



La subérine chez *Arabidopsis thaliana* : Mécanisme d'export et contribution des alcools gras

Camille Delude

► **To cite this version:**

Camille Delude. La subérine chez *Arabidopsis thaliana* : Mécanisme d'export et contribution des alcools gras. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2015. Français. <NNT : 2015BORD0364>. <tel-01285943>

HAL Id: tel-01285943

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01285943>

Submitted on 10 Mar 2016

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé
SPÉCIALITÉ Biologie Végétale

par Camille DELUDE

LA SUBÉRINE CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA* : MÉCANISMES D'EXPORT
ET CONTRIBUTION DES ALCOOLS GRAS

Sous la direction de Frédéric DOMERGUE

Soutenue le 15 Décembre 2015

Membres du jury :

D. ROLIN	Professeur à l'Université de Bordeaux	Président
B. BAKAN	Chargée de Recherche INRA, Nantes	Rapportrice
F. BEAUDOIN	Chargé de Recherche à Rothamsted Research, UK	Rapporteur
G. INGRAM	Directrice de Recherche CNRS, Lyon	Examinatrice
JJ. BESSOULE	Directeur de Recherche CNRS, Villenave d'Ornon	Examineur
F. DOMERGUE	Chargé de Recherche CNRS, Villenave d'Ornon	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier Bénédicte Bakan, Frédéric Beaudoin, Gwyneth Ingram et Dominique Rolin d'avoir accepté d'analyser mon travail de thèse.

Je remercie également René Lessire pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de biogenèse membranaire (LBM) et Jean-Jacques Bessoule, pour avoir accepté que je poursuive mon travail de thèse au LBM.

J'exprime toute ma reconnaissance envers Frédéric Domergue qui a eu la patience de m'encadrer depuis le master et qui s'est démené pour que la thèse se passe au mieux. Je te remercie pour ta disponibilité et ton implication dans ces travaux ainsi que pour m'avoir encouragée à communiquer nos résultats en congrès.

Ces remerciements sont aussi adressés à Jérôme Joubès dont les conseils toujours avisés ont grandement contribué à la progression de la thèse.

Un grand merci aux autres membres et ex membres de l'équipe « lipides de surface » : Stéphanie Pascal qui a toujours accepté de m'aider, Didier Thoraval, qui est venu prêter main forte au cours de ces dernières semaines, et Aurélie Vieillemard pour son soutien moral appréciable.

J'adresse mes plus vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, en particulier Laëtitia Fouillen, Owen Rowland et Dylan Kosma. Un merci particulier à la plateforme de métabolomique du CGFB où toutes les analyses de lipides ont été effectuées. Merci également à Patrick Moreau d'avoir consacré un peu de son temps pour les observations au microscope confocal.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du LBM pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je remercie chaleureusement les filles du « bureau des thésardes », Charlotte, Yijun et Amélia, ainsi que les « voisines » Valérie et Marina, qui m'ont conseillée et encouragée pendant la rédaction de ce manuscrit. Un grand merci également à Julien pour son soutien et pour les quelques « high five » aériens particulièrement réussis.

Merci aux anciennes thésardes, Houda et Claireline, qui sont devenues des amies et avec qui j'ai partagé de très bons moments, que ce soit au laboratoire ou ailleurs. Tous mes remerciements reviennent aussi à mes amis Cynthia, JB, Jérémy, Maëva et Doriane.

Enfin, je voudrais exprimer ma profonde gratitude à ma famille qui m'a encouragée et soutenue tout au long de cette aventure.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	7
1 - DISTRIBUTION DE LA SUBERINE	9
2 - COMPOSITION DE LA SUBERINE.....	15
2 - 1 - Composition en monomères aliphatiques.....	15
2 - 2 - Composition des monomères aromatiques	17
2 - 3- Les cires associées au polymère de subérine	19
3 - STRUCTURE DE LA SUBERINE	21
4 - BIOSYNTHESE DE LA SUBERINE.....	25
4 - 1 - Biosynthèse des monomères aliphatiques	27
4 - 1 - 1 - Activation des chaînes acyles.....	27
4 - 1 - 2 - Elongation des chaînes acyles	29
4 - 1 - 3 - Oxydation des chaînes acyles	31
4 - 1 - 4 - Réduction des chaînes acyles	33
4 - 1 - 5 - Estérification	37
4 - 1 - 6 - Ordre des réactions pour la biosynthèse des monomères aliphatiques	39
4 - 2 - Biosynthèse des monomères aromatiques	41
4 - 3 - Biosynthèse des cires associées au polymère de subérine.....	43
4 - 4 - Transport et assemblage	45
4 - 4 - 1 - Transport	45
4 - 4 - 2 - Assemblage	53
5 - ROLES DE LA SUBERINE.....	53
6 - REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE LA SUBERINE.....	59
7 - OBJECTIFS DE LA THESE	61
CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION	67
Chapitre 2 - Partie 1 : Distribution des chaînes acyles dans les racines d'Arabidopsis.	69
1 - Analyse globale des chaînes acyles de la racine	69
2 - Partition des chaînes acyles de la racine.....	73
2 - 1 - Cas des acides 2-hydroxylés	73
2 - 2 - Quantification et distribution des chaînes acyles dans la racine	75
3 - Partition des chaînes acyles de la racine au cours du développement de la racine.....	77

abondants que les acides gras α,ω -dicarboxyliques (environ 20 % du total) à tous les stades de développement (Figure 10B).	87
4 - Dépôt de la subérine au cours du développement des racines	87
Chapitre 2 - Partie 2 : Caractérisation des alcools gras de la fraction soluble des racines chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	89
Chapitre 2 - Partie 3 : Export des monomères de subérine	145
1 - Recherche de candidats impliqués dans le transport des précurseurs de subérine	147
2 - Analyses <i>in silico</i> des candidats	151
2 - 1 - Analyses des séquences protéiques	151
2 - 2 - Profils d'expression	153
3 - Domaines d'expression et localisation subcellulaire des candidats	163
3 - 1 - Analyses de l'activité des promoteurs des gènes candidats	163
3 - 2 - Localisation subcellulaire des protéines candidates	165
4 - Identification et caractérisation de mutants d'insertion ADN-T pour les gènes candidats	169
4 - 1 - Isolement de lignées homozygotes et analyse de l'expression des gènes candidats	169
4 - 2 - Analyses des lignées d'insertion ADN-T	171
4 - 2 - 1 - Analyse de la subérine des racines	171
4 - 2 - 2 - Analyses des graines	173
4 - 2 - 3 - Expression des gènes candidats dans les autres lignées T-DNA	179
5 - Génération et caractérisation des doubles, triples et quadruple mutants	181
5 - 1 - Croisements entre les lignées d'insertion pour les ABCG transporteurs	181
5 - 2 - Analyses de la subérine des lignées doubles et triples mutantes	183
5 - 2 - 1 - Analyses de la subérine des racines	183
5 - 2 - 2 - Analyses des graines	185
Chapitre 2 - Partie 4 : Discussion et Perspectives	191
CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES	205
1 - Matériel biologique	206
1 - 1 - Matériel végétal et conditions de culture	206
1 - 2 - Souches bactériennes et milieux de culture	207
2 - Méthodes de biologie moléculaire	208
2 - 1 - Extraction des acides nucléiques	208
2 - 2 - Amplification d'acides nucléiques	209
2 - 3 - Electrophorèse des acides nucléiques	210

2 - 4 - Purification des fragments PCR.....	210
2 - 5 - PCR quantitative	211
2 - 6 - Clonage moléculaire.....	212
3 - Méthodes de transgénèse.....	216
3 - 1 - Transformation des bactéries par électroporation	216
3 - 2 - Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	217
4 - Test de perméabilité du manteau des graines	218
5 - Marquage histochimique GUS (β -glucuronidase)	218
5 - 1 - Coloration des tissus.....	218
5 - 2 - Observation des tissus	218
6 - Microscopie confocale.....	219
7 - Analyses de la composition du polymère de subérine	219
8 - Etudes Bioinformatiques	221
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	231
TRAVAUX REDACTIONNELS	245
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	295

LISTE DES ABREVIATIONS

2-OH :	acides 2-hydroxylés
4CL :	4-Coumarate-CoA Ligase
ABA :	Abscisic Acid
ABC :	ATP-Binding Cassette transporter
ACP :	Acyl Carrier Protein
ACPB :	Acyl Carrier Protein B
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADN-T :	Acide désoxyribonucléique de transfert
AGTLC :	Acides Gras à Très Longue Chaîne
AHC :	Alkyl hydroxycinnamate
amiRNA :	artificial microRNA
AMP :	Adénosine Monophosphate
ASFT :	Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase
ATP :	Adenosine Triphosphate
BAHD :	benzyl alcohol acetyltransferase, anthocynain-Ohydroxycinnamoyltransferase, anthranilate-N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase, and deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase
BAR :	the Bio-Analytic Resource for plant Biology
BiFC :	Bimolecular fluorescence complementation
BSTFA :	N,O,-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide
C3H :	coumarate-3-hydroxylase
C4H :	cinnamate-4-hydroxylase
CAD :	cinnamoyl alcohol dehydrogenase
CCoAMT :	caffeoyl-CoA O- methyltransferase
CCR :	Cinnamoy-CoA Reductase
CD1 :	Cutin Deficient 1
CER :	eceriferum
CoA :	Coenzyme A
COMT :	Caffeic acid O-Methyl Transferase
CUS :	Cutin synthase-like

CYP :	Cytochrome P450
DCA :	Acides gras α,ω -dicarboxyliques
ECR :	Enoyl-CoA Reductase
ESI/MS/MS :	Electrospray/Mass Spectrometry
F5H :	Ferulate 5-hydroxylase
FACT :	Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Caffeoyl Transferase
FAE :	Fatty Acid Elongase
FAR :	Fatty Acyl CoA Reductase
FAS :	Fatty Acid Synthase
FHT :	Fatty ω -hydroxyacid/fatty alcohol hydroxycinnamoyl transferase
G3P :	Glycérol-3-Phosphate
GC-MS :	Gaz Chromatography-Mass Spectrometry
GDSL :	Lycine-aspartic acid-serine-leucine motif lipase/hydrolase
GIPC :	Glycosyl inositolphosphoceramide
GPAT :	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
GPI :	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
GUS :	β -glucuronidase
HCD :	3-hydroxyacyl-CoA déhydratase
HORST :	Hydroxylase of Root Suberized Tissue
IS :	Internal Standard
KCR :	3-Ketoacyl-CoA Reductase
KCS :	3-Ketoacyl-CoA Synthase
KD :	Knock Down
kDa :	kilodalton
KO :	Knock Out
LACS :	Long-Chain Acyl-CoA Synthetase
LC-MS/MS :	Liquid Chromatography-Mass spectometry
LTL :	Li -Tolerant Lipase
LTP :	Lipid Transfer Protein
MAG :	Monoacylglycerol
MHG :	2-MonoHydroxypalmitoyl-Glycérol
MP :	Membrane Plasmique

MTBE :	Méthyl Tert-Butyl Ether
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NASC :	Nottingham Arabidopsis Stock Center
NBD :	Nucleotide-Binding Domain
OTW :	Outer Tangential Wall
p/v :	poids/volume
PAL :	Phenylalanine Amonia-Lyase
PC :	Paroi Cellulaire
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PDR :	Pleiotropic Drug Resistance
<i>pec1</i> :	Permeable cuticle 1
PM :	Plasma Membrane
RALPH :	Root aliphatic plant hydroxylase
RE :	Reticulum Endoplasmique
RFP :	Red Fluorescence Protein
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RNAi :	RNA interference
ROL :	Radial O ₂ Loss
rpm :	Rotation Per Minute
RT-Q-PCR- :	Reverse Transcription-Quantitative-Polymerase Chain Reaction
SL :	Suberin Lamellae
TMD :	Transmembrane domain
UTR :	Untranslated region
UV :	Ultraviolet
v/v :	volume/volume
WBC :	White-Brown Complex
X-Gluc :	Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique
YFP :	Yellow Fluorescence Protein
ω -OH :	Acides gras ω -hydroxylés

PRESENTATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit de thèse se divise en trois chapitres successifs.

Le premier chapitre est une introduction générale sur la distribution, la composition, la biosynthèse et les fonctions de la subérine chez les plantes, à la fin de laquelle les objectifs de cette thèse sont décrits.

Le deuxième chapitre est consacré aux résultats obtenus pendant cette thèse et à leur discussion. Il comprend quatre parties :

- La première partie est consacrée à l'étude de la répartition des chaînes acyles au sein de la racine chez *Arabidopsis*. Les résultats des analyses sur la quantité et la composition de la subérine au cours du développement racinaire sont présentés dans cette partie.
- La deuxième partie se présente sous la forme d'un article scientifique (sous forme préliminaire) dans lequel sont exposés les résultats obtenus sur la caractérisation des alcools gras présents dans une fraction soluble de racines d'*Arabidopsis*. Certains résultats de la première partie sont repris dans cet article qui devrait rapidement être soumis pour publication à *Plant Physiology*.
- La troisième partie regroupe les travaux réalisés pour identifier et caractériser des protéines impliquées dans le transport des précurseurs de subérine. La caractérisation des différentes lignées mutantes générées au cours de cette thèse y est présentée.
- La dernière partie de ce chapitre est une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus. L'importance des alcools gras dans la subérine et de la subérine dans le métabolisme lipidique des racines chez *Arabidopsis* ainsi que le rôle putatif des candidats caractérisés y sont discutés. A la fin de cette partie, les perspectives à donner à ce travail sont proposées.

Le dernier chapitre de cette thèse comprend deux articles écrits dans le cadre de cette thèse, une revue sur la subérine en tant que second auteur (publiée dans *Plant Cell Reports* en 2015) et un chapitre de livre sur les lipides de surface et le développement de l'épiderme en tant que premier auteur (en cours de publication).

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

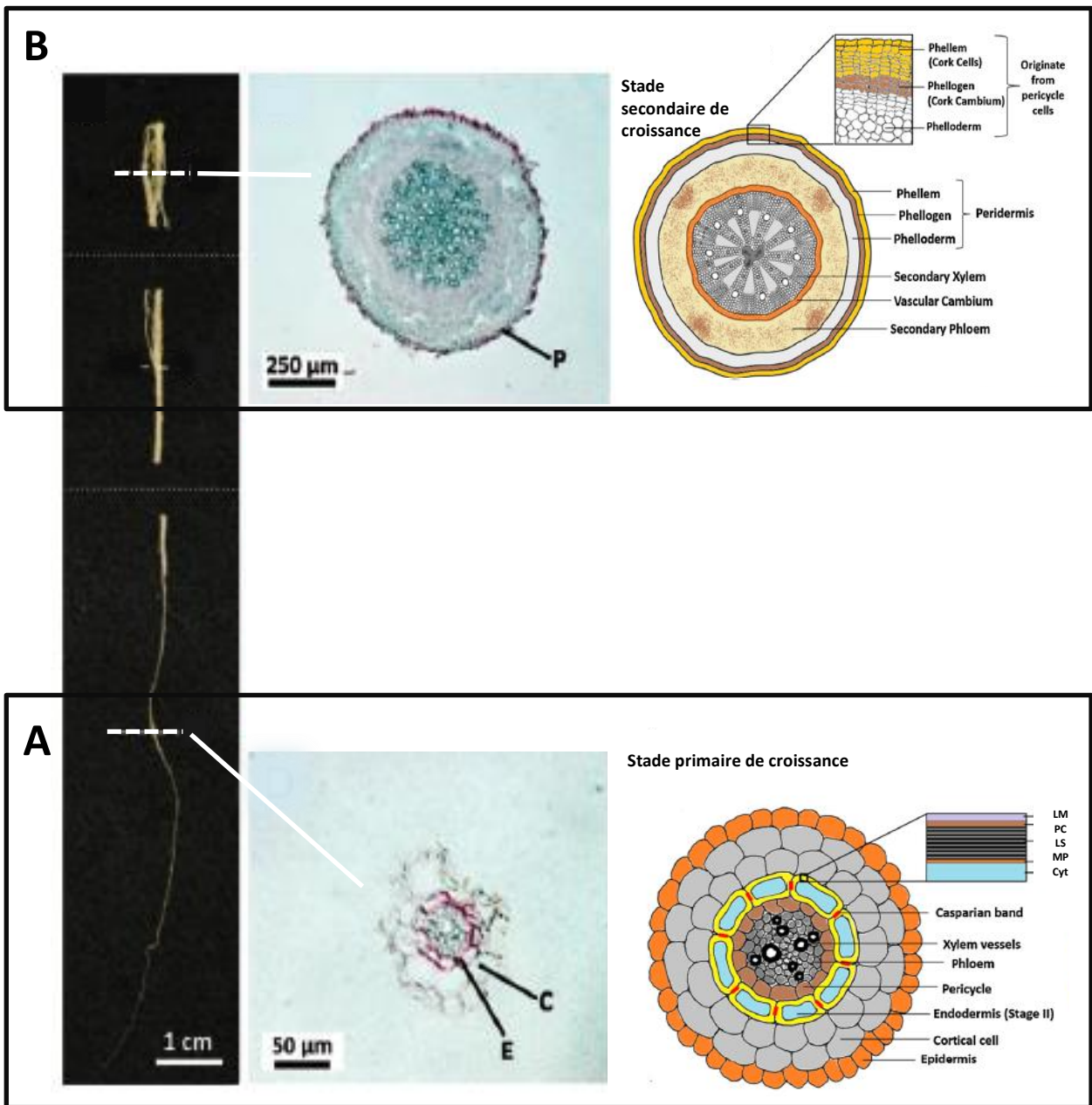


Figure 1 : Distribution de la subérine dans les racines d'Arabidopsis.

Les coupes transversales de racines ont été colorées au rouge Soudan (colorant lipophile marquant la subérine). C, cortex ; E, endoderme ; P, périderme. Les différentes assises cellulaires sont indiquées sur les schémas. (A) Au stade primaire de croissance, la subérine (couleur jaune) est déposée dans l'endoderme. LM, lamelle médiane ; PC, paroi cellulaire ; LS, lamelle de subérine ; MP, membrane plasmique ; Cyt, cytoplasme. (B) Au stade secondaire de croissance, la subérine est déposée dans les cellules du phellème du périderme. D'après Höfer et al. 2008 et Vishwanath et al. 2015.

Les plantes ont développé plusieurs barrières lipidiques extracellulaires. Les surfaces aériennes des plantes sont recouvertes par la cuticule qui comprend la cutine, un polymère glycérolipidique, et des cires cuticulaires. La sporopollénine est un constituant majeur de la couche externe (exine) des grains de pollen. La subérine est un hétéropolymère de lipides et de composés phénoliques déposé au niveau de la paroi des cellules de plusieurs tissus comme l'endoderme et le périderme des racines. Ces barrières hydrophobes protègent les plantes contre de nombreux stress environnementaux comme la sécheresse, la salinité ou encore les attaques pathogènes. Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de la subérine chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. L'introduction de ce manuscrit est donc focalisée sur la subérine.

1 - DISTRIBUTION DE LA SUBERINE

La distribution des cellules subérisées dans la plante suggère que la subérisation se fait aux endroits et aux moments où la plante a besoin de former une barrière protectrice (Kolattukudy, 2001). La subérine est présente constitutivement au niveau de plusieurs assises cellulaires.

Dans les racines au stade primaire de croissance, la subérine est déposée dans la paroi des cellules de l'endoderme qui sépare les tissus vasculaires du cortex (Franke and Schreiber 2007). Le dépôt de subérine dans l'endoderme se fait au stade II, après la mise en place des cadres de Caspary (stade I) (Thomas et al. 2007) (Figure 1A). Néanmoins, toutes les cellules de l'endoderme ne sont pas subérisées car il existe des « cellules de passage » (Peterson and Enstone, 1996). La plupart des racines des plantes possèdent une couche de cellules située en dessous de l'épiderme, l'exoderme, qui est aussi caractérisée par un dépôt de subérine (Enstone et al. 2002; Ma and Peterson, 2003). L'exoderme est néanmoins absent chez certaines plantes comme *Arabidopsis thaliana*. La présence de subérine est également observée au niveau de l'épiderme des racines primaires de plusieurs espèces comme le soja et l'oignon (Meyer et al. 2011b; Thomas et al. 2007).

La subérine est également constitutivement présente dans le phellème du périderme des parties aériennes et racinaires subissant une croissance secondaire. Lors de la croissance

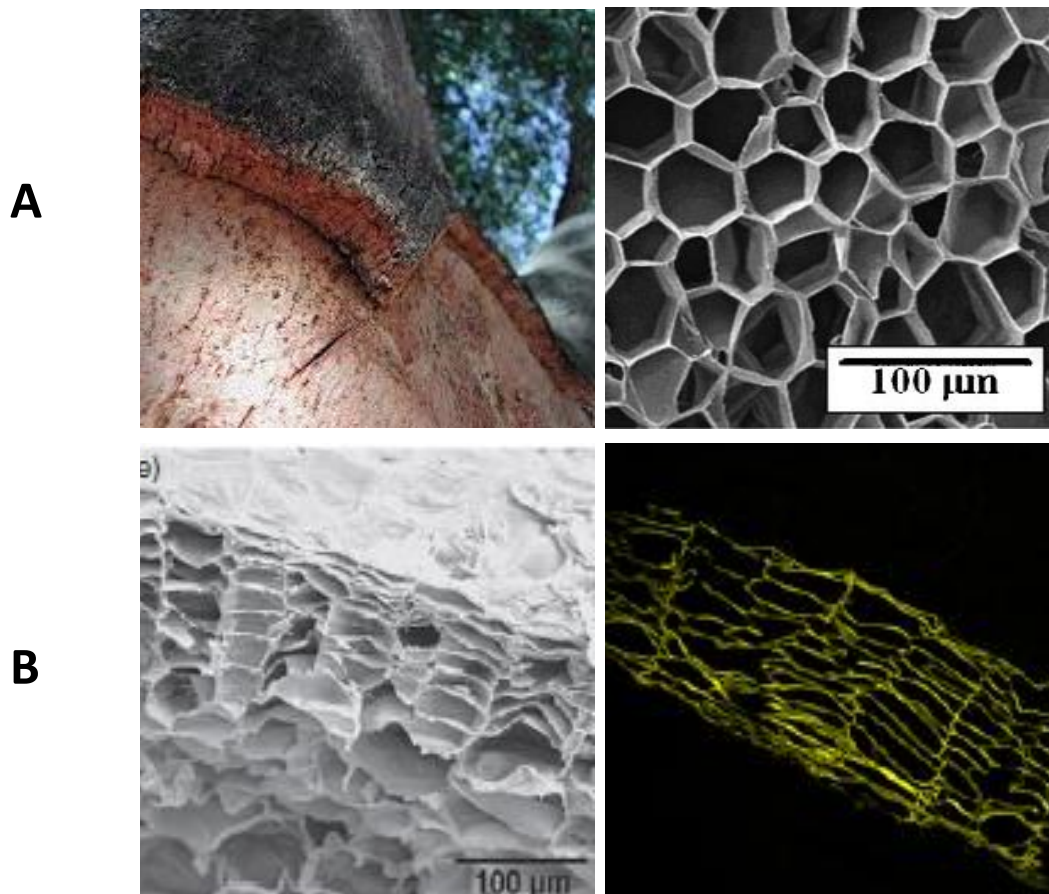


Figure 2 : Exemples de tissus subérisés.

