, an aquatic plant lineage started to colonize land. This event, termed *terrestrialization*, led to the emergence and diversification of terrestrial plants, and had a profound impact on geo-climatic cycles and the diversification of other kingdoms of life. However, the emergence of the first land plants required many adaptations, including the ability to synthesize hydrophobic apoplastic polymers, especially cutin, a lipid polymer that waterproofs plants and allows them to survive in a dry environment. The study of cutin biosynthesis in bryophytes, which represent the non-vascular stage of land plant evolution, helps to understand how these polymers appeared and evolved in land plants. Here, we report the study of several gene families involved in the phenylpropanoid pathway, which demonstrates that the synthesis of phenolic precursors of structural polymers emerged in first land plants and was subsequently conserved across the 500 million years of land plant evolution. A functional study of the "cutin synthase" (CUS) family in bryophytes has also shown the common origin and conservation of a cutin polymerization mechanism in land plants. This work was followed by the identification in the bryophyte *Physcomitrium patens* of a pathway involving peroxidase genes (PRX) in the biosynthesis of cutin, an enzyme family required for the polymerization of lignin, a phenolic polymer in vascular plants. Altogether, this work provides new information on how cutin appeared upon the emergence of terrestrial plants, and contributed to the success of this major evolutionary transition. This work in addition illustrates and supports the idea of a common origin of hydrophobic apoplastic plant polymers, which biosynthetic and polymerization pathways have diversified and specialized subsequently during evolution.

Keywords: Plant evolution, *terrestrialisation*, cutin, phenylpropanoids, cutin synthase, peroxidase