(A) A gauche, écorce de chêne liège. A droite, cellules subérisées observées en microscopie électronique à balayage à partir d'une section radiale du liège (Silva et al. 2005). (B) A gauche, section transversale du périderme de tubercule de pomme de terre observée au microscope électronique à balayage (Serra et al. 2010). A droite, coupe transversale du périderme de tubercule de pomme de terre marquée au fluorol yellow et observée en microscopie à fluorescence. Le fluorol yellow est un fluorochrome lipophile qui permet de marquer les cellules subérisées (Landgraf et al. 2014).

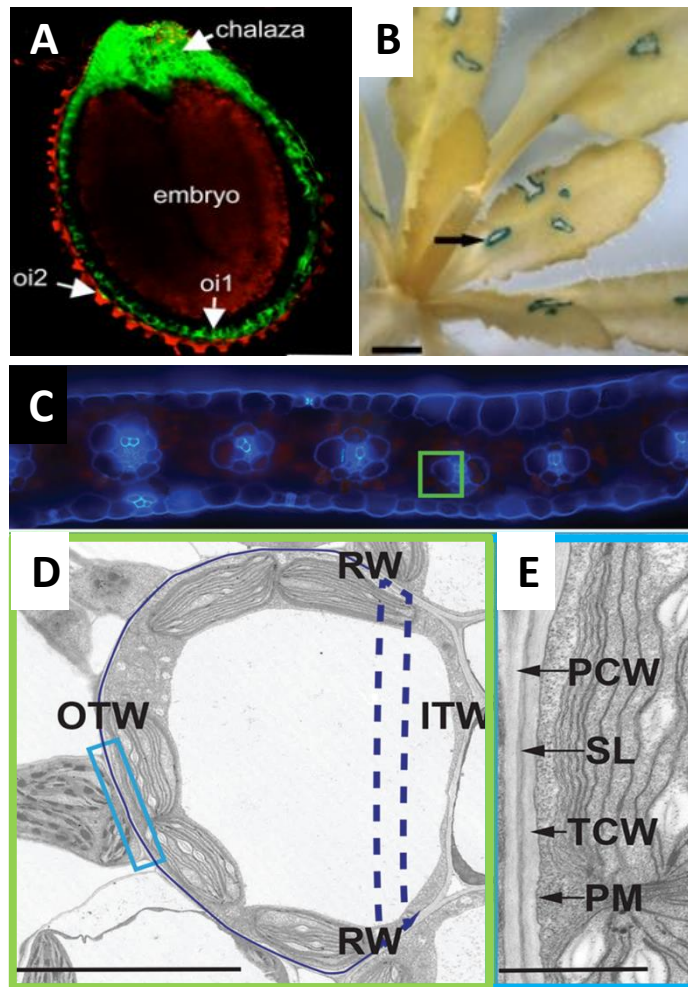


Figure 3 : Exemples de sites de déposition de la subérine chez Arabidopsis et chez le maïs.

(A) Localisation dans une graine d'Arabidopsis de GPAT5, une protéine impliquée dans la synthèse de la subérine, fusionnée à la YFP (en vert). Oi, outer integument. Les auteurs suggèrent que la subérine est déposée à l'endroit où est exprimé *GPAT5* (Molina et al. 2009). (B) Expression du gène de biosynthèse de la subérine *FAR4* dans des feuilles blessées d'une lignée transgénique *promFAR4::GUS* (Domergue et al. 2010). (C) Coupe transversale de feuille de maïs observée sous UV. L'encadré vert montre une cellule de gaine périvasculaire. (D) Ultrastructure d'une cellule de gaine périvasculaire. Le trait bleu foncé indique le lieu de déposition de la subérine. OTW, outer tangential wall ; RW, radial wall ; ITW, inner tangential wall. (E) Agrandissement de la partie encadrée en bleu en (D). PCW, primary cell wall ; SL, suberin lamellae ; TCW, tertiary cell wall ; PM, plasma membrane (Mertz and Bruntell, 2014).

secondaire, l'endoderme et le cortex des racines sont dégradés et une nouvelle couche cellulaire, appelée phellogène, est formée à partir du péricycle. Le phelloderme et le phellème dérivent du phellogène et ces trois couches cellulaires forment le périderme (Figure 1B). Etant localisé à la périphérie des tissus, le périderme constitue l'interface directe entre la plante et l'environnement. Contrairement à l'endoderme et l'exoderme qui sont des monocouches cellulaires subérisées, le phellème du périderme contient plusieurs couches subérisées. Le phellème du périderme des parties aériennes contient également plusieurs couches de cellules subérisées mais à la différence des racines, le phellogène des tiges en croissance secondaire provient du cortex. Un exemple bien connu de tissu aérien subérisé est le liège contenu dans le phellème du périderme au niveau de l'écorce du chêne liège (*Quercus suber*) (Soler et al. 2007) (Figure 2A). Un autre site de déposition de la subérine est le périderme des tubercules (Kolattukudy et al. 1975). De nombreuses études sur la subérine ont été notamment faites sur le périderme de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) qui est fortement subérisé (Graça and Pereira, 2000b; Kolattukudy and Agrawal, 1974) (Figure 2B).

Dans la graine, la subérine est retrouvée dans la couche externe du manteau ainsi que dans les régions du chazale et du micropyle (Molina et al. 2006; Molina et al. 2007) (Figure 3A). Un dépôt de subérine est également observé dans la paroi des cellules de la gaine périvasculaire entourant les faisceaux conducteurs des feuilles des plantes en C4 (Hattersley and Browning, 1981) (Figures 3C, D, E), au niveau de la zone d'abscission des pétales ou encore dans les fibres de coton (Yatsu et al. 1983).

Des expériences de stress mécanique sur des fruits de tomate (*Solanum lycopersicum*), des feuilles de Jade (*Crassula argentea*) ou des siliques de haricots (*Phaseolus vulgaris*) ont montré qu'un dépôt de subérine avait lieu en réponse à la blessure (Dean and Kolattukudy, 1976). Chez *Arabidopsis*, l'expression au niveau des sites de blessures du gène *FAR4*, codant pour une FAR (Fatty Acyl-CoA Reductase) impliquée dans la synthèse de la subérine (Figure 3B) confirme l'importance de la subérisation dans les processus de cicatrisation chez les plantes (Domergue et al. 2010). Un dépôt additionnel de subérine peut également se faire en réponse à des conditions environnementales non favorables comme la sécheresse, la salinité ou l'hypoxie. Par exemple, un stress salin sur des racines de coton induit la subérisation des cellules proches de la pointe racinaire qui ne sont pas subérisées en conditions normales (Reinhardt and Rost, 1995). De même, en condition d'hypoxie, des racines de maïs cultivées

Tableau 1 : Composition en monomères de la subérine des racines et des graines d'Arabidopsis, du périderme du liège et de la pomme de terre.

Ces valeurs proviennent de plusieurs études. En fonction des études, certaines compositions n'ont pas été détaillées. ND, Non déterminé. D'après Franke et al. 2005 et Graça and Santos, 2007.

Composés	Composition (% du total)				Structures chimiques
	<i>A.thaliana</i>		<i>Q.suber</i> <i>S.tuberosum</i>		
	Graines	Racines			
Acides ω-hydroxylés saturés					
C16	1,67	5,77	0,4	1,3	
C18	0,58	2,73			
C20	1,71	3,07			
C22	5,60	7,79	7,9	0,6	
C24	20,70	0,71			
C18, C20, C24-C28			3,1	0,8	
Acides ω-hydroxylés substitués					
C18:1	3,38	23,11	5,9		
C18 époxydé			7,3		
C18 tri-hydroxylé	8,45		2,2		
Acides α,ω-dicarboxyliques saturés					
C16	1,72	4,91	2,0	0,7	
C18		5,87			
C20	0,25	1,01			
C22	2,83	1,39	4,5		
C24	12,49	0,35			
C18,C20, C24, C26			2,2	1,1	
Acides α,ω-dicarboxyliques substitués					
C18:1	3,95	10,68	6,2	30,1	
C18 :2	10,23				
C18 époxydé			22,9		
C18 di-hydroxylé			7,7	0,1	
Alcools gras					
C18-C26		6,43	0,4	2,5	
Diols					
C16-C22	4,46				
Acides gras					
C18		0,12			
C20	0,47	2,23			
C22	0,86	0,57			
C24	2,54	0,52			
C16-C22			1	0,7	
C23-C30			0,1	7,7	
Composés phénoliques/aromatiques					
Acide férulique	6,41	3,65	0,8	1	
Acide coumarique		1,51			
Glycérol	ND	ND	14,2	22,0	

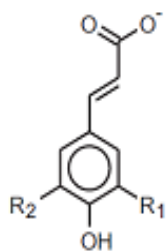
en hydroponie présentent une subérisation plus importante de l'exoderme comparées à des racines cultivées en milieu hydroponique aéré (Enstone and Peterson, 2005).

2 - COMPOSITION DE LA SUBÉRINE

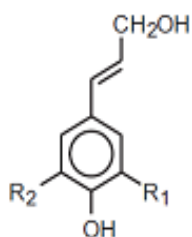
La subérine est un hétéropolymère complexe constitué d'un domaine aliphatique et d'un domaine aromatique. La subérine peut aussi contenir des cires liées de façon non covalente au polymère. Depuis le développement il y a dix ans des premiers protocoles permettant d'analyser de façon globale la partie aliphatique de la subérine des racines d'*Arabidopsis* (Bonaventure et al. 2004; Franke et al. 2005), la composition en monomères aliphatiques et les voies métaboliques correspondantes ont été relativement bien décrites. La partie aromatique du polymère de subérine a été moins étudiée car elle est plus difficile à analyser, mais l'intérêt porté à cette dernière est de nos jours croissant.

2 - 1 - Composition en monomères aliphatiques

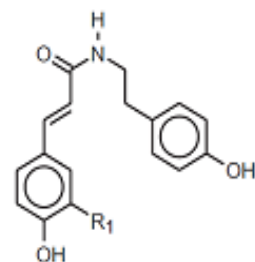
Les diverses méthodes de dépolymérisation par transméthylation (hydrolyse basique ou acide), et de dérivatisation (silylation ou acétylation) couplées à la GC-MS ont permis de révéler la composition en monomères aliphatiques de la subérine. La portion aliphatique comprend principalement des acides gras ω -hydroxylés, des acides gras α,ω -dicarboxyliques, des acides gras oxygénés en milieu de chaînes, des acides gras non substitués, des alcools gras primaires et du glycérol (Tableau 1). La longueur de chaînes des monomères de subérine varie de 16 à 30 atomes de carbone selon les espèces. Généralement, les monomères en C16 et C20 ou plus se présentent sous forme saturée alors que les monomères en C18 sont majoritairement sous forme insaturée ou oxygénée (époxydé ou hydroxylé) en milieu de chaîne (Ranathunge et al. 2011a). La composition en monomères de la subérine varie en fonction des espèces, mais aussi chez une même espèce en fonction des stades de développement et des tissus. Par exemple, les acides gras ω -hydroxylés C18:1 sont les composés majoritaires de la subérine des racines d'*Arabidopsis* alors que chez le chêne liège et la pomme de terre, ce sont des acides gras α,ω -dicarboxyliques, le C18 (9,10) époxydé et C18:1 respectivement (Tableau 1). De même, chez *Arabidopsis*, la subérine des racines est dominée par des monomères avec des longueurs de chaînes entre C16 et C22 (Franke et al.



R1=R2=H, acide p-coumarique
 R1=OH, R2=H, acide caféique
 R1=OCH₃, R2=H, acide férulique
 R1=R2=OCH₃, acide sinapique



R1=R2=H, alcool p-coumarylique
 R1=OCH₃, R2=H, alcool coniférylique
 R1=R2=OCH₃, alcool synapylique



R1=H, p-coumaryl tyramine
 R1=OCH₃, féruloyl tyramine

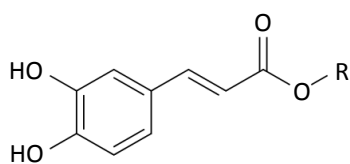
Figure 4 : Composés aromatiques des tissus subérisés.
 D'après Bernards 2002.

2005) alors que des monomères en C22 et C24 sont prédominants dans la subérine du manteau de la graine (Molina et al. 2006). Cependant, les acides gras ω -hydroxylés et les acides gras α,ω -dicarboxyliques sont généralement les composés majoritaires de la subérine. Le glycérol est également un constituant important du polymère de subérine. Il représente par exemple 20% du polymère de subérine du périoderme de la pomme de terre et 14% chez le liège (Graça and Pereira, 2000a).

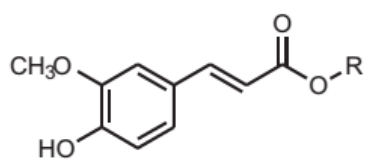
2 - 2 - Composition des monomères aromatiques

Tout comme la lignine, la subérine est caractérisée par une autofluorescence sous rayonnements ultra-violet (460-530nm), ce qui indique la présence de composés aromatiques. Une quantité faible d'acides hydroxycinnamiques, principalement d'acide férulique (Tableau 1), est par ailleurs obtenue après transestérification du polymère de subérine. Cette présence suggère que des composés aromatiques sont reliés par des liaisons esters au domaine aliphatique.

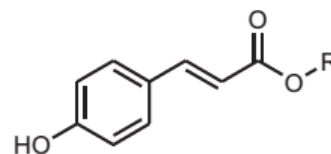
Des études de RMN, couplées avec un marquage des phénylpropanoïdes, ont permis de montrer que le domaine aromatique de la subérine est constitué principalement d'acides hydroxycinnamiques (acides p-coumariques, caféiques et féruliques) et de N-féruloyl tyramine (Bernards et al. 1995; Negrel et al. 1996) (Figure 4). A l'inverse, une faible quantité de monolignols (alcools p-coumaryl, coniféryl et sinapyl) (Figure 4) est détectée dans les tissus subérisés alors qu'ils sont abondants dans la lignine. Les tissus subérisés ont donc une composition différente des tissus lignifiés suggérant la présence d'un domaine aromatique spécifique à la subérine dans la paroi cellulaire (Bernards, 2002). Malgré ces observations, ce domaine a longtemps été associé à la lignine et donc rarement pris en compte dans le cadre d'études sur la subérine. Cependant, une étude récente montrant qu'une modification du domaine aromatique pouvait engendrer une altération du domaine aliphatique (Franke, 2013) incite à prendre en compte davantage ce domaine qui fait partie intégrante de la subérine.



alkyl caféate



alkyl férulate



alkyl p-coumarate

Figure 5 : Structures chimiques des alkyl hydroxycinnamates retrouvés dans les cires de subérine.

$R=(CH_2)_nCH_3$, $n=16-31$.

2 - 3- Les cires associées au polymère de subérine

Les cires associées à la subérine sont des composés solubles généralement obtenus par immersion rapide des tissus subérisés dans des solvants de type chloroforme ou par extractions plus approfondies avec des solvants à haute température ou au Soxhlet. La composition des cires de racines peut varier en fonction des espèces mais aussi le long des racines d'une même espèce (Kosma et al. 2015).

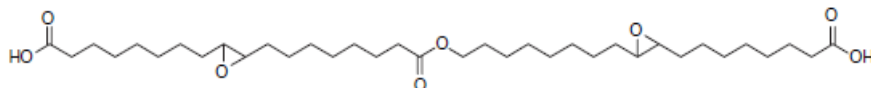
Dans le périoderme natif et blessé des organes de stockage souterrains, les cires sont composées d'alcane, d'alcools primaires, d'acides gras et d'alkyl férulates (Espelie et al. 1980b; Schreiber et al. 2005a). Les alkyl férulates sont les composés majoritaires des cires du périoderme des tubercules. Ils sont formés d'acide férulique estérifié avec des alcools gras ayant des longueurs de chaînes allant de C16 à C32. Dans le périoderme blessé de la pomme de terre, les alkyl férulates représentent 60% des constituants des cires (Schreiber et al. 2005a).

Chez *Arabidopsis*, le terme de cires de racine désigne les composés qui sont obtenus après immersion rapide dans du chloroforme des racines de plantes de 6 à 7 semaines ayant poussées en terre. Les cires des racines sont particulièrement enrichies dans une zone (taproot) de 3 à 5 cm située sous la rosette (Kosma et al. 2012). A ce stade de développement, les racines possèdent un périoderme pleinement développé et donc fortement subérisé. Ces cires semblent absentes des racines plus jeunes ou poussées *in vitro* (Vishwanath et al. 2013). Les cires de racine sont majoritairement composées d'alkyl hydroxycinnamates (principalement d'alkyl caféates et d'alkyl coumarates de C18 à C22) (Figure 5), mais aussi d'acides gras (C16 à C24), d'alcools gras (C18 à C22), d'alcane C29 et de leurs dérivés oxydés en milieu de chaîne, de stérols et de *sn*-2 monoacylglycérols (Li et al. 2007a; Molina et al. 2009; Kosma et al. 2012).

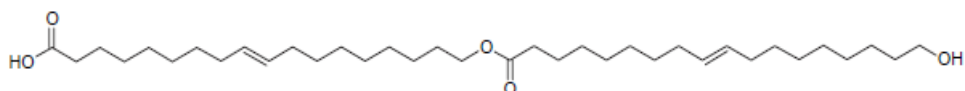
Les cires des racines de *Camelina sativa* ont une composition assez similaire à celles d'*Arabidopsis*, avec notamment une majorité d'alkyl caféates et d'alkyl coumarates en C18 à C22 (Razeq et al. 2014). La fraction soluble obtenue à partir de l'exoderme subérisé des racines d'*Iris germanica* contient également des cires composées d'alcane (C23-C29), d'alcools gras (C14-C18) et d'acide férulique (Meyer et al. 2011a). Dans les racines de soja, l'endoderme contient davantage de cires (alcane, alcools et acides gras) que l'exoderme (Thomas et al. 2007). Dans des fibres subérisées de coton, un diester trimérique, le 1-(22-caféyloxydocosanoyl)-glycérol représente le composant principal des cires (Schmutz et al.

Esters linéaires

Acide 9-epoxyoctadecane-1,18-dioïque estérifié à un acide 9-epoxy-18-hydroxyoctadecanoïque

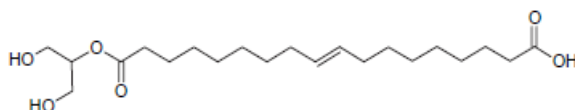


Acide 18-hydroxyoctadec-9-énoïque estérifié à un acide 18-hydroxyoctadec-9-énoïque

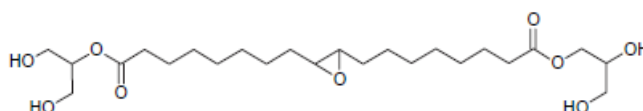


Esters de glycérol

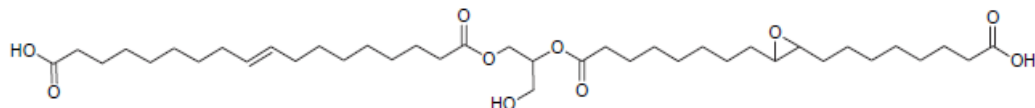
Glycérol estérifié à un acide octadec-9-ene-1,18 dioïque



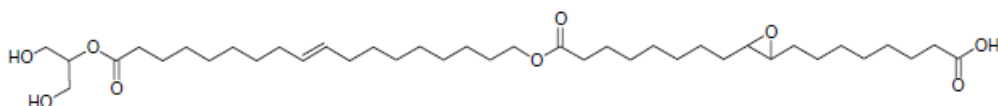
Glycérol estérifié à un acide 9-epoxyocadecane-1,18-dioïque estérifié à un glycérol



Acide octadec-9-ene-1,18-dioïque estérifié à un glycérol estérifié à un acide 9-epoxyoctadecane-1,18-dioïque

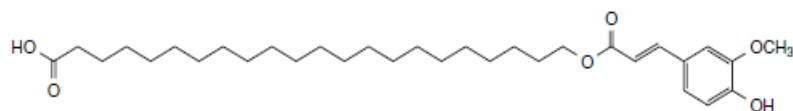


Glycérol estérifié à un acide 18-hydroxyoctadec-9-énoïque estérifié à un 9-epoxyoctadecane-1,18-dioïque



Esters de férulate

Acide 22-hydroxydocosanoïque estérifié à un acide férulique



Glycérol estérifié à un acide 22-hydroxydocosanoïque estérifié à un acide férulique

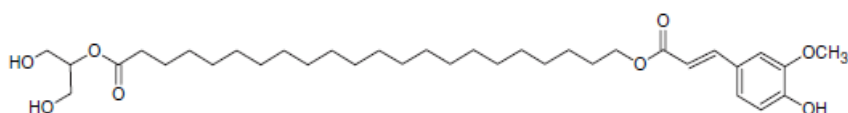


Tableau 2 : Blocs d'oligomères trouvés dans la subérine du liège.
D'après Graça and Santos, 2007.

1994). Enfin, des analyses récentes de la composition en cires de onze espèces de plantes montrent la très importante variabilité interspécifique et intraspécifique des cires solubles associées aux tissus subérisés (Kosma et al. 2015).

3 - STRUCTURE DE LA SUBERINE

La subérine ne pouvant être isolée de façon intacte, il est impossible de déterminer sa structure macromoléculaire de façon précise. Cependant, des expériences de dépolymérisation partielle et de RMN, complétées par des observations microscopiques, ont permis de proposer plusieurs modèles pour l'ultrastructure de la subérine.

Les informations concernant la structure de la subérine proviennent principalement de données générées par dépolymérisation partielle du polymère. Plusieurs oligomères obtenus par dépolymérisation partielle de l'écorce du chêne liège et du périderme de la pomme de terre ont été identifiés par ESI/MS/MS (Tableau 2) :

- des esters linéaires d'acides gras ω -hydroxylés et d'acides gras α,ω -dicarboxyliques (Graça and Santos, 2006b),
- des monoacylglycérols composés de glycérol estérifié avec des acides gras α,ω -dicarboxyliques et des acides gras ω -hydroxylés (Graça and Pereira 2000b; Graça and Santos 2006b),
- des diesters trimériques comme du glycérol lié à deux acides gras α,ω -dicarboxyliques, ou des acides gras α,ω -dicarboxyliques liés à chacune de leurs extrémités avec du glycérol (Graça and Santos, 2006a; Graça et al., 2015; Santos et al. 2013),
- des esters de férulate avec des acides gras ω -hydroxylés qui peuvent être liés à du glycérol pour former un diester trimérique (Graça and Pereira, 2000a; Santos and Graça, 2006).

Il a été proposé que les blocs oligomériques glycérol-acide dicarboxylique-glycérol pourraient former la base de la structure du polymère de subérine (Figure 6A) (Graça and Santos, 2007; Franke and Schreiber, 2007). Des expériences de dépolymérisation partielle couplées à de la RMN réalisées chez la pomme de terre ont récemment montré que les acylglycérols représentaient 88% des oligomères de subérine alors que les esters aliphatiques

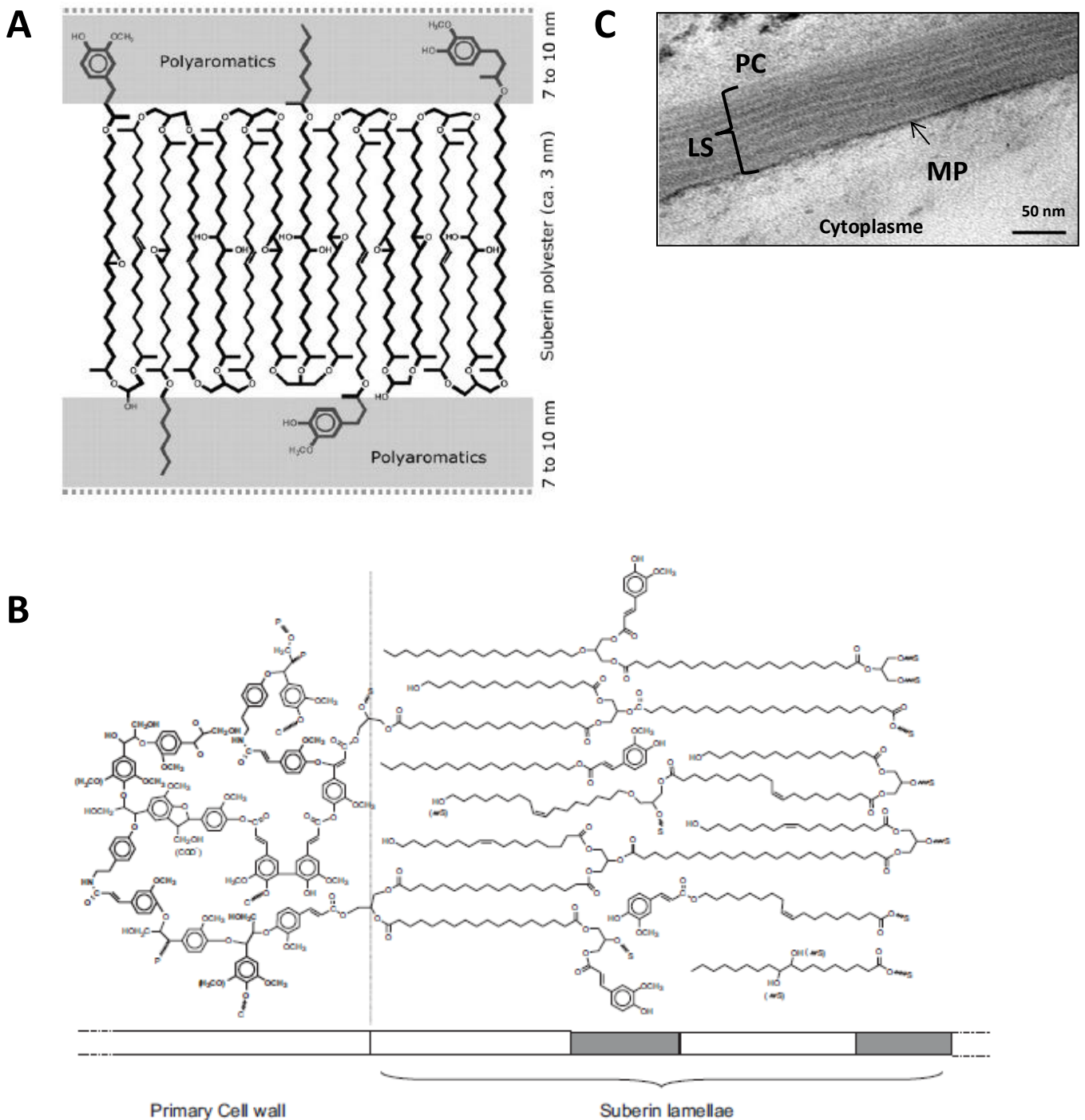


Figure 6 : Ultrastructure de la subérine.

(A, B) Modèles proposés pour la structure macromoléculaire de la subérine. (A) Modèle de Graça and Santos, 2007. (B) Modèle de Bernardis, 2002. (C) Image obtenue par microscopie électronique à transmission d'une cellule subérisée de racines d'Arabidopsis. LS, lamelles de subérine ; MP, membrane plasmique ; PC, paroi cellulaire. (Domergue, non publié).

linéaires et les esters féruliques 8% et 4% respectivement (Graça et al., 2015). Il a aussi été démontré que l'estérification des trois positions du glycérol permet la formation d'un réseau à trois dimensions. De plus, des liaisons esters additionnelles peuvent s'établir entre des acides gras α,ω -dicarboxyliques et ω -hydroxylés et former ainsi un domaine aliphatique réticulé.

Des analyses de RMN en phase solide ont montré par ailleurs que les domaines aliphatique et aromatique de la subérine étaient spatialement distincts (Bernards, 2002). Néanmoins une proximité entre la partie aliphatique et aromatique de la subérine a été observée par RMN en phase solide suggérant l'existence de liaisons covalentes entre ces domaines (Stark et al. 1994; Yan and Stark, 2000). Des liaisons esters entre monomères aliphatiques et acide férulique ayant été trouvées par dépolymérisation partielle, il a été proposé que l'acide férulique puisse faire le lien entre le domaine aliphatique et le domaine aromatique, ce dernier pouvant être relié à la paroi cellulaire (Figure 6B) (Bernards, 2002).

Le modèle de Bernards (2002) intègre des cires associées de manière non covalente au domaine aliphatique de la subérine (Figure 6B). Cependant, la localisation exacte et le rôle de ces cires dans la formation du polymère n'ont pas encore été démontrés. Si les cires sont physiquement associées au polymère de subérine, cela implique une localisation extracellulaire de ces composés. Le fait que la plupart des composés des cires soient extraits en trempant rapidement les racines dans des solvants vont dans le sens d'une localisation extracellulaire (Li et al. 2007a). De plus, des expériences de désorption-ionisation laser assistée par matrice ont permis de montrer une localisation en surface d'alkyl hydroxycinnamates (Jun et al. 2010). Néanmoins, la quasi-totalité des alcanes est extraite en moins de 10 secondes alors que les alkyl hydroxycinnamates, les acides gras à très longues chaînes et les alcools primaires sont totalement extraits au bout de 120 secondes seulement (Li et al. 2007a). Les alcanes seraient donc situés en surface du périderme alors que les autres composés des cires seraient plus à l'intérieur et donc moins accessibles.

La subérine est déposée au niveau de la face interne de la paroi cellulaire primaire, contre la membrane plasmique. La zone subérisée de la paroi cellulaire apparaît sous forme d'une alternance de bandes claires (translucides aux électrons) et sombres (denses aux électrons) lors des observations par microscopie électronique à transmission (Figure 6C). Plusieurs suggestions ont été faites quant à la nature de ces bandes. Solidays et ses collaborateurs (1979) ont proposé que les bandes claires représentaient une couche de cires car une disparition des bandes translucides est observée lorsque la synthèse des cires est

inhibée. Des observations similaires ont été faites pour les cires des fibres de coton (Schmutz et al. 1996). Il a aussi été suggéré que la partie claire pouvait correspondre au domaine aliphatique et les bandes sombres au glycérol et aux acides hydroxycinnamiques estérifiés (Figure 6B) (Bernards, 2002). Dans le modèle proposé par Graça et Santos 2007 (Figure 6A), la taille des acides gras α,ω -dicarboxyliques reliant les glycérols est semblable à l'épaisseur des bandes translucides. La structure lamellaire perturbée observée chez des mutants d'*Arabidopsis* (*horst* et *ralph*) et de pomme de terre (*cyp86a33*) présentant une diminution de la quantité totale d'acides gras ω -hydroxylés et d'acides gras α,ω -dicarboxyliques confirme l'importance de ces composés aliphatiques dans l'organisation structurale de la subérine (Compagnon et al. 2009; Höfer et al. 2008; Molina et al. 2009; Serra et al. 2008). Par contre, le mutant *asft*, qui est caractérisé par une réduction complète des esters d'acides féruliques dans la partie aliphatique de la subérine chez *Arabidopsis*, ne présente aucune modification de la structure de la subérine (Molina et al. 2009). De même, chez le mutant de pomme de terre *fht*, la forte diminution de la quantité d'esters d'acides féruliques n'affecte pas la structure lamellaire de la subérine (Serra et al. 2010). Ces observations remettent en cause le rôle proposé des esters d'acides féruliques dans la formation des lamelles denses de la subérine.

Les difficultés à déterminer l'organisation ultrastructurale de la subérine démontrent toute la complexité de ce polymère dont la mise en place correcte doit être le résultat d'associations multiples.

4 - BIOSYNTHESE DE LA SUBERINE

La déposition de la subérine requiert la biosynthèse des monomères aliphatiques, aromatiques et du glycérol ainsi que leur transport et leur assemblage au niveau de la paroi cellulaire. Le glycérol est issu du métabolisme primaire alors que les composés aromatiques proviennent des voies de biosynthèse de la lignine. Pour les composés aliphatiques de la subérine, des approches de génomique fonctionnelle sur le modèle *Arabidopsis thaliana*, mais aussi sur la pomme de terre et la tomate, ont permis l'identification de la plupart des enzymes impliquées dans leur biosynthèse. Alors que la biosynthèse des monomères aliphatiques a été relativement bien décrite, l'ordre des réactions ainsi que les mécanismes de transport et d'assemblage restent néanmoins encore assez mal connus.

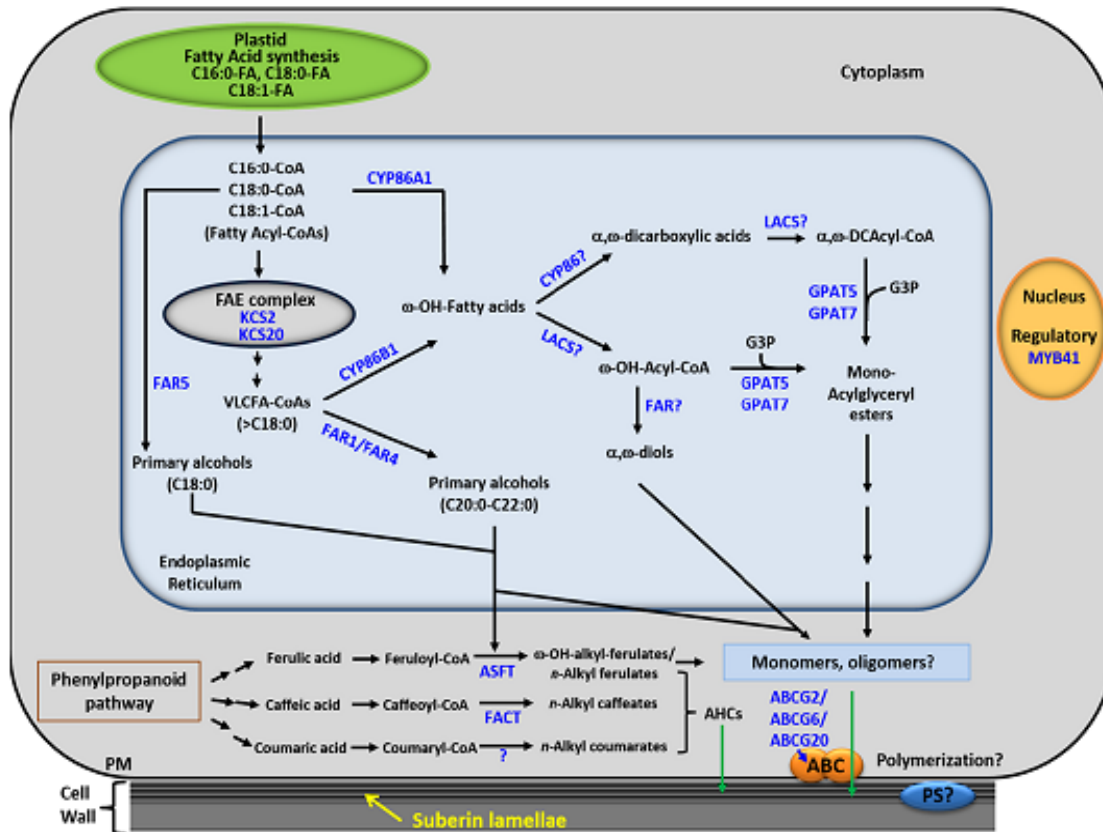


Figure 7 : Vue d'ensemble des voies de biosynthèse de la subérine. Les enzymes en bleues sont celles identifiées chez *Arabidopsis thaliana*.

FAE, Fatty Acid Elongase ; VLCFA, very long-chain fatty acid ; FAR, fatty acid reductase ; CYP, cytochrome P450 ; G3P, glycerol-3-phosphate ; GPAT, glycerol 3-phosphate acyltransferase ; LACS, long chain acyl-CoA synthetase ; ASFT, aliphatic suberin feruloyl transferase ; FACT, fatty alcohol:caffeoyl-CoA caffeoyl transferase ; ABC, ATP-binding cassette transporter ; AHC, alkyl hydroxycinnamate ; PS, polyester synthase. Extrait de Vishwanath et al. 2015.

4 - 1 - Biosynthèse des monomères aliphatiques

Les premiers travaux visant à caractériser les voies de biosynthèse des monomères aliphatiques de subérine ont été réalisés en étudiant l'incorporation d'acide oléique ou de d'acétate radiomarqué par des disques de tubercules de pomme de terre (Dean and Kolattukudy, 1977; Agrawal and Kolattukudy, 1977; Yang and Bernards 2006). Des activités d' ω -hydroxylation et d'hydroxylation d'acides gras ω -hydroxylés ont pu ainsi être mises en évidence dans les extraits subérisés. Une activité d'élongation a aussi été mise en évidence dans des racines de maïs (Schreiber et al. 2005b). Ce type d'approche n'a cependant pas permis de décrire les étapes de réduction pour former les alcools gras, d'activation des acides gras en thioesters d'acyl-CoA, et d'acylation ou d'estérification impliquant le glycérol et les composés aromatiques.

Les approches de génétique inverse et la caractérisation fonctionnelle de plusieurs enzymes clés ont ensuite permis de proposer les voies métaboliques produisant l'ensemble des monomères aliphatiques (Figure 7). La production des monomères de subérine débute dans les plastes avec la formation des acides gras saturés en C16 et C18 réalisée par un complexe multienzymatique appelé Fatty Acid Synthase (FAS). Les acides gras ainsi formés sont ensuite exportés dans le réticulum endoplasmique (RE) où ont lieu les étapes d'élongation, d'oxydation, de réduction et d'estérification avec le glycérol. Après avoir été éventuellement estérifiés avec des composés aromatiques dans le cytoplasme, les précurseurs aliphatiques sont exportés à travers la membrane plasmique pour être polymérisés au niveau de la paroi cellulaire.

4 - 1 - 1 - Activation des chaînes acyles

Les acides gras à longues chaînes synthétisés par la FAS (C16 et C18) sont hydrolysés par une acyl-ACP thioestérase chloroplastique pour être ensuite acheminés vers le RE. Une étape de thioestérification des acides gras libres est donc pré-requise pour leur utilisation dans des réactions métaboliques suivantes. Les Long-Chain Acyl-CoA Synthétases (LACS) sont des enzymes qui catalysent la thioestérification des acides gras libres à longue chaîne au Coenzyme A (CoA) pour former des acyl-CoAs. L'activation des chaînes acyles est ATP-dépendante et se fait en deux étapes avec dans un premier temps la formation d'un

intermédiaire acyl-AMP puis la liaison du carbone activé avec le groupe thiol du CoA (Pulsifer et al. 2012). Il y a neuf gènes codant pour des LACS dans le génome *d'Arabidopsis thaliana* (Schnurr et al. 2004). Deux d'entre elles, LACS1 et LACS2, sont impliquées dans la synthèse de la cutine et des cires cuticulaires (Lü et al. 2009; Schnurr et al. 2004). LACS1 participe notamment à la formation des monomères en C16 du polymère de cutine. LACS2 est impliqué dans l'incorporation des précurseurs en C16 et en C18 dans le polymère de cutine. Le double mutant *lacs1 lacs2* présente une quantité de cires et de cutine davantage diminuée que chez les simples mutants suggérant que ces enzymes ont des activités se recoupant (Lü et al. 2009). Aucune LACS n'a encore été trouvée comme étant impliquée spécifiquement dans la synthèse de la subérine. Cependant, des analyses chimiques du mutant *lacs2* indiquent que ce gène aurait un rôle supplémentaire dans la formation de la subérine (Molina unpublished; Li-Beisson et al. 2010)

4 - 1 - 2 - Elongation des chaînes acyles

La subérine est notamment composée d'acides gras à très longue chaîne non modifiés ou modifiés. L'élongation des acides gras en C16 et C18 en acides gras à très longue chaîne (AGTLCs, \geq C20) s'effectue grâce à un complexe multienzymatique membranaire appelé Fatty Acid Elongase (FAE). Comme pour la synthèse *de novo* des acides gras, chaque cycle d'élongation fait intervenir quatre réactions enzymatiques successives. La première étape d'élongation des acides gras se traduit par la condensation d'un acyl-CoA (C16 et plus) avec un malonyl-CoA grâce à la 3-kétoacyl-CoA synthase (KCS). Le produit de cette réaction, un 3-kétoacyl-CoA est ensuite réduit par la 3-kétoacyl-CoA réductase (KCR) en 3-hydroxyacyl-CoA qui est lui-même déshydraté par la 3-hydroxyacyl-CoA déshydratase (HCD) pour former un trans-2,3-énoyl-CoA. L'étape finale de l'élongation est une réduction par l'énoyl-CoA réductase (ECR) permettant d'obtenir un acyl-CoA allongé de deux carbones. A la différence de la synthèse des acides gras qui se fait dans les plastes grâce à des enzymes solubles, l'élongation a lieu dans le réticulum endoplasmique grâce à des enzymes membranaires. Il s'avère que c'est l'enzyme de condensation qui détermine la spécificité de substrat de chaque complexe d'élongation ainsi que la quantité et la longueur des chaînes des AGTLCs produits (Millar and Kunst, 1997). En revanche, les trois autres enzymes de l'élongase (KCR, HCD, ECR) ont une large spécificité de substrats et semblent être communes aux différents

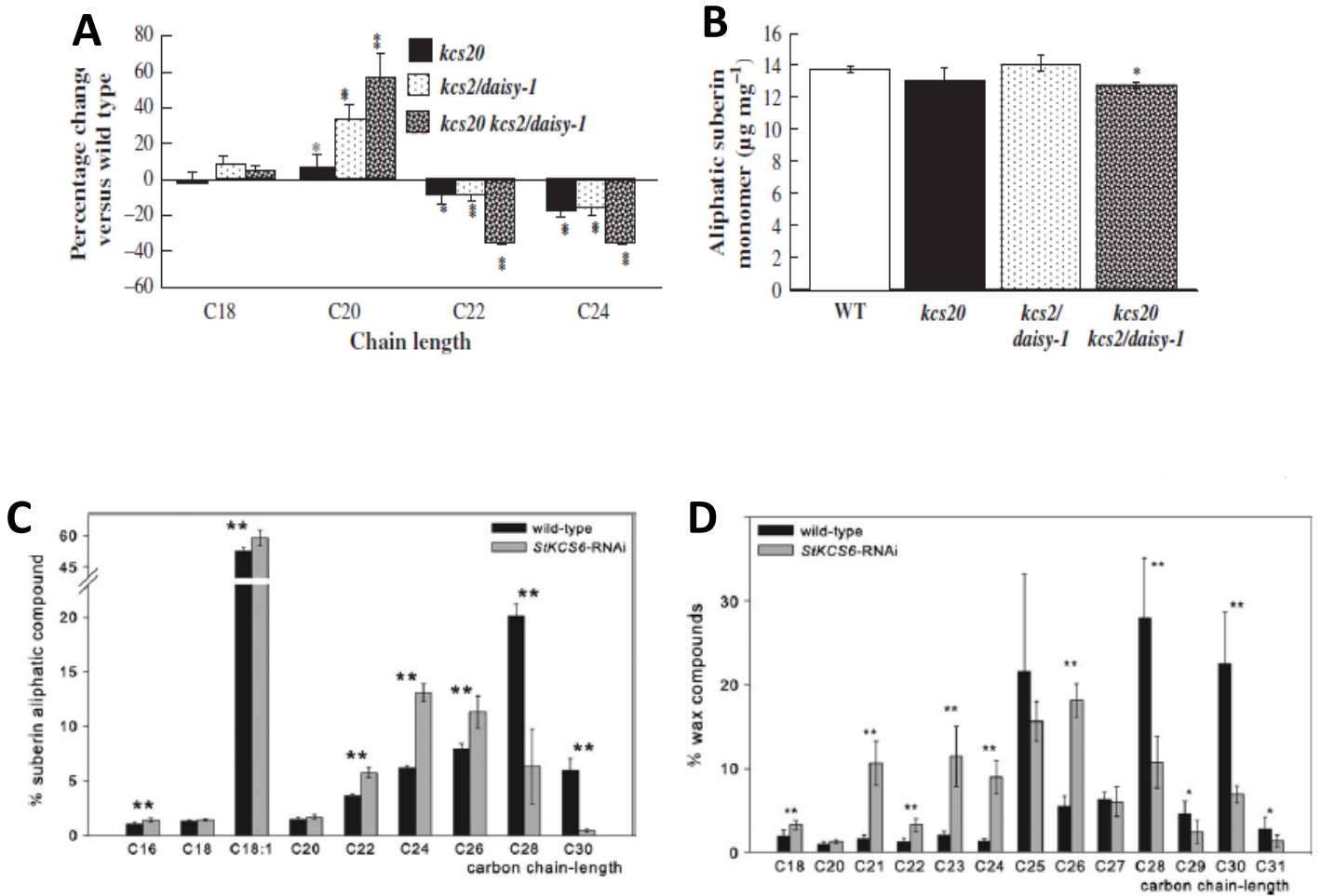


Figure 8 : Composition de la subérine chez divers mutants.

(A, B) Analyse de la subérine de racines des mutants d'Arabidopsis *kcs2/daisy* et *kcs20 kcs2/daisy* (Lee et al. 2009) et (C, D) du périderme de tubercule silencé pour *StKCS6* (Serra et al. 2010). (A) Pourcentage relatif de différence de la distribution des composés aliphatiques en fonction de la longueur de chaîne entre les mutants *kcs2*, *kcs20 kcs2* et le sauvage. (B) Quantité en monomères aliphatiques de subérine en µg/mg de matière sèche dans les racines des mutants *kcs2/daisy* et *kcs20 kcs2/daisy* et du sauvage. Profils des longueurs de chaîne (C) des monomères aliphatiques du polymère de subérine et (D) des cires.

complexes d'élongation. En effet seul un locus codant pour une enzyme fonctionnelle a été identifié pour chacune de ces trois enzymes alors que 21 KCS ont été annotées dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Joubès et al. 2008). Il n'est pas évident d'assigner une fonction spécifique à chaque KCS car les acides gras à très longue chaîne sont communs à plusieurs voies biosynthétiques. De plus des analyses de profils d'expression et des analyses d'expression hétérologue chez la levure ont révélé que certaines KCS pouvaient avoir des fonctions qui se recoupent (Joubès et al. 2008; Paul et al. 2006; Trenkamp et al. 2004).

Deux études ont néanmoins montré que deux KCS, KCS2/DAISY et KCS20, sont impliquées dans la formation des acides gras à très longue chaîne présents au niveau de la subérine (Franke et al. 2009; Lee et al. 2009). Le mutant *kcs2/daisy* présente une réduction des AGTLCs en C22 et C24 au niveau de tous les monomères de subérine bien que la quantité totale ne soit pas différente de celle du sauvage car les acides gras à plus courte chaîne s'accumulent (Figure 8A, B). La capacité à former des acides gras en C22 et C24 a d'ailleurs été montrée par expression hétérologue chez la levure. Le double mutant *kcs2/daisy kcs20* est davantage affecté au niveau des composés aliphatiques de la subérine des racines mais aussi au niveau des cires cuticulaires que les simples mutants *kcs2/daisy* et *kcs20*, ce qui indique que ces enzymes ont des fonctions partiellement redondantes (Lee et al. 2009).

Une diminution de l'expression chez la pomme de terre d'un gène homologue à *KCS2/DAISY*, *StKCS6*, par ailleurs fortement exprimé dans le périoderme subérisé des tubercules, résulte en une réduction des monomères en C28 et plus avec une accumulation des composés en C26 et moins au niveau du polymère de subérine (Figure 8C) ainsi que des cires associées au polymère (Figure 8D) (Serra et al. 2009). Ces résultats indiquent que cette enzyme est impliquée dans l'élongation des précurseurs de subérine en C26 et/ou plus.

4 - 1 - 3 - Oxydation des chaînes acyles

Les composés prépondérants du polymère de subérine sont les acides ω -hydroxylés et les acides α,ω -dicarboxyliques. Chez les plantes, l'oxygénation des acides gras est assurée par des cytochromes P450 (CYP) monooxygénases NADPH dépendantes. Plusieurs CYP appartenant à différentes familles (en majorité CYP86 et CYP94) sont capables de réaliser l'hydroxylation du groupe méthyl terminal des composés aliphatiques (ω -hydroxylation). Chez *Arabidopsis*, deux CYPs appartenant à la famille CYP86, CYP86A1 et CYP86B1, sont impliquées dans la formation de la subérine des racines. Des préparations microsomales

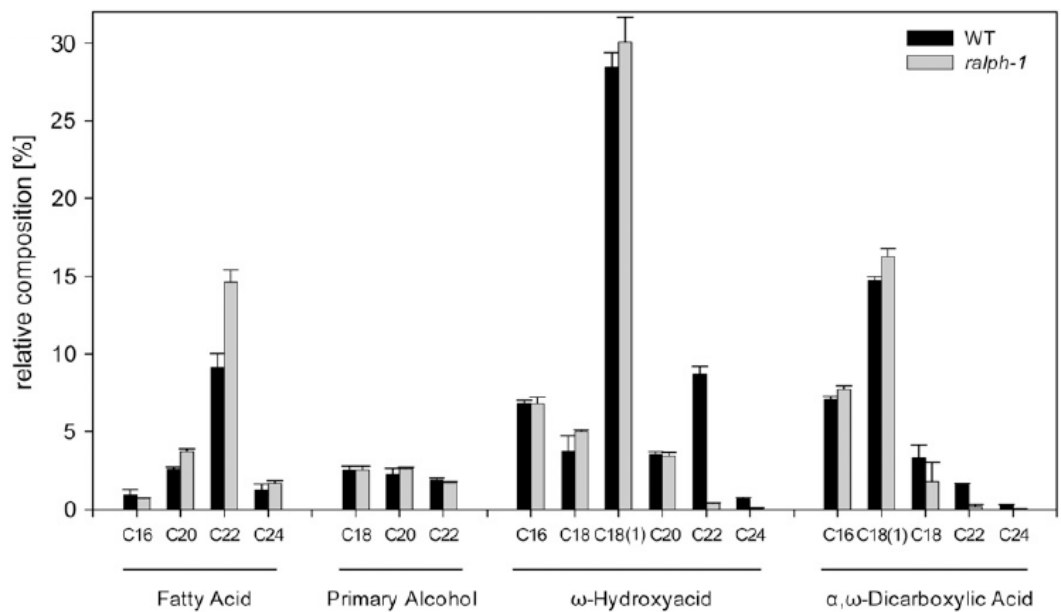
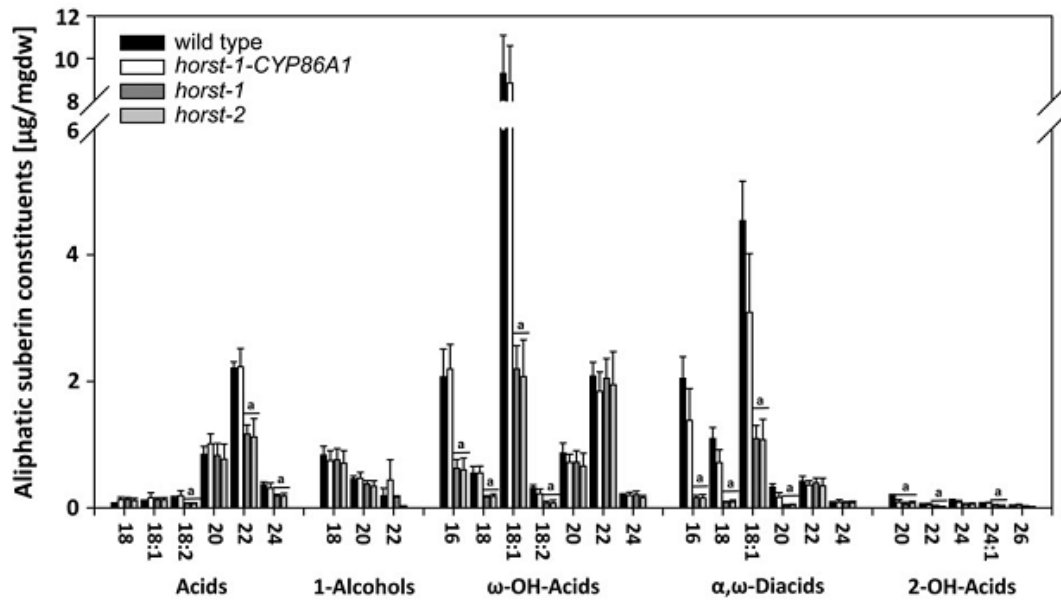


Figure 9 : Composition en monomères aliphatiques de la subérine des racines des mutants (A) *horst* et (B) *ralph* comparée au sauvage.
D'après Höfer et al. 2008 et Compagnon et al. 2009.

exprimant *CYP86A1* sont capables d' ω -hydroxyler des acides gras saturés et insaturés (Benveniste et al. 1998). Le mutant *horst* (pour hydroxylase of root suberised tissue), affecté pour *CYP86A1*, présente une réduction importante des acides gras ω -hydroxylés en C16 et C18 ainsi que des acides gras α,ω -dicarboxyliques correspondants au niveau de la subérine des racines (Höfer et al. 2008) (Figure 9A). Une diminution de 60% de la quantité totale des chaînes aliphatiques ainsi qu'une altération de l'ultrastructure de la subérine sont par ailleurs observées au niveau des racines du mutant *horst*. *CYP86B1* est lui responsable de la génération des acides ω -hydroxylés à très longues chaînes (C22 et C24). Le mutant *ralph* (pour root aliphatic plant hydroxylase) affecté pour *CYP86B1* présente une augmentation de l'accumulation des acides gras en C22 et C24 et une absence quasi-totale des acides gras ω -hydroxylés et α,ω -dicarboxyliques en C22 et C24 dans la subérine des racines et des graines (Compagnon et al. 2009; Molina et al. 2009) (Figure 9B). Une diminution de l'expression de l'orthologue de *CYP86A1* chez la pomme de terre, *StCYP86A33*, résulte en une réduction de 70 à 90% des acides gras C18:1 ω -hydroxylés et α,ω -dicarboxyliques. Comme pour le mutant *horst*, une altération de la structure de la subérine du périoderme est observée. De plus, la perméabilité du périoderme est augmentée de 3.5 fois chez ce mutant (Serra et al. 2008). Ces données démontrent l'importance des acides gras ω -hydroxylés dans la mise en place et les propriétés de la subérine.

Il reste néanmoins à déterminer si la diminution en acides gras α,ω -dicarboxyliques constatée chez les mutants *horst* et *ralph* est seulement due à une réduction des précurseurs ou bien à un rôle catalytique de ces enzymes dans la formation de ces composés. Chez *Arabidopsis*, *HOTHEAD* et *CYP86A2* sont deux oxydoréductases potentielles qui pourraient à partir d'acides gras ω -hydroxylés former les acides α,ω -dicarboxyliques retrouvés dans la cutine. En effet, une diminution des acides α,ω -dicarboxyliques a été rapportée chez les mutants *hothead* et *cyp86a2* alors que les quantités d'acides gras ω -hydroxylés restent inchangées comparées au sauvage (Kurdyukov et al. 2006; Molina et al. 2008).

4 - 1 - 4 - Réduction des chaînes acyles

En plus des acides gras ω -hydroxylés et des acides gras α,ω -dicarboxyliques, le polymère de subérine contient des alcools gras. Les alcools gras représentent environ 15% du

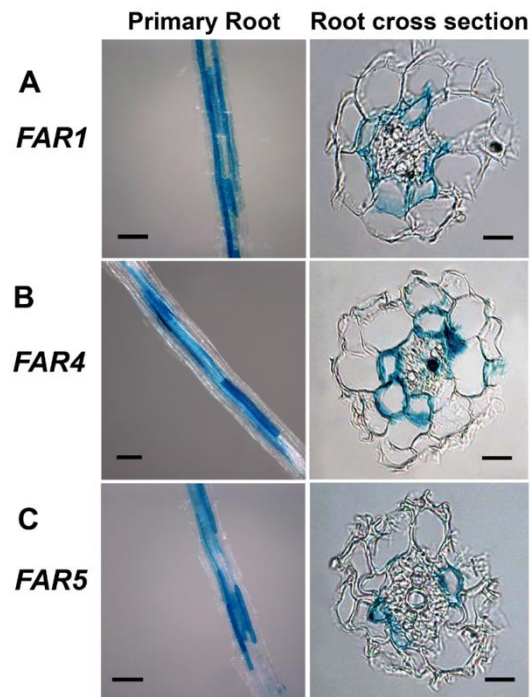


Figure 10 : Localisation de l'activité des promoteurs des gènes de biosynthèse des alcools gras de la subérine *FAR1*, *FAR4* et *FAR5* dans des racines de plantules d'*Arabidopsis* de 10 jours.

D'après Domergue et al. 2010.

total des composés aliphatiques du polymère de subérine du périoderme des tubercules de pomme de terre (Yang and Bernards, 2006) et du rhizoderme/hypoderme des racines de ricin (Zeier et al. 1999). A l'inverse, il y a très peu d'alcools gras dans le polymère de subérine des racines de soja (Thomas et al. 2007). De même, tous les alcools gras des graines de soja et des racines d'iris sont trouvés dans la fraction soluble, ce qui indique qu'ils ne sont pas polymérisés (Shao et al. 2007; Meyer et al. 2011a).

Dans les racines et les graines d'*Arabidopsis*, les alcools gras représentent environ 6 à 7% de la totalité de la masse des monomères de subérine et sont constitués principalement de chaînes en C18, C20 et C22 (Domergue et al. 2010). La réduction des acides gras en alcools primaires est catalysée par des Fatty Acyl CoA Reductases (FAR). La réduction est un processus à deux étapes nécessitant la formation d'un aldéhyde intermédiaire. Néanmoins, il a été montré que les FARs d'origine végétale ont la capacité de réduire à la fois les acides gras et les aldéhydes assurant ainsi l'intégralité de la synthèse des alcools gras (Rowland and Domergue, 2012). Le génome d'*Arabidopsis* possède huit gènes codant pour des FARs. Trois d'entre elles, FAR1, FAR4 et FAR5 sont impliquées dans la formation des alcools primaires associés à la subérine. Ces trois enzymes sont spécifiquement exprimées dans l'endoderme des racines (Figure 10) et leur expression hétérologue chez la levure permet la production des mêmes alcools gras que ceux retrouvés dans le polymère de subérine. Les simples mutants *far1*, *far4* et *far5* présentent une réduction des alcools gras en C22, C20 et C18 respectivement, et ce dans la subérine des racines et des graines. *FAR1*, *FAR4* et *FAR5* sont surexprimées en réponse à une blessure et la quantité d'alcools gras est doublée dans le polyester des feuilles, ce qui est en accord avec le fait qu'un dépôt de subérine est induit au niveau des sites de blessure (Domergue et al. 2010). Chez le triple mutant *far1 far4 far5*, la quantité totale en alcools gras est diminuée de 70 à 80% dans le polymère de subérine des racines et des graines. Néanmoins, les autres monomères de subérine ne sont pas affectés dans le triple mutant ce qui indique que les alcools gras ne semblent pas être indispensables pour le processus de polymérisation. Cependant, la perméabilité du manteau des graines est augmentée chez le triple mutant, ce qui suggère que les alcools gras doivent jouer un rôle important dans les propriétés de barrière du manteau de la graine (Vishwanath et al. 2013).

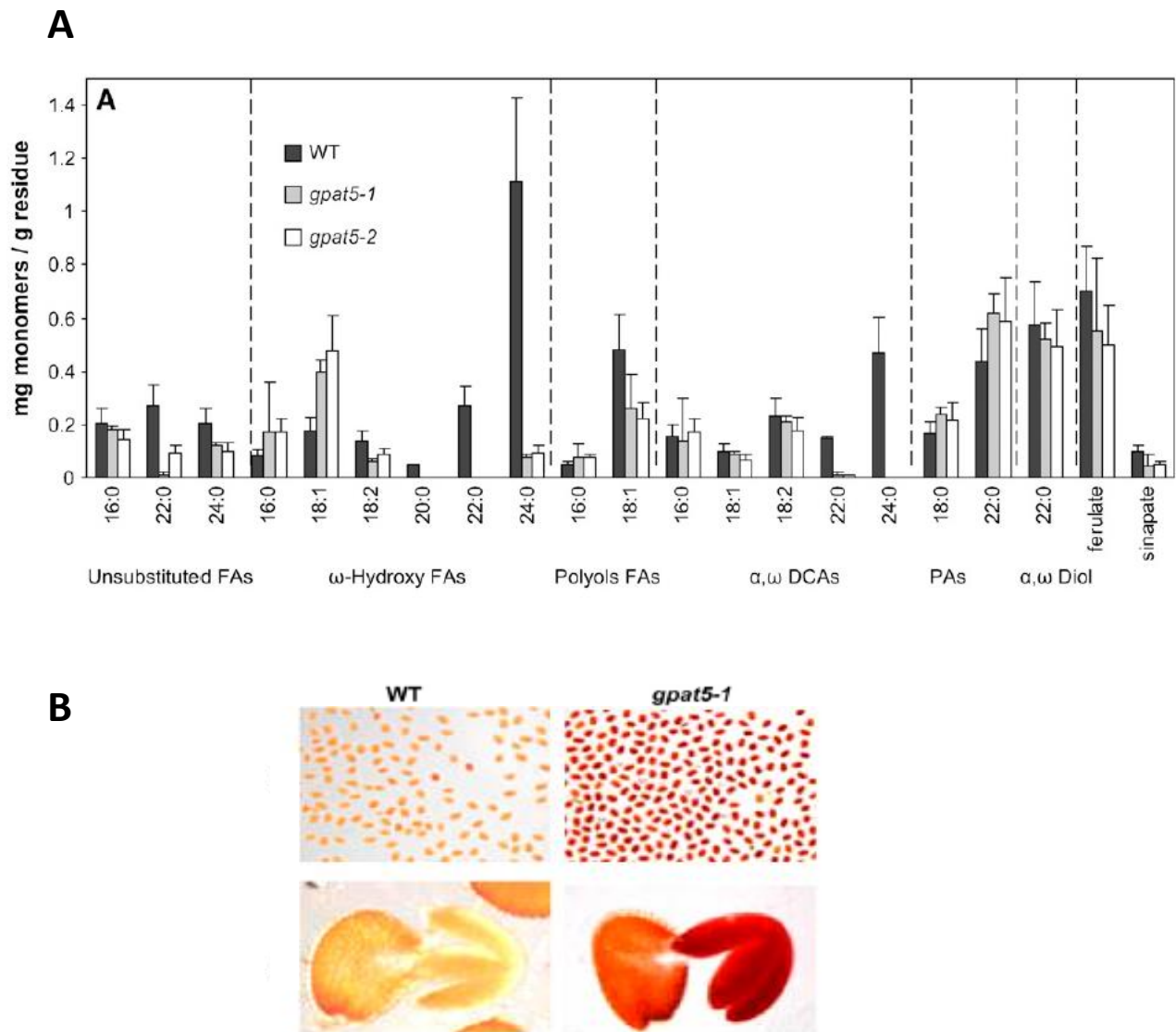


Figure 11 : Phénotype des graines du mutant *gpat5* comparé au sauvage.

(A) Composition en monomères de subérine des graines des mutants *gpat5* comparée au sauvage. (B) Test aux sels de tétrazolium sur des graines issues des lignées *gpat5* et sauvage. Si le tétrazolium pénètre dans la graine, il est réduit par les réductases de l'embryon. Le produit de la réduction (formazan) est de couleur rouge. D'après Beisson et al. 2007.

4 - 1 - 5 - Estérfication

Plusieurs expériences de dépolymérisation partielle ont montré la présence d'acides gras estérifiés avec du glycérol dans le polymère de subérine (Graça and Pereira 2000b; Graça and Santos 2006a). Les glycérol-3-phosphate acyltransférases (GPAT) catalysent le transfert d'un groupe acyl d'un acyl-ACP ou d'un acyl-CoA sur la position *sn*-1 ou *sn*-2 du glycérol-3-phosphate (G3P). Dans le génome d'Arabidopsis, il y a dix gènes annotés comme codant pour des GPATs. Toutes les GPATs identifiées comme participant à la formation des polyesters de cutine et de subérine ont une activité *sn*-2 acyltransférase alors que les GPATs impliquées dans la synthèse des lipides membranaires ont une régiospécificité pour la position *sn*-1 (Yang et al. 2012; Yang et al. 2010).

GPAT5 est la première enzyme de la famille des GPATs caractérisée pour son rôle dans la biosynthèse de la subérine. Le mutant d'Arabidopsis *gpat5* présente une réduction conséquente des monomères de subérine avec des longueurs de chaîne de 20 à 24 atomes de carbone (acides gras non-substitués, acides gras ω -hydroxylés, acides gras α,ω -dicarboxyliques) dans les racines et surtout dans les graines (Beisson et al. 2007) (Figure 11A). Cette forte réduction de la quantité de monomères de C20 à C24 a pour conséquence une diminution de 50% du contenu en subérine dans les graines et une augmentation de la perméabilité du manteau de la graine (Figure 11B). GPAT5 est une *sn*-2 acyltransférase mais contrairement à GPAT4, GPAT6 et GPAT8, qui sont requises pour la formation du polymère de cutine (Li et al. 2007b; Li-Beisson et al. 2009), elle ne possède pas d'activité phosphatase (Yang et al. 2010). Une autre GPAT, GPAT7 a été proposée comme impliquée dans la biosynthèse de la subérine (Yang et al. 2012). En effet, GPAT7 et GPAT5 sont très proches au niveau de leurs séquences protéiques et comme pour GPAT5, la surexpression de GPAT7 entraîne la production de monoacylglycérol (MAG) avec des acides gras en C22 et C24 dans les graines et dans les cires des tiges. Néanmoins, l'expression de GPAT7 étant fortement induite par des blessures sur des feuilles, il se pourrait que cette enzyme intervienne dans la synthèse de la subérine lors du processus de cicatrisation.

Le férulate représente 1 à 10 % du polymère de subérine (Graça and Pereira, 1998; Pollard et al. 2008). Les expériences de dépolymérisation partielle ont mis en évidence la présence de férulate estérifié au groupe hydroxy terminal des acides gras ω -hydroxylés à longue et très longue chaîne. Cela a permis de supposer l'implication de féruloyl transférases

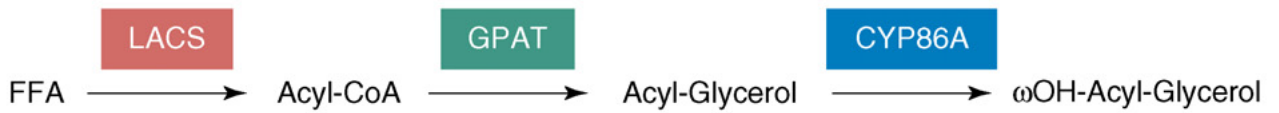
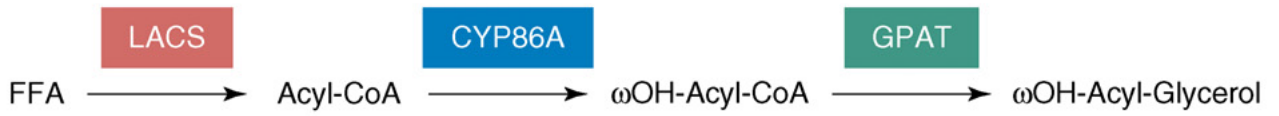
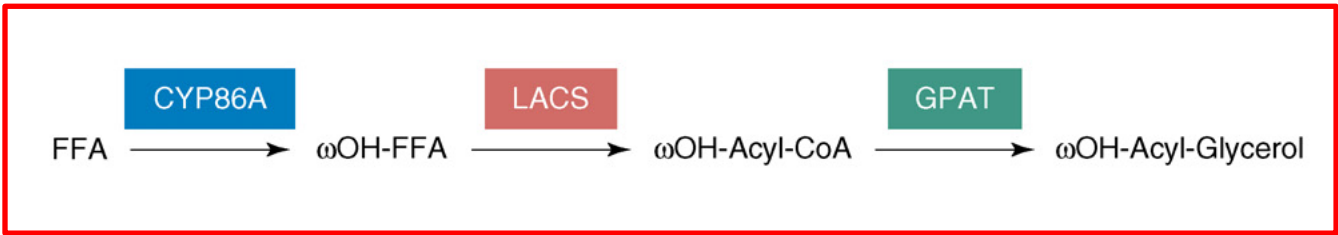


Figure 12 : Hypothèses sur l'ordre des réactions catalysées par les enzymes LACS, CYP86A et GPAT.

L'hypothèse la plus probable est encadrée en rouge. D'après Pollard et al. 2008.

dans la formation du polymère de subérine. Lofty et ses collaborateurs (1994, 1996) ont mis en évidence l'activité d'une hydroxycinnamoyl-transférase avec des acides gras hydroxylés et des alcools gras sur des extraits de tubercules de pommes de terre blessés et de feuilles de tabac. Des gènes codant pour des féruloyl-CoA transférases requises pour l'incorporation du férulate dans le polymère de subérine ont été identifiés chez *Arabidopsis* et chez la pomme de terre. L'enzyme d'*Arabidopsis* ASFT (pour Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase) et son homologue chez la pomme de terre FHT (pour ω -hydroxy Fatty acid/Fatty alcohol Hydroxycinnamoyl Transferase) appartiennent à la famille des acyltransférases de type BAHD. Cette famille comprend un nombre important de protéines avec des séquences différentes mais partageant deux motifs communs, HXXXD et DFGWG. Pour le mutant *asft*, une disparition quasi-totale du férulate contenu dans le polymère de subérine est observée dans les racines ainsi que dans les graines. Cette importante réduction en férulate s'accompagne d'une diminution des acides gras ω -hydroxylés en C22 et C24 (Gou et al. 2009; Molina et al. 2009). Ce résultat suggère qu'une partie des acides féruliques du polymère est estérifiée avec des acides gras ω -hydroxylés en C22 et C24. Le mutant *fht* montre aussi une forte diminution des esters de férulate (Serra et al. 2010). ASFT et FHT sont capables de catalyser *in vitro* le transfert de l'acide férulique du féruloyl-CoA sur les fonctions alcools des acides gras ω -hydroxylés et des alcools gras. A la différence de l'ensemble des autres enzymes impliquées dans la synthèse des monomères de subérine qui sont toutes microsomales, ASFT et FHT sont localisées dans le cytosol. Or ces enzymes catalysent le transfert du férulate, qui est hydrophile, sur des accepteurs acyls hydrophobes (alcools gras et acides gras ω -hydroxylés). Il est possible que FHT et ASFT interagissent avec les enzymes qui génèrent ces composés aliphatiques ou avec une protéine qui lie et transporte les acyl-CoAs (Molina and Kosma, 2014).

4 - 1 - 6 - Ordre des réactions pour la biosynthèse des monomères aliphatiques

L'ordre des étapes d'activation, d'oxydation et de transfert sur le glycérol des chaînes acyles de la subérine reste encore incertain, notamment car les substrats directs des cytochromes P450 hydroxylant les acides gras restent encore inconnus. La Figure 12 décrit les 3 successions possibles. L'acide gras libre peut être hydroxylé par CYP86A, puis activé par une LACS avant d'être transféré sur le glycérol par une GPAT. L'acide gras libre peut aussi être activé puis hydroxylé avant d'être transféré sur le glycérol. Enfin, l'acide gras libre peut

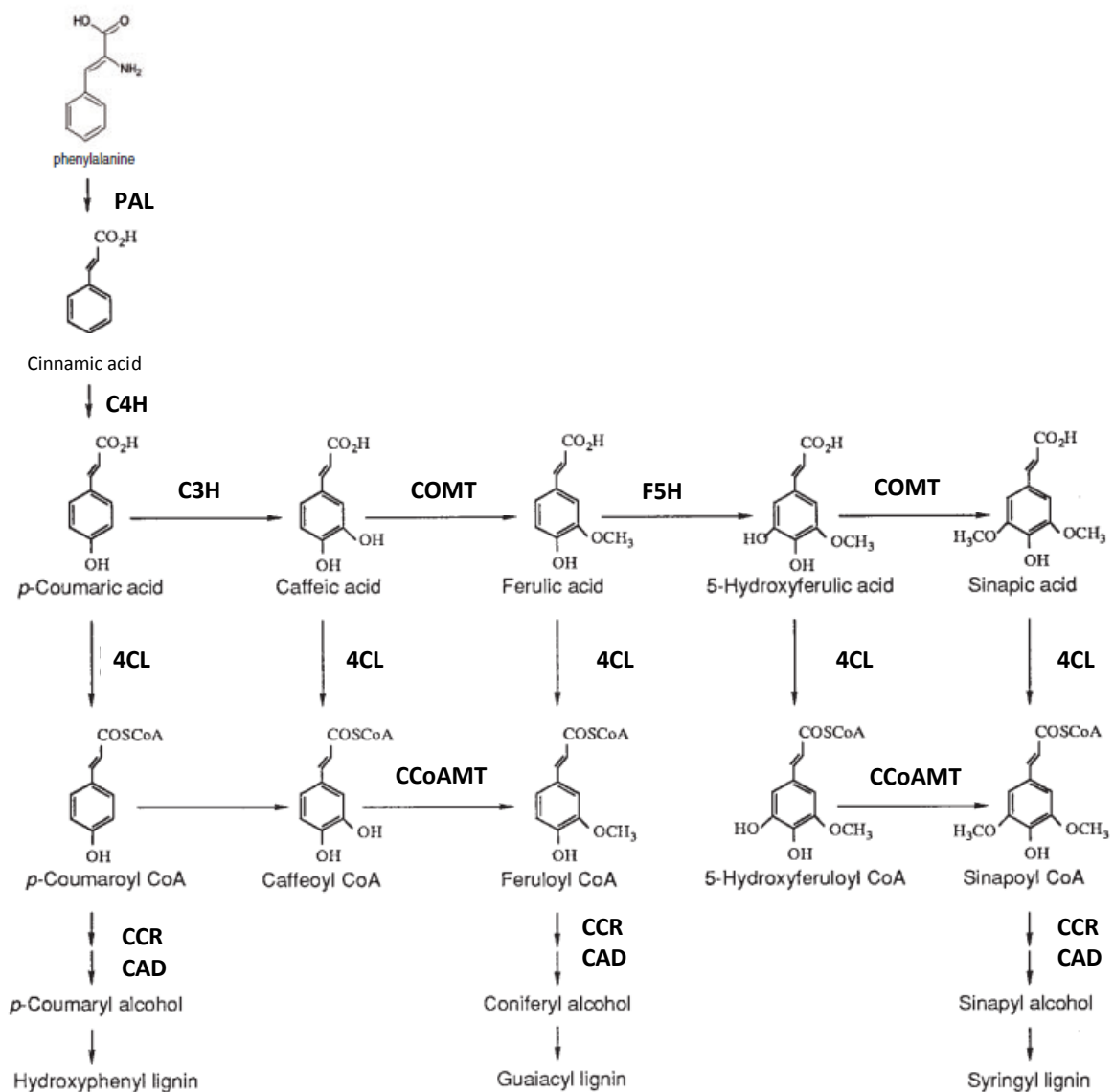


Figure 13 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

PAL, phenylalanine amonia-lyase ; C4H, cinnamate 4-hydroxylase ; C3H, p-coumarate 3-hydroxylase ; COMT, caffeic acid *O*-methyltransferase ; F5H, ferulate 5-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate-CoA ligase ; CCoAMT, caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase ; CCR, cinnamoy-CoA reductase; CAD, cinnamoyl alcohol dehydrogenase.

D'après Zhong et al. 1998.

être activé par une LACS, transféré sur le glycérol par une GPAT avant d'être hydroxylé par CYP86A. Cependant, d'après certaines études *in vitro* et analyses de mutants, une hypothèse semble plus probable. Le fait que LACS2 montre une préférence pour les acides gras ω -hydroxylés tend à suggérer que l'hydroxylation par les P450 pourrait se faire avant l'activation en acyls-CoA (Schnurr et al. 2004). La capacité d' ω -hydroxylation d'acides gras libres par CYP86A1 a d'ailleurs été mise en évidence *in vitro* (Benveniste et al. 2006; Pinot and Beisson 2011; Rupasinghe et al. 2007). *In vitro*, l'enzyme GPAT5 est capable de catalyser le transfert d'acyl-CoA, d' ω -hydroxy-acyl-CoA et d' α,ω -dicarboxy-acyl-CoA sur le glycérol (Yang et al. 2010). L'ordre de réaction le plus probable serait donc hydroxylation, activation puis transfert des acyls-CoAs sur le glycérol (Figure 12).

4 - 2 - Biosynthèse des monomères aromatiques

Les acides hydroxycinnamiques (acides coumariques, caféiques et féruliques) du domaine aromatique de la subérine sont synthétisés via la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Figure 13). Cette voie de biosynthèse a été principalement caractérisée dans le cadre d'études sur la lignine (Boerjan et al. 2003). La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, dont le précurseur est la phénylalanine, fait intervenir des réactions d'hydroxylation, de *O*-méthylation, de ligation sur le CoA, et de réduction. La première étape fait intervenir la Phénylalanine Amonia-Lyase (PAL) qui va permettre de convertir la phénylalanine en acide cinnamique. L'hydroxylation de l'acide cinnamique en acide *p*-coumarique est catalysée par une Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H). L'acide *p*-coumarique va servir de précurseur pour la formation des acides caféiques, féruliques et sinapiques. La synthèse de l'acide caféique à partir de l'acide coumarique nécessite notamment une *p*-Coumarate 3-Hydroxylase (C3H). Une Caffeic acid *O*-Methyl Transferase (COMT) va permettre la formation de l'acide férulique à partir de l'acide caféique. Des enzymes de type Ferulate 5-Hydroxylase (F5H) et COMT catalysent la formation de l'acide sinapique. De manière intéressante, il a été montré que la surexpression de la F5H a pour conséquence une augmentation de la quantité des composés phénoliques et aliphatiques de la subérine suggérant l'existence de régulations entre les deux voies métaboliques (Franke, 2015). Les acides *p*-coumariques, féruliques et sinapiques peuvent aussi être convertis en monolignols grâce à trois réactions successives catalysées par une 4-coumarate-CoA Ligase (4CL), une

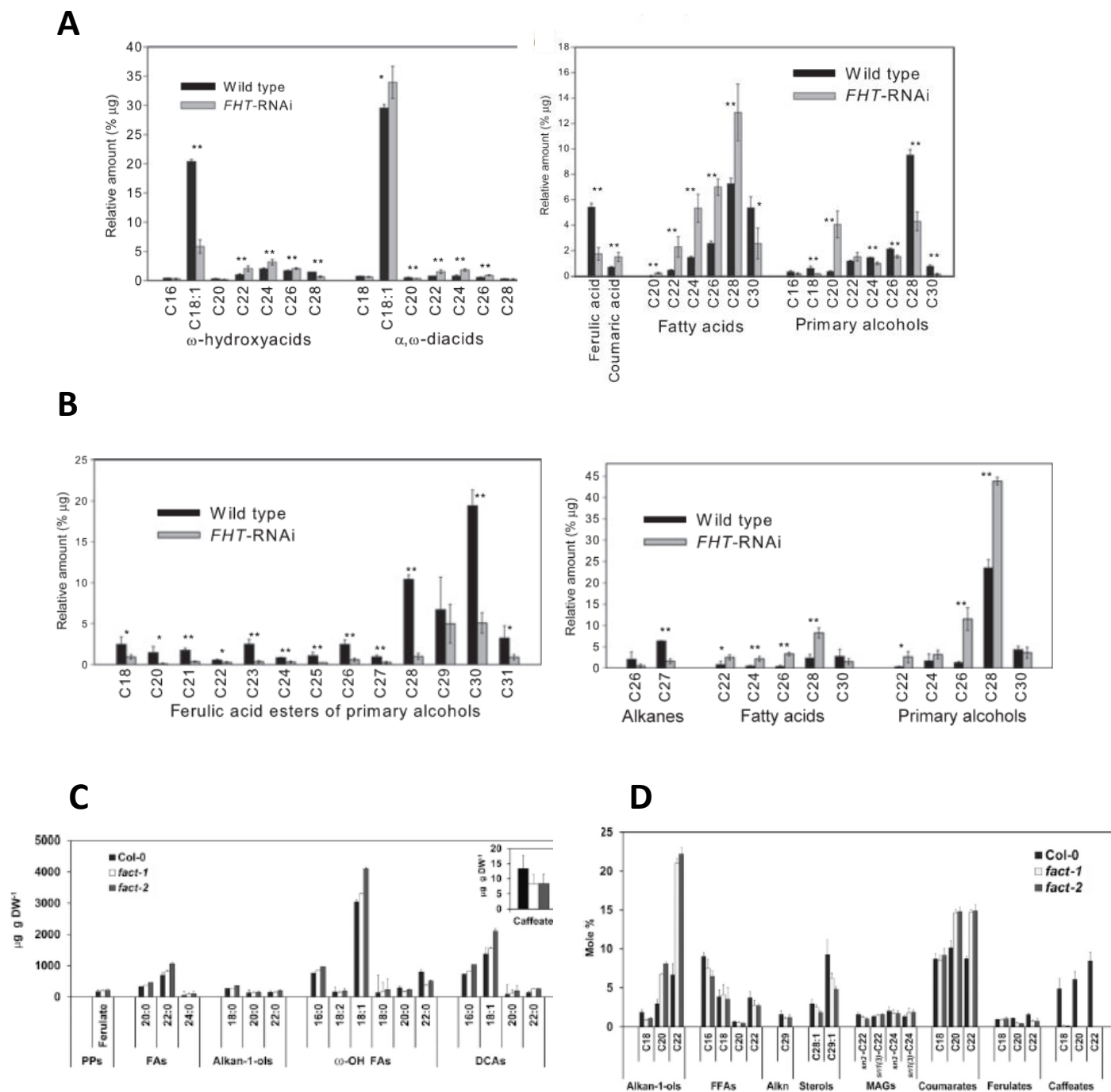


Figure 14 : Composition du polymère de subérine et des cires associées à la subérine chez les mutants de pomme de terre *fht* et d'*Arabidopsis fact1*. Composition (A) du polymère de subérine et (B) des cires dans le périderme du mutant *fht* et du sauvage. Composition (C) du polymère du subérine et (D) des cires de racines matures du mutant *fact1* et du sauvage. D'après Serra et al. (2010) et Kosma et al. (2012).

Cinnamoyl-CoA Reductase (CCR) et une Cinnamoyl Alcohol Dehydrogenase (CAD). Ces composés servent de base à la synthèse des différents blocs de lignine alors qu'ils sont présents en faible quantité au niveau de la subérine.

4 - 3 - Biosynthèse des cires associées au polymère de subérine

Plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des cires associées à la subérine ont été identifiées. Parmi ces enzymes, plusieurs sont aussi impliquées dans la biosynthèse du polymère de subérine suggérant l'existence de voies de biosynthèse communes entre certains précurseurs des cires et des monomères du polymère de subérine. GPAT5, une glycérol-3-phosphate *sn*-2 acyltransférase, est requise à la fois pour la synthèse des précurseurs du polymère de subérine et pour la formation des MAG des cires racinaires d'*Arabidopsis* (Beisson et al. 2007). La production des MAG des cires racinaires est d'ailleurs corrélée de façon positive avec l'expression de GPAT5 (Li et al. 2007a). Les trois réductases FAR1, FAR4 et FAR5, qui synthétisent les alcools gras du polymère de subérine, participent également à la formation des alcools gras requis pour la synthèse des alkyls hydroxycinnamates des cires racinaires d'*Arabidopsis* (Vishwanath et al. 2013). Chez la pomme de terre, FHT, une enzyme appartenant à la famille des acyl-transférases de type BAHD, est responsable de la synthèse des esters de férulate du polymère de subérine (Serra et al. 2010). Le polymère de subérine des lignées *FHT* RNAi affiche une importante réduction de l'acide férulique ainsi que des composés majoritaires du polymère (C18:1 acide ω -hydroxylé et C18:1 acide α,ω -dicarboxylique) alors que les acides gras non modifiés augmentent (Figure 14A). La composition des cires est aussi altérée dans ces lignées avec une réduction des alkyl férulates et une augmentation des alcools primaires libres (Figure 14B). Ainsi, FHT participe à la fois à la synthèse du polymère et à celle des cires associées au périoderme des tubercules de pomme de terre.

Une autre enzyme de la famille des acyl-transférases de type BAHD, FACT (Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Caffeoyl Transferase), est par contre spécifique pour la synthèse des alkyl caféates des cires du périoderme des racines d'*Arabidopsis* (Kosma et al. 2012). En effet, contrairement aux lignées *FTH* RNAi, seule la composition des cires est altérée dans le mutant *fact1*. Ce mutant se caractérise par une absence quasi-totale des alkyl caféates et une légère diminution des alkyl férulates (Figure 14D) alors que la composition du polymère n'est

pas affectée (Figure 14C). Une augmentation de la quantité d'alkyl coumarates (C20 et C22), probablement due à une meilleure disponibilité de substrat, a également été constatée chez le mutant *fact1*. En effet, la quantité d'alcools gras libres à 20 et 22 atomes de carbone est nettement plus élevée chez le mutant *fact1* que chez le sauvage. Il faut noter que les autres enzymes synthétisant les alkyl hydroxycinnamates des cires racinaires (coumaryl et féruloyl transférases) restent encore à découvrir. Néanmoins, il est possible que le transfert du féruloyl dans les cires racines soit assuré par une ou plusieurs isoformes de l'enzyme ASFT (Molina and Kosma, 2014).

4 - 4 - Transport et assemblage

Les précurseurs de subérine doivent être transportés depuis le réticulum endoplasmique (RE) et le cytoplasme jusqu'à l'apoplasme en traversant la membrane plasmique (MP). La forme des précurseurs transportés n'a pas encore été mise en évidence. Il se peut que ce soit des monomères et/ou des oligomères partiellement formés comme des acyl-glycérols et des esters de férulates. Quant aux mécanismes intervenant dans l'export et l'assemblage des précurseurs au niveau de l'apoplasme, ils étaient inconnus lorsque j'ai débuté ma thèse. Cependant les avancées faites sur le transport et l'assemblage des précurseurs de la cutine et de la sporopollénine permettent de proposer des mécanismes et des protéines candidates qui pourraient intervenir dans ces types de processus pour la subérine.

4 - 4 - 1 - Transport

Plusieurs hypothèses sur les mécanismes intervenant dans le transport des précurseurs de subérine ont été proposées. Les précurseurs peuvent être accumulés dans des gouttelettes oléophiliques à partir du RE et être ainsi transportés du cytoplasme jusqu'au domaine apoplastique (Pollard et al. 2008). Les précurseurs de subérine peuvent aussi être directement transférés via des sites de contact physiques entre le RE et la membrane plasmique. En effet, chez les mammifères et la levure, ces sites de contact sont impliqués dans le transport de lipides (Carrasco and Meyer, 2011). Même si des sites de contact RE-MP ont été mis en évidence chez les plantes (Staelin, 1997; Larsson et al. 2007), il n'a pas encore été montré

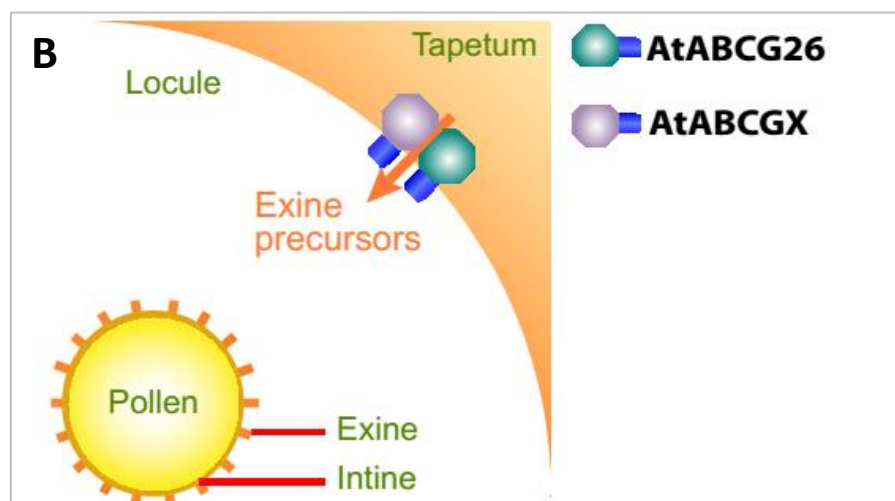
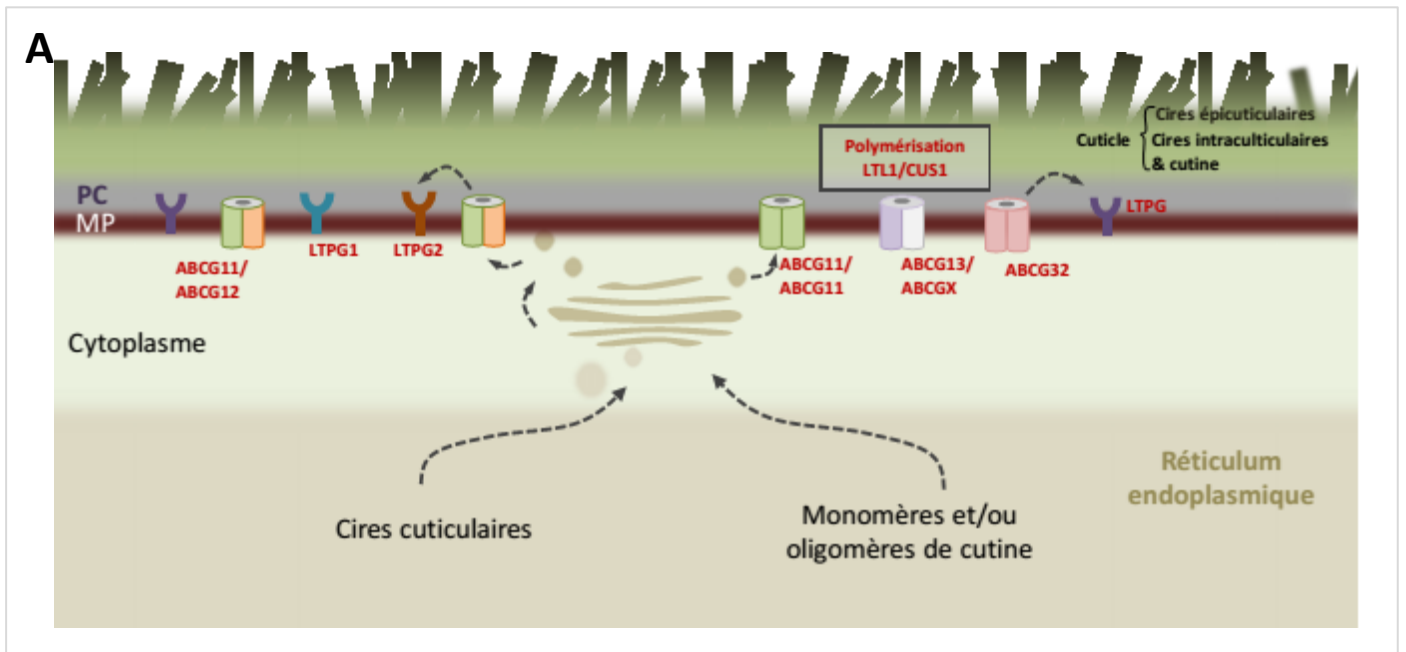


Figure 15 : Mécanismes de transport et d'assemblage des précurseurs de la cuticule (A) et de la sporopollénine (B) chez *Arabidopsis thaliana*.

Seuls les mécanismes et les protéines qui ont été caractérisés sont représentés. PC, paroi cellulaire ; MP, membrane plasmique.

que ce mode de transport était impliqué dans le cas des précurseurs de la cuticule ou de la subérine. Le transport des précurseurs du réticulum endoplasmique à la membrane peut aussi se faire via la voie sécrétoire. Cette voie de transport semble être la plus probable. En effet, il a été montré récemment que le transport des cires cuticulaires du réticulum endoplasmique jusqu'à et à travers la membrane plasmique met en jeu le trafic vésiculaire au niveau de l'interface réticulum endoplasmique-Golgi et du réseau trans-Golgi (McFarlane et al. 2014) (Figure 15).

Des protéines solubles peuvent aussi lier les précurseurs hydrophobes de la subérine pour les transporter à travers le cytoplasme jusqu'à la membrane plasmique. Elles peuvent être des protéines de transfert de lipides (ou LTP pour Lipid Transfer Protein), des protéines liant les acides gras ou des protéines liant les acyl-CoAs. Chez *Arabidopsis*, le mutant *acbp1*, codant pour une Acyl-CoA Binding Protein, présente une diminution de la quantité de cires cuticulaires. De plus, ACBP1 est capable de lier des acyl-CoAs à très longue chaîne (Xue et al. 2014). Cependant le rôle éventuel de cette protéine dans le transport des cires restent à étudier plus en détails.

Des études concernant l'export des précurseurs de la cuticule et de la sporopollénine ont permis de montrer que deux autres types de protéines, des ATP Binding Cassette (ABC) transporteurs et des non-specific Lipid Transfer Protein (nsLTPs), étaient impliqués dans le transport des précurseurs aliphatiques à travers la membrane plasmique (Pighin, 2004; Choi et al. 2011) (Figure 15). Des protéines appartenant aux familles des transporteurs de type ABC et des protéines de transfert des lipides représentent donc de bons candidats pour le transport des précurseurs de subérine à travers la membrane plasmique. Une étude de transcriptomique a d'ailleurs révélé que des transcrits de transporteurs de type ABC étaient plus exprimés dans le phellème du liège comparé à des tissus non subérisés (Soler et al. 2007).

Les ABC transporteurs constituent une des plus grandes familles de protéines chez les plantes mais aussi chez d'autres organismes comme les bactéries ou les humains. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe environ 130 ABC transporteurs qui ont été classés en plusieurs sous familles. Ces protéines transmembranaires sont capables de transporter des substrats à travers différentes membranes cellulaires par hydrolyse de l'ATP. Chez les plantes, les ABC transporteurs sont impliqués dans de nombreux processus comme la réponse aux pathogènes, le transport de phytohormones ou l'export des lipides de surface (Kang et al. 2011). Les ABC transporteurs ont pratiquement tous en commun le fait de posséder deux domaines

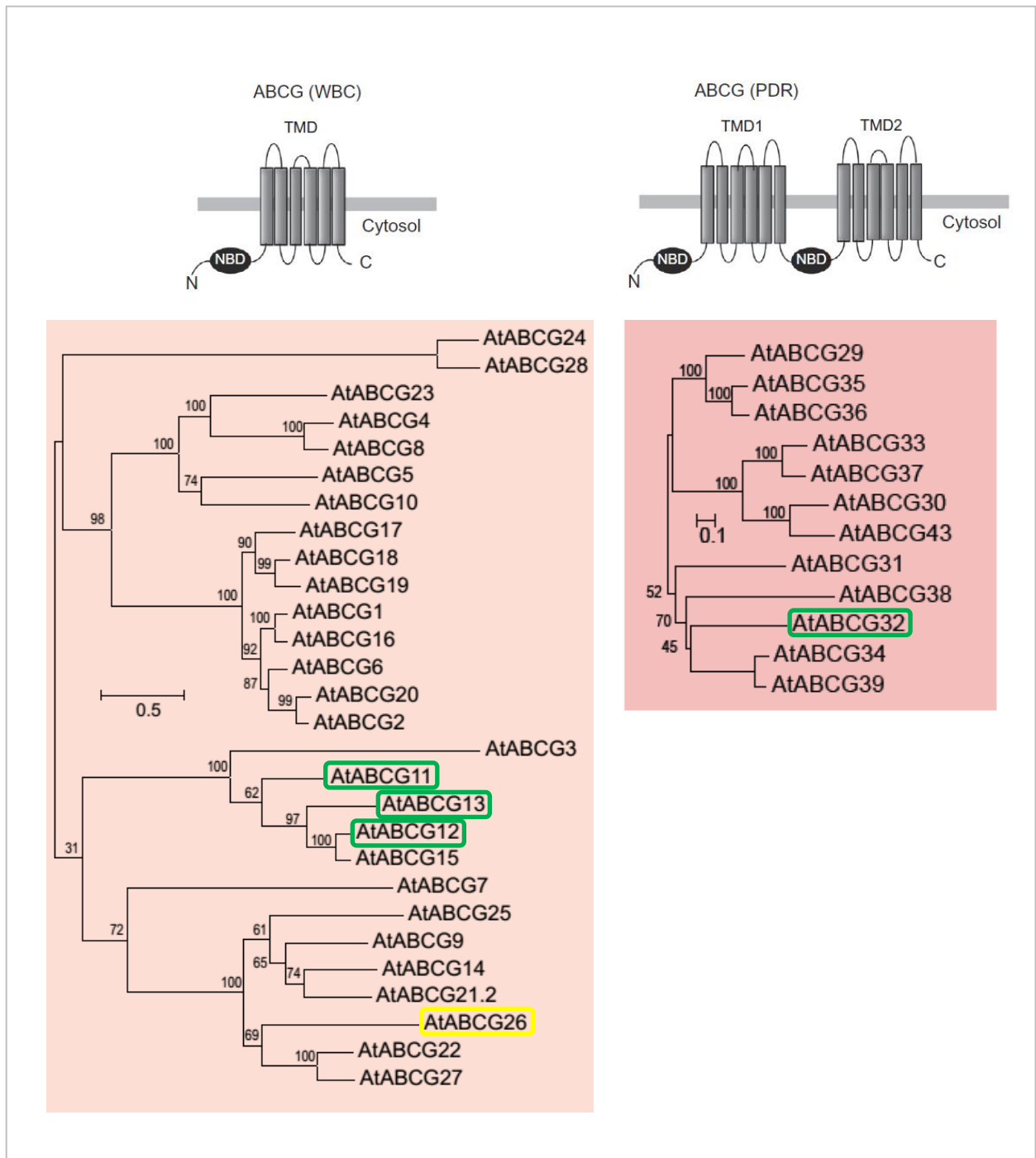


Figure 16 : Structures et arbres phylogénétiques des ABCG transporteurs (WBC et PDR) chez *Arabidopsis*.

Les ABCGs identifiés comme participant au transport des précurseurs de la cuticule et de la sporopollénine sont entourés en vert et jaune respectivement. NBD, nucléotide binding domain ; TMD, transmembrane domain.

D'après Kang et al. 2011 et Shoji, 2014.

transmembranaires (TMD) et deux « nucleotide-binding domain » (NBD) cytosoliques. Les deux domaines NBD lient et hydrolysent l'ATP pour fournir l'énergie requise au transport. Ces domaines possèdent trois motifs de séquence conservés : un site de liaison à l'ATP constitué d'une boîte Walker A et d'une boîte Walker B, ces deux régions étant séparées par 120 acides aminés environ contenant une séquence consensus spécifique des ABC transporteurs (Rea, 2007). Les domaines TMD comprennent 4 à 6 hélices alpha et sont impliqués dans la reconnaissance et le transfert des substrats à travers les membranes (Verrier et al. 2008).

Tous les ABC transporteurs qui ont été caractérisés comme participant à l'export des précurseurs de la cuticule et de la sporopollénine appartiennent à la famille des ABC transporteurs de type G. Les transporteurs de cette famille ont une orientation dite inverse avec le domaine NBD situé en N-terminal. Il existe deux types d'ABCG transporteurs : les ABCG White Brown Complex (WBC) et les ABCG Pleiotropic Drug Resistance (PDR) (Figure 16). Les ABCG WBC étant constitués d'un seul domaine TMD et NBD, ils doivent se dimériser pour être fonctionnels. ABCG12/CER5 est le premier ABCG transporteur à avoir été identifié comme étant impliqué dans le transport des précurseurs de la cuticule chez *Arabidopsis* (Pighin et al. 2004). Le mutant *abcg12/cer5* est caractérisé par une diminution de la quantité de cires extracellulaires. Cependant la quantité totale de cires synthétisées n'est pas modifiée chez le mutant car des inclusions sont observées dans le cytoplasme suggérant un transport défaillant. Pareillement au simple mutant *abcg12/cer5*, le mutant *abcg11* est affecté au niveau des cires cuticulaires (Bird et al. 2007; Luo et al. 2007; Panikashvili et al. 2007; Ukitsu et al. 2007). Cependant, un défaut de cutine a aussi été observé chez *abcg11*, ce qui n'est pas le cas pour le mutant *abcg12/cer5*. Le double mutant *abcg12/cer5 abcg11* est similaire au simple mutant *abcg11* ce qui suggère que ces deux transporteurs interviennent dans une voie de biosynthèse commune. Par ailleurs, des études d'interactions par BiFC ont montré que les protéines ABCG12/CER5 et ABCG11 pouvaient former un hétérodimère et que seule ABCG11 était capable de s'homodimériser. L'hétérodimère ABCG12/CER5-ABCG11 pourrait donc jouer un rôle dans l'export des cires cuticulaires alors qu'ABCG11, sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec un autre ABCG transporteur, serait impliqué dans le transport des précurseurs du polymère de cutine. Deux autres ABCG d'*Arabidopsis* ont récemment été caractérisés. ABCG13, qui est proche de ABCG11 et de ABCG12/CER5, contribue à la formation de la cutine des fleurs (Panikashvili et al. 2011). ABCG32/PEC1, qui possède les quatre domaines fonctionnels, est requis pour le transport des

acides gras hydroxylés retrouvés dans la cutine des feuilles et des fleurs d'*Arabidopsis* (Bessire et al. 2011). Des ABCGs contribuant à la formation de la cuticule ont également été identifiés chez d'autres espèces comme le riz, l'orge, le maïs ou encore les mousses (Buda et al. 2013; Chen et al. 2011).

Les précurseurs de la sporopollénine sont synthétisés par les cellules du tapétum qui forment la couche la plus interne des sacs polliniques. Ils sont ensuite exportés pour être accumulés dans la paroi des grains de pollen, au niveau de l'exine (Figure 15). Chez *Arabidopsis*, plusieurs études ont suggéré que le transporteur ABCG26 pouvait participer au transport des précurseurs de la sporopollénine (Quilichini et al. 2010; Choi et al. 2011; Kuromori et al. 2011).

Chez les plantes, les nsLTPs sont des petites protéines (7 à 10 kDa) basiques, codées par une vaste famille multigénique. Toutes les nsLTPs identifiées possèdent un peptide signal N-terminal de 21 à 35 acides aminés qui permet l'adressage au RE et à la voie sécrétoire. Les LTPs présentent également un motif de 8 cystéines (C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C) (Boutrot et al. 2008). Ces résidus cystéines permettent la formation de quatre ponts disulfures qui stabilisent une cavité hydrophobe formée de quatre à cinq hélices alpha. Grâce à cette cavité, les LTPs ont la capacité, *in vitro*, de lier une grande variété de molécules hydrophobes comme des acides gras, des acyl-CoAs, des phospholipides ou des glycolipides (Liu et al. 2015). Même si les mécanismes employés par les LTPs ne sont pas encore bien compris, ces protéines semblent être impliquées dans de nombreux processus biologiques clés tels que la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Jung et al. 2005) ou encore le développement et la germination de la graine (Pagnussat et al. 2012). Chez *Arabidopsis*, deux nsLTPs, LTPG1 et LTPG2, ont été identifiées comme étant requises pour l'export des cires cuticulaires (Debono et al. 2009; Lee et al. 2009; Kim et al. 2012). Ces deux protéines appartiennent aux nsLTPs de type G car elles possèdent une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) en C-terminal qui est ajoutée dans le RE après la traduction. Cette ancre GPI a la capacité d'attacher les protéines à la membrane plasmique du côté extracellulaire. Chez *Arabidopsis*, 34 LTPGs ont été recensées (Edstam et al. 2013) mais aucune n'a encore été identifiée comme impliquée dans la formation de la subérine.

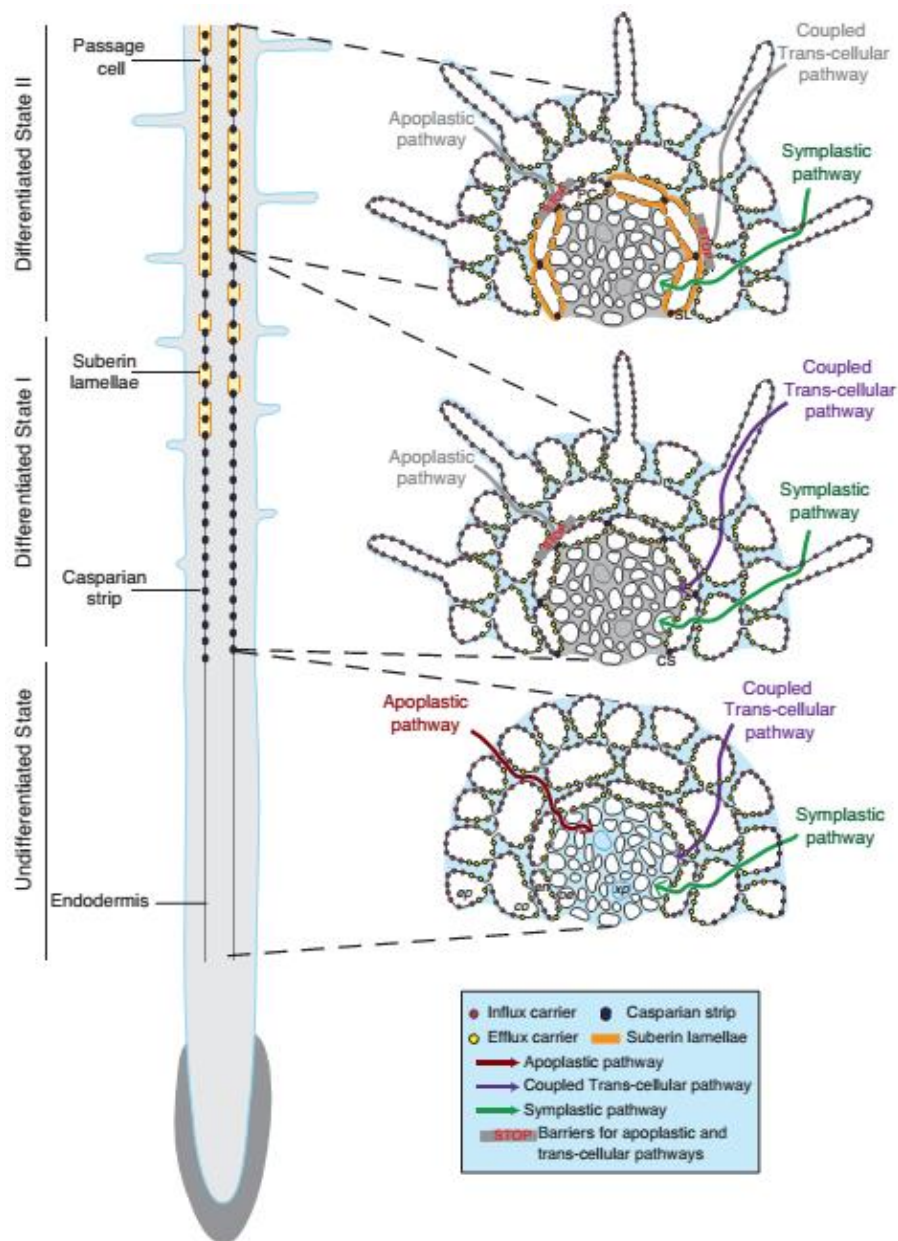
4 - 4 - 2 - Assemblage

Les mécanismes impliqués dans la polymérisation des monomères de la subérine n'ont pas encore été élucidés. Cependant, de récents progrès dans la compréhension des processus d'assemblage des monomères aliphatiques des plantes ont été faits grâce à la caractérisation de deux enzymes appartenant à la famille des GDSL-hydrolase/lipase, GDSL1/CD1/SICUS1 chez la tomate et LTL1/CUS1 chez *Arabidopsis* (Figure 15). Le mutant de tomate *cd1* présente une sévère réduction de cutine polymérisée ainsi qu'une accumulation de 2-MonoHydroxypalmitoyl-Glycérol (2-MHG) non polymérisés (Girard et al. 2012; Yeats et al. 2012). CD1 est capable de former des oligomères de polyester à partir de 2-MHG *in vitro* (Yeats et al. 2012). La localisation extracellulaire de CD1 renforce l'hypothèse que la polymérisation a lieu après le transport des précurseurs à travers la membrane plasmique. La perte de fonction de *LTL1*, un orthologue de *CD1* chez *Arabidopsis*, cause un phénotype typique d'un défaut de cutine (Shi et al. 2011). Comme CD1, *LTL1*, rebaptisée *CUS1*, catalyse la transestérification du 2-MHG *in vitro* (Yeats et al. 2014). Une enzyme proche de *LTL1* pourrait donc être impliquée dans la polymérisation des monomères de subérine.

Pour la partie aromatique du polymère, il a été suggéré que l'assemblage des composés phénoliques pouvait se faire via un processus de polymérisation oxydative catalysée par des peroxydases H_2O_2 dépendantes, comme cela a été décrit pour la formation du polymère de lignine. Une peroxydase anionique associée au dépôt de subérine après blessure et ayant une préférence pour le feruloyl-(*o*-methoxyphenol) a par ailleurs été isolée chez la pomme de terre (Espelie and Kolattukudy, 1985; Bernards et al. 1999; Bernards and Razem, 2001). Récemment, chez *Arabidopsis*, une peroxydase impliquée dans la réticulation oxydative de l'acide férulique dans la subérine de l'endoderme et du manteau de la graine a été identifiée (Franke, 2015).

5 - ROLES DE LA SUBERINE

La subérine est synthétisée par les plantes pour former une barrière hydrophobe dont les propriétés peuvent varier en fonction des tissus, des espèces ou encore de la quantité et de la composition du biopolymère.



Current Opinion in Plant Biology

Figure 17 : Transport radial de l'eau et des nutriments au cours du développement de l'endoderme.

D'après Anderson et al. 2015.

La subérine permet de contrôler les flux d'eau, de solutés et de gaz en formant une barrière plus ou moins perméable entre la plante et son environnement. Ce contrôle est particulièrement important dans les racines qui sont des organes dont la fonction principale est l'absorption d'eau et de solutés provenant du sol. Trois types de transport permettent d'acheminer l'eau et les solutés depuis le sol environnant jusqu'aux tissus conducteurs. La voie apoplastique permet une diffusion à travers la paroi des cellules dans les espaces entre les cellules. Le transport via la voie symplastique se fait uniquement via les plasmodesmes qui permettent de former un continuum cytoplasmique entre les cellules. La voie transcellulaire implique à la fois un passage par la paroi cellulaire et un transport à travers la membrane plasmique. La modification de la paroi cellulaire de l'exoderme et de l'endoderme par l'ajout de cadres de Caspary lignifiés et de subérine permet de réguler le transport non contrôlé de l'eau et des nutriments des voies apoplastiques et transcellulaires (Hose et al. 2001; Enstone et al. 2002; Franke and Schreiber, 2007) (Figure 17). L'utilisation de colorants servant de marqueurs des voies apoplastiques tel que l'iodure de propidium permet de voir clairement un blocage du mouvement radial au niveau de l'endoderme d'*Arabidopsis* indiquant qu'une régulation des flux a lieu à cet endroit (Alassimone et al. 2010). L'analyse de mutants affectés au niveau de la subérine peut permettre de mettre en évidence certaines fonctions de la subérine. Par exemple, chez *Arabidopsis*, l'augmentation de la quantité de subérine chez le mutant *esb1* est accompagnée d'une diminution de la quantité de calcium, de manganèse et de zinc dans la composition ionomique des racines (Baxter et al. 2009). Le développement de sondes permettant de mesurer la conductivité hydraulique des racines d'*Arabidopsis* a permis de montrer que le mutant *horst*, dont la composition en composés aliphatiques est réduite de 60%, a une conductivité hydraulique et une perméabilité au NaCl nettement augmentées. Cependant les mesures de conductivité sur *esb1* suggèrent que la quantité de subérine n'est pas toujours négativement corrélée avec la perméabilité (Ranathunge and Schreiber, 2011). En effet, bien que les racines d'*esb1* aient une quantité de subérine plus importante que le sauvage, aucune réduction de leur perméabilité à l'eau et au NaCl n'a été constatée chez ce mutant. L'évaluation des propriétés de la subérine chez des mutants affectés au niveau de la subérine peut néanmoins permettre de déterminer l'implication spécifique des composés dans la formation de la barrière. Par exemple chez le mutant *asft*, qui a une quantité réduite de férulate, la perméabilité du manteau de la graine est augmentée, comme chez le mutant *gpat5* qui lui est affecté au niveau des composés aliphatiques. Cela démontre l'importance des deux types de monomères pour les propriétés de barrière de la subérine. Les cires associées à la subérine participent aussi au contrôle des flux d'eau assuré par la subérine (Schreiber, 2010;

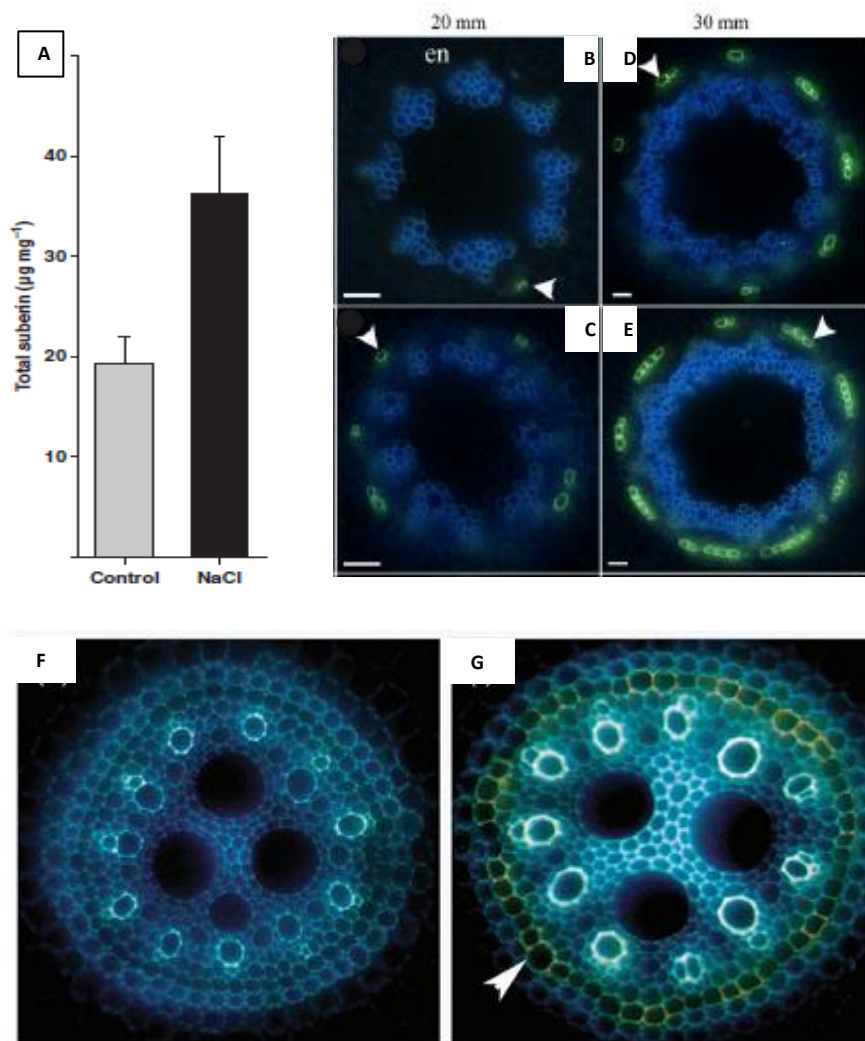


Figure 18 : Stress abiotiques et subérisation.

(A) Quantité totale de subérine dans des racines de 5 semaines arrosées avec une solution de NaCl 100mM ou avec de l'eau (contrôle). D'après Franke et al. 2009. Coupes à 20 mm (B, C) ou à 30 mm (D, E) des pointes de racines d'*Avicennia officinalis* cultivées en condition de stress salin (D, E) ou en condition contrôle (B, C). Les coupes ont été marquées au fluorol yellow. Les flèches indiquent des cellules subérisées de l'endoderme. en, endodermis. D'après Krishnamurthy et al. 2014. Coupes de racines de riz (F, G) cultivées dans une solution aérée (F) ou désoxygénée (G) marquées au fluorol yellow. La flèche indique une cellule subérisée de l'endoderme. D'après Ranathunge et al. 2011.

Soliday et al. 1979). La subérine des racines permet également de contrôler les échanges gazeux. Chez les plantes des zones humides, l'exoderme subérisé des racines limite la perte d'oxygène (Soukup et al. 2007; Watanabe et al. 2013). Chez le chêne liège, le périderme subérisé forme une barrière imperméable aux liquides et aux gaz (Silva et al. 2005).

La subérine sert aussi de protection contre les stress biotiques et abiotiques comme la sécheresse, l'augmentation de la salinité, l'anoxie, les pathogènes, les blessures ou les polluants présents dans le sol. Par exemple, un stress salin se traduit par une augmentation de la quantité de subérine dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* et d'*Avicennia officinalis* (Franke et al. 2009; Krishnamurthy et al. 2014) (Figure 18). De même, dans des racines de riz cultivées en condition stagnante, un dépôt de subérine dans des zones non subérisées en condition aérée est observé (Ranathunge et al. 2011) (Figure 18). Une augmentation de la quantité d'alcane dans la fraction soluble des racines d'iris en condition de sécheresse souligne le rôle des cires associées à la subérine dans la protection contre les stress environnementaux (Meyer et al. 2011a). De plus, il a été montré que les alkyl hydroxycinnamates ont des activités antioxydantes (Anselmi et al. 2004; Menezes et al. 2011) suggérant que les cires de la subérine pourraient protéger la plante des effets néfastes des radicaux libres qui peuvent être produits en réponse à un stress. Enfin, il a été démontré que les esters de férulate extraits des racines de *Kalanchoe daigremontiana* possédaient une activité allélopathique (Nair et al. 1988).

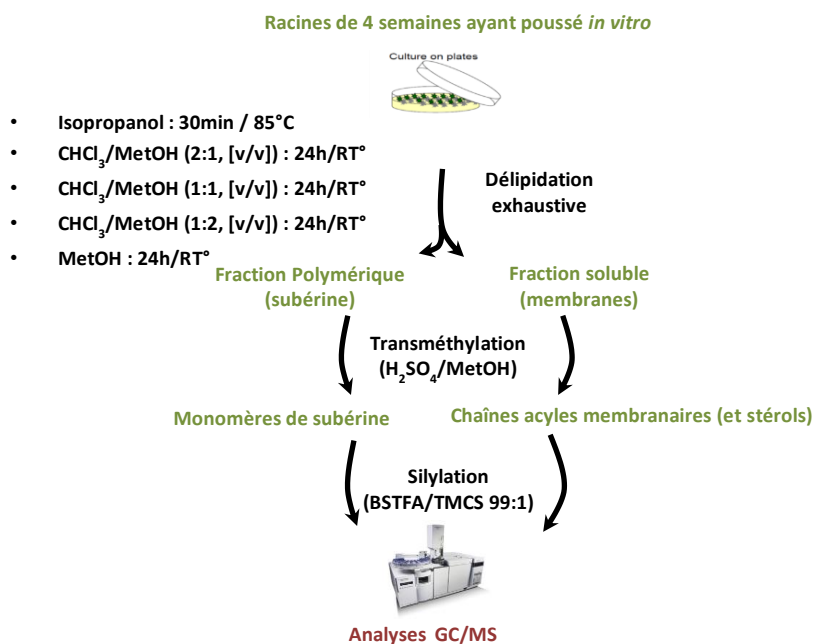
Il a aussi été proposé que les tissus subérisés des racines primaires pouvaient servir de protection contre les pathogènes et les composés toxiques présents dans la rhizosphère (Hose et al. 2001). Des analyses réalisées sur des racines de soja ont mis en évidence une corrélation positive entre la quantité de subérine et la résistance au champignon *Phytophthora sojae* (Thomas et al. 2007). Il a aussi été suggéré que les composés aromatiques et aliphatiques de la subérine pouvaient avoir des rôles différents. Lors de la reformation du périderme des tubercules, le dépôt important des composés aromatiques les deux premiers jours après blessure s'avère efficace pour la résistance aux attaques bactériennes. De même, la résistance à un pathogène fongique semble corrélée de manière positive avec le dépôt des composés aliphatiques (Lulai and Corsini, 1998). Les cires associées à la subérine contiennent principalement des alkyl hydroxycinnamates qui pourraient jouer un rôle dans la résistance aux pathogènes. En effet, des études ont rapporté un rôle antibactérien des alcools gras (Masao et al. 1987; Togashi et al. 2007). Similairement, les alkyl hydroxycinnamates, et plus

particulièrement les alkyl coumarates et caféates ont une activité antibactérienne envers *Pseudomonas fluorescens* (Baranowski and Nagel, 1982).

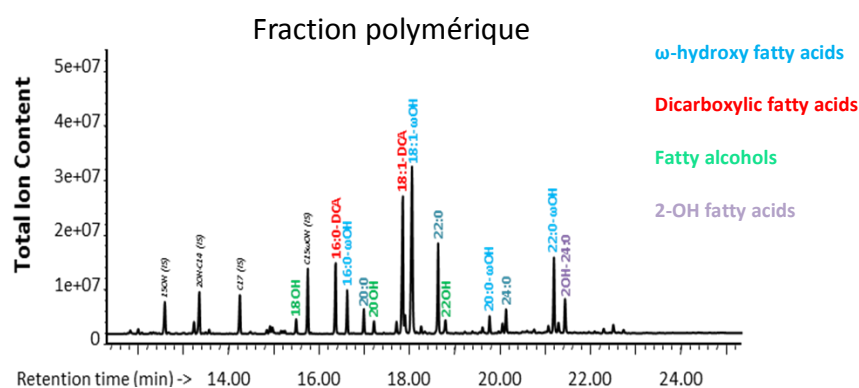
6 - REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE LA SUBERINE

Le dépôt de la subérine dans des tissus spécifiques au cours du développement des plantes ainsi qu'en réponse à des stimuli environnementaux implique une régulation précise du processus de subérisation. Les domaines d'expression des gènes de biosynthèse de la subérine co-localisent avec les sites de déposition de la subérine indiquant un contrôle spatial de la transcription de ces gènes. Plusieurs gènes de biosynthèse de la subérine sont induits par des stress connus pour augmenter le dépôt de subérine. Par exemple, le niveau de transcrits des 3 *FARs* (voir section IV - 1 - 4) et de *KCS2/DAISY* est augmenté sous l'effet d'un stress salin et d'une blessure (Domergue et al. 2010; Franke et al. 2009). Des facteurs de transcription avec des domaines de type WRKY, NAC et MYB ont des profils d'expression coïncidant avec des sites de dépôt de la subérine (Ranathunge et al. 2011). Récemment, une étude a montré que la surexpression du facteur de transcription d'*Arabidopsis MYB41* induit la formation de subérine dans la paroi des cellules des feuilles (Kosma et al. 2014). Ce dépôt ectopique de subérine s'accompagne d'une augmentation de la quantité de transcrits des gènes de biosynthèse de la subérine dans les feuilles des plantes surexprimant *MYB41*. Le niveau de transcrits de gène de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et de la lignine est également plus important dans les plantes surexprimant *MYB41*. La biosynthèse et la régulation des domaines aliphatique et aromatique de la subérine semblent donc étroitement liées. Cependant *MYB41* est exprimé seulement en réponse à des stress abiotiques, comme un stress salin, ce qui suggère que d'autres facteurs de transcription doivent intervenir pour réguler la déposition de la subérine au cours du développement.

A



B



C

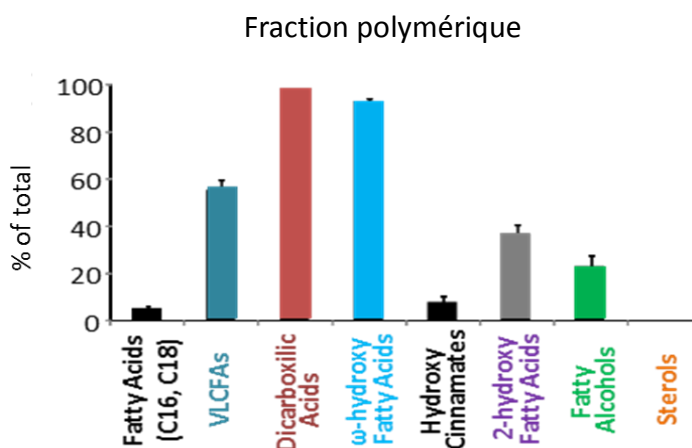


Figure 19 : Partition des chaînes acyles de la racine d'Arabidopsis. (A) Protocole suivi pour obtenir les fractions soluble et polymérique des racines. (B) Chromatogrammes obtenus par GC/MS de la fraction polymérisée. IS, Internal Standard. (C) Pourcentage des lipides et des composés phénoliques totaux retrouvés dans la fraction polymérique de racines de plantes sauvages (Col-0) ayant poussé quatre semaines *in vitro*. (n = 3-4). D'après Vishwanath et al. 2013.

7 - OBJECTIFS DE LA THESE

Mon travail de thèse sur la subérine chez *Arabidopsis thaliana* s'est articulé autour de deux objectifs principaux, la recherche de protéines impliquées dans le transport des précurseurs de subérine, et la caractérisation des alcools gras de la fraction soluble des racines.

Caractérisation des alcools gras de la fraction soluble des racines chez *Arabidopsis thaliana*

Le polymère de subérine des racines peut être séparé des autres lipides racinaires grâce des étapes successives de délipidation avec des solvants (isopropanol, chloroforme, méthanol) permettant d'éliminer les lipides membranaires ainsi que les composés aliphatiques et aromatiques de la subérine non-covalamment liés au polymère (Figure 19A). Dans l'étude de Vishwanath et ses collaborateurs (2013), notre groupe avait analysé la répartition des lipides de racine, et notamment des alcools gras, entre la fraction polymérique (contenant les monomères du polymère de subérine) et la fraction soluble (regroupant les lipides et les composés non polymérisés extraits lors des étapes de délipidation) (Figure 19). Ces analyses avaient été faites sur des plantules d'*Arabidopsis* de quatre semaines ayant poussé sur boîte. Les résultats de ces analyses de distribution ont montré que les acides α,ω -dicarboxyliques et les acides ω -hydroxylés, composés typiques du polymère de subérine, étaient principalement retrouvés dans la fraction polymérique. La fraction soluble contenait la totalité des stérols ainsi que la majorité des acides gras (C16 et C18), ce qui était en accord avec le fait que cette fraction contenait l'ensemble des lipides membranaires. Les composés phénoliques étaient également majoritairement retrouvés dans la fraction soluble. Les acides gras à très longue chaîne se répartissaient équitablement entre les deux fractions car ces composés sont retrouvés à la fois dans les lipides membranaires et dans le polymère de subérine. Concernant les alcools gras, seulement 20% étaient polymérisés et plus de 80% retrouvés dans la fraction soluble.

Cette distribution des alcools gras a également été rapportée dans les tissus subérisés d'autres espèces de plantes comme l'oignon, le soja, ou la pomme de terre (Vishwanath et al. 2013). Les alcools gras des fractions solubles de ces espèces composent les cires associées à

la subérine et ils sont sous forme libre ou estérifiée avec des acides hydroxycinnamiques (alkyl-hydroxycinnamates). Cependant, dans le cas de l'étude de Vishwanath et al 2013, des racines d'Arabidopsis de 4 semaines ont été utilisées pour les analyses de subérine. Or, à ce stade, pratiquement aucun composé typique des cires de racines d'Arabidopsis (alcanes, monoacylglycérol, alcools gras, alkyl hydroxycinnamates) n'est détecté après immersion rapide dans un mélange chloroforme/méthanol. De même, après élimination des cires dans des racines de 6 semaines poussées en sol, la fraction non-polymérisée contient toujours la majorité des alcools gras des racines (Vishwanath et al. 2013). Au vu de ces résultats, il se pouvait que les alcools gras de la fraction soluble représentent des cires associées à la subérine mais non extractibles par une rapide immersion dans du chloroforme. Les alcools gras de cette fraction soluble pouvaient être sous forme libre et/ou conjuguée. Une partie de ma thèse a donc consisté à caractériser les alcools gras de la fraction non polymérisée des racines d'Arabidopsis. L'importance des alcools gras dans le métabolisme de la subérine et plus généralement de la subérine dans le métabolisme des lipides au niveau des racines d'Arabidopsis a également été étudiée.

Caractérisation de protéines impliquées dans le transport des précurseurs de la subérine.

Une partie de ma thèse a consisté à identifier des acteurs impliqués dans le transport des monomères de subérine. Si plusieurs mécanismes de transport avaient été suggérés, aucun n'avait été mis en évidence au commencement de ma thèse. J'ai choisi de me focaliser sur des candidats de type ABC transporteurs et LTPs. En effet, comme je l'ai dit en introduction des protéines de ces familles multigéniques avaient déjà été identifiées comme participant à l'export des précurseurs de la cutine, des cires cuticulaires et de la sporopollénine. La cutine et la subérine ont une composition et des fonctions assez proches et la synthèse des précurseurs de ces polymères lipidiques fait intervenir des protéines appartenant aux mêmes familles d'enzymes. Il paraît donc logique que des protéines de type ABC transporteurs et LTPs puissent être impliquées dans l'export des précurseurs de la subérine.

Avant le début de ma thèse, fin 2012, aucun ABCG transporteur impliqué dans l'export des précurseurs de la subérine n'avait été identifié chez les plantes. Néanmoins, au cours de ma thèse, plusieurs travaux sur la caractérisation d'ABCG transporteurs requis pour l'export

de la subérine ont été publiés. Chez le riz (*Oriza sativa*), la subérisation de l'hypoderme en condition d'hypoxie requiert un ABCG transporteur, OsABCG5 (Shiono et al. 2014). De même, il a été montré que le transporteur ABCG1 est impliqué dans l'export des composés de la subérine du périoderme de la pomme de terre (Landgraf et al. 2014). Chez Arabidopsis, Yadav et ses collaborateurs (2014) ont montré que le triple mutant *abcg2 abcg6 abcg20* présentait des altérations au niveau de la composition, des propriétés et de la structure de la subérine. Deux ABCG transporteurs présentés dans cet article faisaient partie des trois candidats retenus dans le cadre de ma thèse. Les travaux effectués durant ma thèse ont ainsi confirmé de nombreux résultats publiés dans cette étude. Néanmoins, ils ont aussi permis de caractériser un nouveau transporteur impliqué dans l'export des précurseurs de la subérine. Les travaux réalisés sur les LTPs sont aussi inclus dans ce manuscrit même s'ils n'ont pas été très concluants en partie du fait que nous nous sommes davantage concentrés sur les ABCG transporteurs.

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

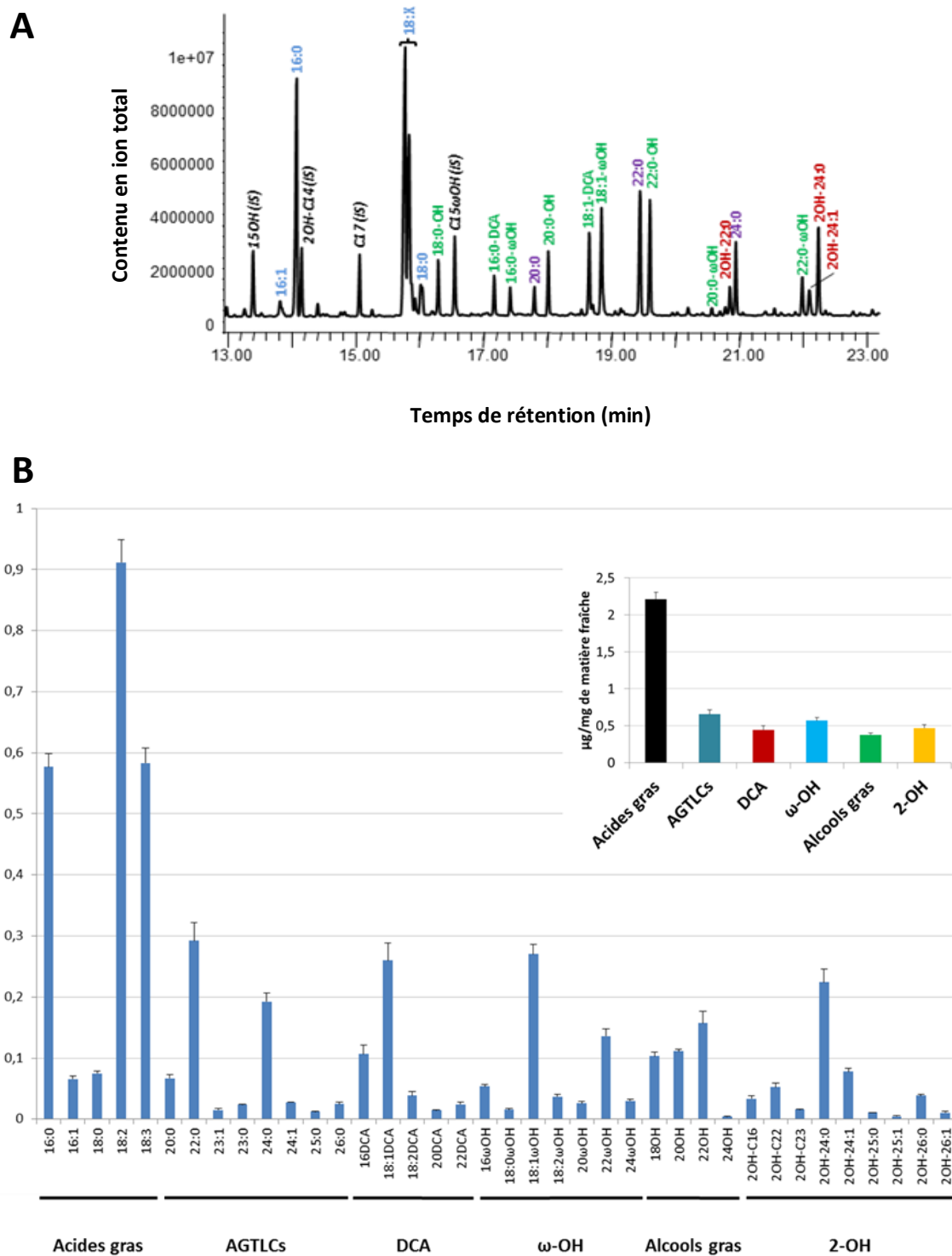


Figure 1 : Analyse globale par GC-MS des chaînes acyles de racines *d'Arabidopsis thaliana* (Col-0) ayant poussé quatre semaines *in vitro*. (A) Chromatogramme obtenu par GC-MS après transméthylation directe des racines. IS, internal standard. (B) Quantités détaillées par classes de composés aliphatiques (n = 4). AGTLCs, acides gras à très longue chaîne; DCA, acides gras α,ω -dicarboxyliques; ω -OH, acides gras ω -hydroxylés; 2-OH, acides 2-hydroxylés.

Chapitre 2 - Partie 1 : Distribution des chaînes acyles dans les racines d'Arabidopsis.

Dans l'article de Vishwanath et ses collaborateurs (2013), les auteurs ont étudié la distribution des alcools gras entre la fraction polymérique et la fraction soluble de racines de plantes ayant poussé quatre semaines *in vitro*. Seulement 20% de la totalité des alcools gras font partie du polymère de subérine, alors que 80% sont trouvés dans la fraction soluble. Une autre interprétation de ces résultats suggère qu'une proportion relativement importante des chaînes acyles de la racine est destinée à la synthèse de la subérine. Afin d'avoir une idée plus précise de la part du métabolisme lipidique destinée à la biosynthèse de la subérine, une analyse globale des chaînes acyles de la racine a été réalisée. Une étude au cours du développement de la racine a également été menée afin de suivre l'évolution de la part du métabolisme des lipides destinée à la subérine. La quantité et la composition de la subérine de racines de plantes ayant poussé *in vitro* et en terre ont également été étudiées.

1 - Analyse globale des chaînes acyles de la racine

L'analyse globale des chaînes acyles a tout d'abord été faite sur des racines de plantes ayant poussé quatre semaines *in vitro*. Afin d'analyser l'ensemble des chaînes acyles, les racines récoltées sont séchées puis directement transméthylées sans étape de délipidation préalable. Les composés obtenus par transméthylation sont ensuite dérivatisés et analysés par GC-MS comme dans une analyse classique de subérine. Comme le montre la Figure 1A, tous les composés majeurs de la subérine (acides gras ω -hydroxylés et α,ω -dicarboxyliques, AGTLCs en C20 et C22) sont détectés par ce type d'approche. Néanmoins, les acides gras classiques (16:0, 16:1, 18:0 et 18:X), qui représentent les lipides de toutes les membranes de la racine, correspondent aux pics majoritaires. Il faut aussi noter que les acides gras à très longue chaîne et les alcools gras représentent également des composés abondants. Enfin, les acides gras 2-hydroxylés à très longue chaîne, provenant des sphingolipides, représentent aussi une proportion non négligeable des chaînes acyles.

Ce type d'analyse nous a permis d'identifier et de quantifier 38 composés aliphatiques différents dont 16 sont spécifiques de la subérine (Figure 1B). Tous ces composés sont les mêmes que ceux présents dans les fractions polymérisée et soluble décrites par Vishwanath et ses collaborateurs (2013). Les acides gras classiques représentent environ la moitié de la totalité et les autres classes (acides gras ω -hydroxylés, acides gras α,ω -dicarboxyliques, acides

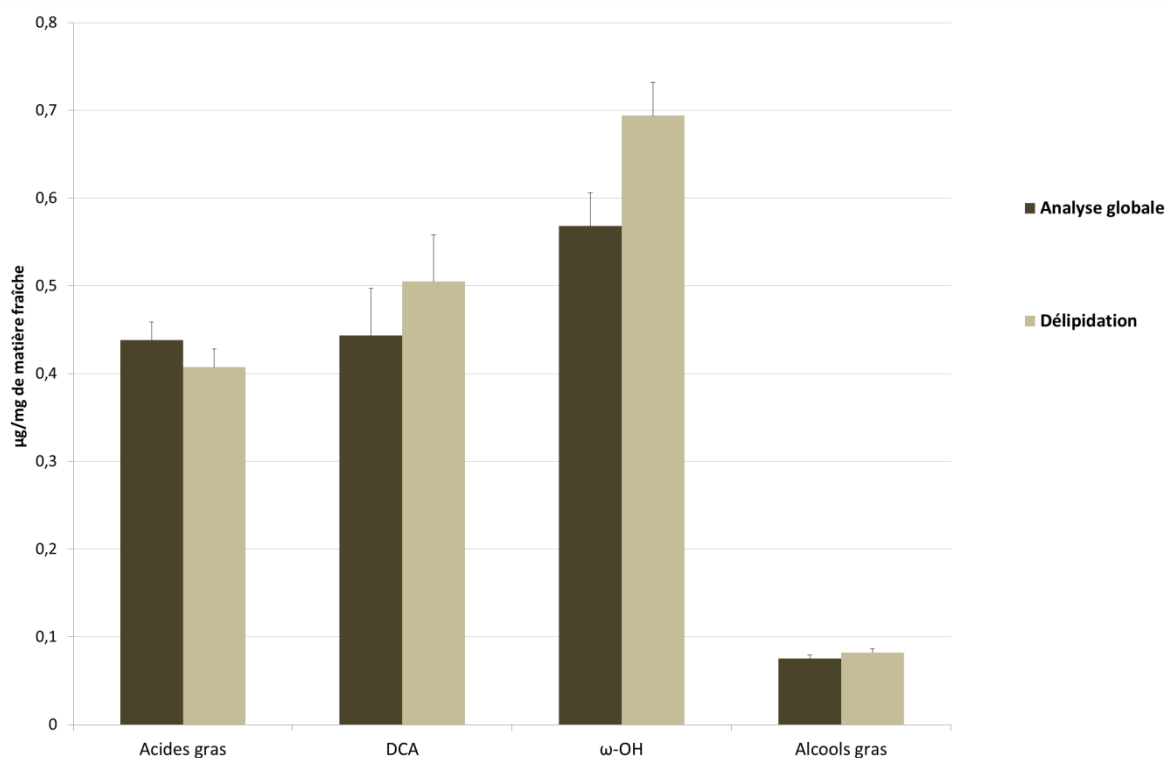


Figure 2 : Quantités de chaînes acyles dérivant du polymère de subérine calculées suite à une analyse globale ou obtenues après délipidation. DCA, acides gras α,ω -dicarboxyliques ; ω -OH, acides gras ω -hydroxylés. (n=4).

gras à très longue chaîne, alcools gras et acides 2-hydroxylés) représentent chacune entre 8 et 14 % de la totalité des chaînes acyles (insert Figure 1B). Si la totalité des alcools gras fait partie intégrante de la subérine, ces composés représentent alors des composants majeurs de la subérine puisqu'ils sont aussi abondants que les acides gras α,ω -dicarboxyliques (environ 9% du total).

Les quantités de lipides provenant du polymère de subérine ont ensuite été calculées en se basant sur les résultats de partition entre le polymère et la fraction soluble reportés dans l'étude de Vishwanath et al. 2013 (Voir chapitre I, figure 19). Il a été convenu que l'ensemble des acides gras α,ω -dicarboxyliques et des acides gras ω -hydroxylés, 5% des acides gras, 50% des acides gras à très longue chaîne, et 20% des alcools gras issus d'une analyse globale faisaient partie du polymère de subérine. Les quantités ainsi calculées ont été comparées avec celles obtenues suite à une délipidation classique (Figure 2). Les acides gras ω -hydroxylés sont les composés majoritaires du polymère que ce soit en analyse globale (0,57 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière fraîche) ou par analyse après délipidation (0,69 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière fraîche). De même, les alcools gras représentent les monomères minoritaires dans les deux conditions d'analyse avec moins de 0,10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matériel frais. Les quantités d'acides gras α,ω -dicarboxyliques et d'acides gras calculées à partir de l'analyse globale sont similaires (0,44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matériel frais). La quantité d'acides gras α,ω -dicarboxyliques obtenue après délipidation (0,50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matériel frais) est légèrement plus élevée que la quantité d'acides gras (0,41 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Même si de légères variations de quantité des monomères du polymère de subérine ont pu être constatées, les résultats obtenus par analyse globale sont du même ordre que ceux obtenus par partition. Il semble donc possible d'étudier la composition du polymère de subérine par transméthylation directe des racines, en évitant ainsi les longues étapes de délipidation.

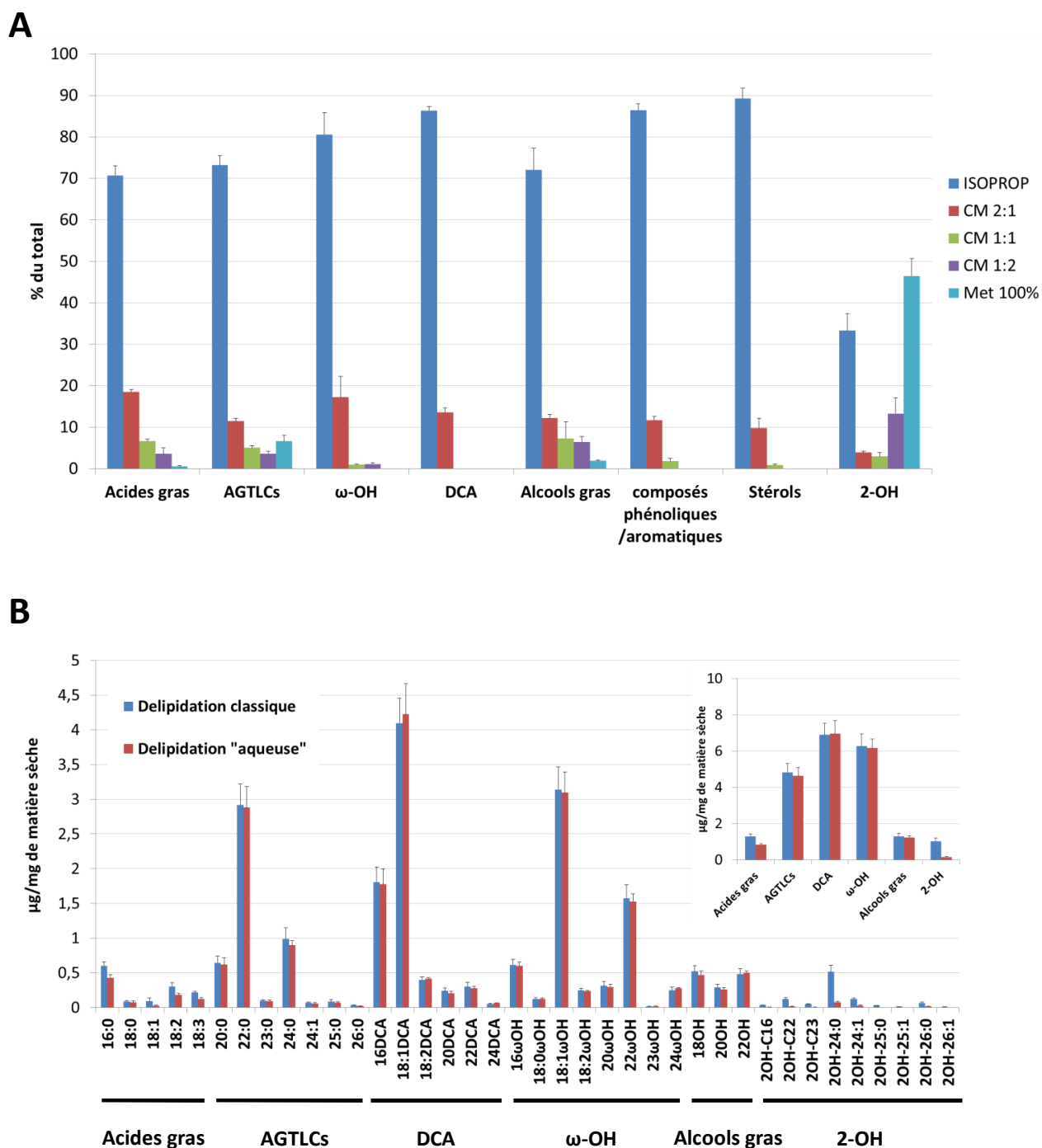


Figure 3 : Distribution des différentes classes de chaînes acyles. (A) Répartition des chaînes acyles pour chaque fraction lors des différentes étapes de délipidation. Les extractions ont été faites en séquentiel. ISOPROP, isopropanol ; C, chloroforme ; Met, méthanol ; proportion en [v/v]. Les pourcentages ont été calculés sur la base de la masse (μg) par unité de matière sèche (mg). (B) Quantité de chaînes acyles obtenues après délipidation classique ou « aqueuse » des racines. Les analyses ont été faites à partir de racines d'*Arabidopsis* ayant poussé quatre semaines *in vitro*. AGTLCs, acides gras à très longue chaîne ; DCA, acides gras α,ω -dicarboxyliques ; ω -OH, acides gras ω -hydroxylés ; 2-OH, acides 2-hydroxylés. ($n=4$).

2 - Partition des chaînes acyles de la racine

Afin d'évaluer la part des chaînes acyles dédiée à la synthèse de la subérine, nous avons étudié la distribution de l'ensemble des chaînes acyles dans la racine.

2 - 1 - Cas des acides 2-hydroxylés

D'après la littérature, les chaînes acyles n'appartenant pas au polymère de subérine sont contenues principalement dans les membranes sous forme de glycérolipides. Les acides 2-hydroxylés font eux partie des sphingolipides qui sont des constituants majoritaires de la membrane plasmique (Buré et al. 2014). Cependant, l'étude de Vishwanath et ses collaborateurs (2013) a montré que si 60% des acides 2-hydroxylés sont retrouvés dans la fraction soluble, 40% sont détectés dans la fraction polymérique. De plus de nombreux articles de la littérature mentionnent ce type de composés dans la composition des polymères lipidiques des plantes (Franke et al. 2005). Afin de déterminer si ces acides 2-hydroxylés font ou non partie du polymère de subérine, nous avons quantifié les chaînes acyles obtenues au cours des différentes étapes de délipidation. Comme le montre la Figure 3A, environ 90% de tous les types de composés, à l'exception des acides 2-hydroxylés, sont solubilisés après les étapes de délipidation à l'isopropanol et au chloroforme méthanol 2:1 (v/v). A l'inverse, les acides 2-hydroxylés sont eux principalement solubilisés par le méthanol qui est le solvant le plus polaire utilisé lors de la délipidation. Il serait donc possible que les acides 2-hydroxylés ne soient pas totalement éliminés par les solvants utilisés lors des étapes de délipidation. Nous avons ensuite quantifié les chaînes acyles présentes dans la fraction polymérique après avoir ajouté des étapes d'extraction aqueuse et saline (NaCl 2M) lors de la délipidation, comme il est généralement fait pour délipider le manteau de la graine. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec une délipidation «classique». Plus de 85% des acides 2-hydroxylés sont éliminés de la fraction polymérique avec une délipidation « aqueuse » alors que les quantités des autres composés ne sont pas modifiées par rapport à une délipidation « classique » (Figure 3B).

Ces résultats confirment donc que les acides 2-hydroxylés trouvés dans la fraction polymérique ne font pas partie du polymère de subérine. Il est très probable que ces composés soient impliqués dans la formation des sphingolipides hautement glycosylés (GIPC) qui, du fait de leur tête hautement polaire, ne sont pas totalement éliminés de la fraction polymérique lors des étapes de délipidation reposant sur l'utilisation du chloroforme et du méthanol.

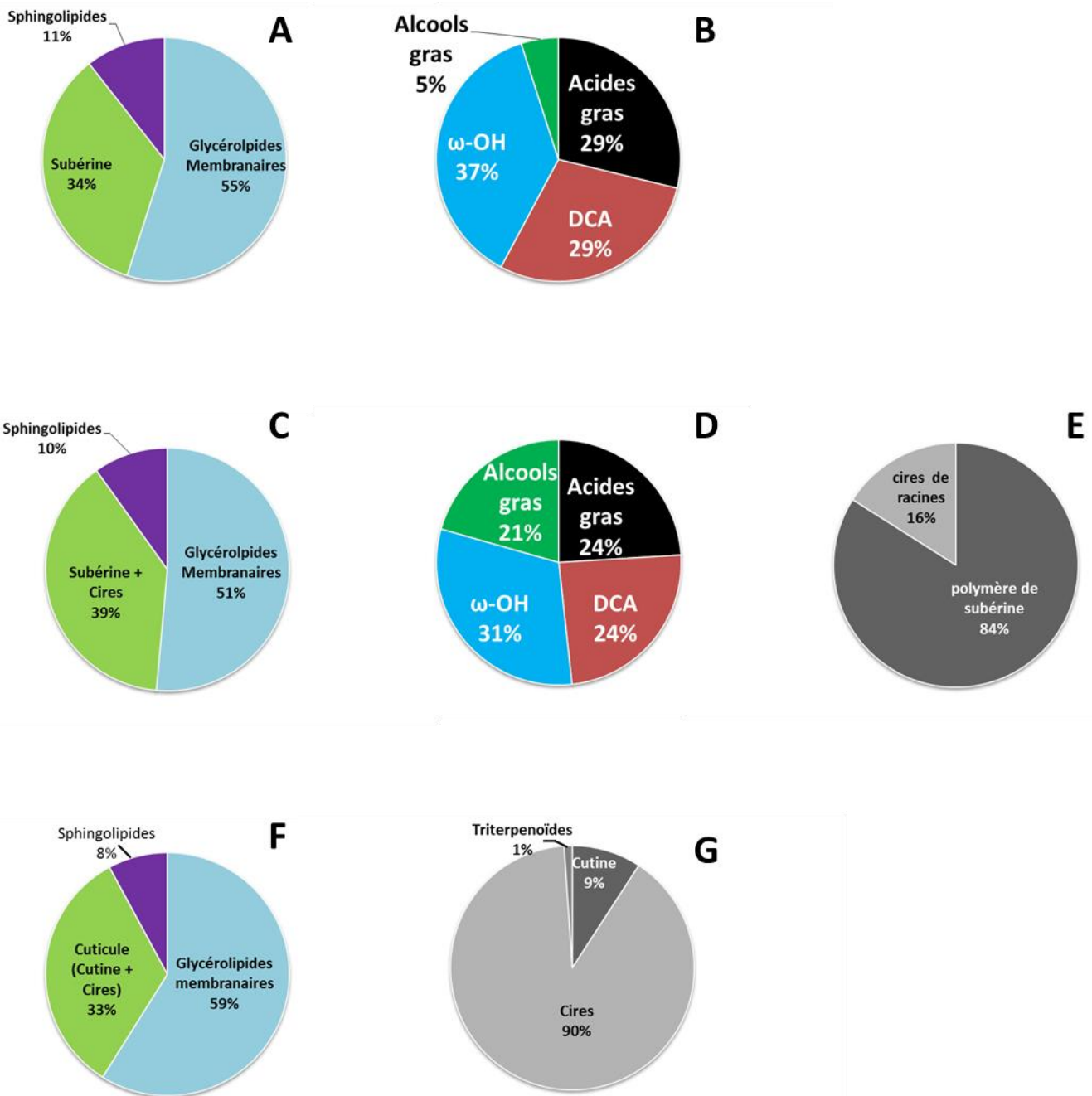


Figure 4 : Distribution des chaînes acyles dans les racines d'Arabidopsis (Col-0) ayant poussé quatre semaines *in vitro* et dans les tiges d'Arabidopsis (Col-0) ayant poussé sept semaines en terre. (A, C, F) Répartition de la totalité des chaînes acyles dans la racine sans (A) ou avec (C) les alcools gras solubles et dans les tiges (F). (B, D) Composition de la subérine sans (B) ou avec (D) les alcools gras solubles. (E, G) Proportion des chaînes acyles entre le polymère et les cires dans la subérine (E) et la cuticule (G). DCA, acides gras α,ω -dicarboxyliques ; ω -OH, acides gras ω -hydroxylés. Les pourcentages ont été calculés sur la base de la masse (μg) par unité de matière sèche (mg).

2 - 2 - Quantification et distribution des chaînes acyles dans la racine

La distribution des chaînes acyles entre les glycérolipides des membranes, les sphingolipides et le polymère subérine a ensuite été évaluée. Pour cela, il a été considéré que la subérine est constituée de la totalité des acides gras ω -hydroxylés et α,ω -dicarboxyliques, de 5% des acides gras, de 50% des acides gras à très longue chaîne et de 20% des alcools gras issus d'une analyse globale. Suite aux résultats des analyses présentées en Figure 3, nous avons supposé que les sphingolipides sont représentés par la totalité des acides 2-hydroxylés. Les chaînes acyles restantes, excepté les alcools gras restant, ont été associées aux glycérolipides membranaires. Avec ces calculs, la majorité (55 %) des chaînes acyles de la racine constituent les glycérolipides membranaires alors que les sphingolipides ne comptent que pour 11 % du total (Figure 4A). Le polymère de subérine représente néanmoins environ 34 % de la totalité des chaînes acyles des racines de plantes ayant poussé quatre semaines *in vitro*. Au niveau de la composition du polymère, les acides gras ω -hydroxylés sont majoritaires (37 % du total), alors que les acides gras non-substitués et α,ω -dicarboxyliques comptent chacun pour 29 % du total (Figure 4B). Avec ces calculs, les alcools gras représentent seulement 5 % de la totalité des chaînes acyles composant le polymère de subérine.

Dans un scénario où les alcools gras de la fraction soluble seraient associés au polymère de subérine sous forme de cires solubles par exemple, les alcools gras représenteraient alors 21 % des chaînes acyles de la subérine (Figure 4D). De plus, le polymère de subérine compterait alors pour plus de 39 % de l'ensemble des chaînes acyles de la racine (Figure 4C). Dans cette hypothèse, les cires ne représenteraient néanmoins que 16 % des chaînes acyles de la subérine (Figure 4E), le polymère représentant donc la composante majoritaire de cette barrière lipidique.

Afin de comparer la distribution des chaînes acyles au niveau des racines et des tiges, le même type d'analyse a été fait sur des tiges de plantes sauvages (Col-0) de 7 semaines. Les cires cuticulaires ont d'abord été extraites par immersion rapide des tiges dans du chloroforme. Les tiges ont ensuite été directement transméthylées afin de quantifier les lipides solubles et les monomères typiques du polymère de cutine. Comme pour les racines, les différentes fractions ont été dérivatisées au BSFTA avant d'être analysées par GC-MS. Les résultats obtenus montrent que la distribution des chaînes acyles dans la tige ressemble fortement à celle des racines. En effet, 33 % de la totalité des chaînes acyles sont destinés à la

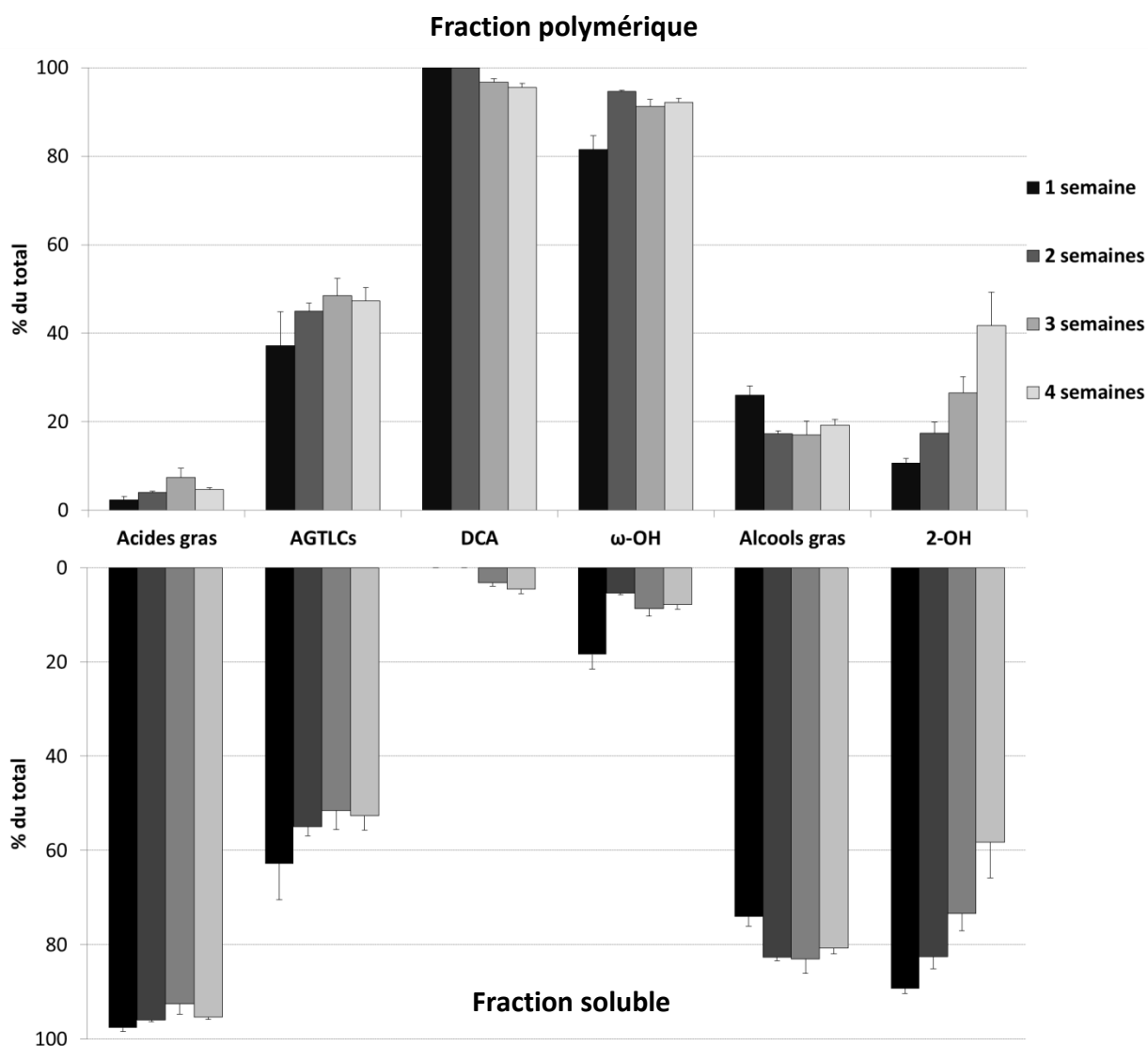


Figure 5 : Distribution des chaînes acyles entre la fraction polymérique et la fraction soluble de racines de plantes sauvages (Col-0) de une à quatre semaines ayant poussé *in vitro*. AGTLCs, acides gras à très longue chaîne ; DCA, acides gras α,ω -dicarboxyliques ; ω -OH, acides gras ω -hydroxylés ; 2-OH, acides 2-hydroxylés. Les pourcentages ont été calculés sur la base de la masse (μg) par unité de matière sèche (mg). (n=4).

synthèse de la cuticule (Figure 4F). La proportion de chaînes acyles dédiée aux sphingolipides et aux glycérolipides membranaires (8 % et 59 % respectivement) est proche de celle des racines. En revanche, la majorité des chaînes acyles de la cuticule (90 %) correspond aux cires cuticulaires (Figure 4G), alors que dans le cas de la subérine c'est le polymère qui contient la majorité des chaînes acyles (84 %).

3 - Partition des chaînes acyles de la racine au cours du développement de la racine

Afin de suivre l'évolution de la part du métabolisme de la subérine au cours du développement de la racine, des plantes ont poussé *in vitro* pendant quatre semaines et chaque semaine des racines ont été récoltées. La partition et la composition de la subérine pouvant changer en fonction du stade de développement, ces analyses n'ont pas été faites par analyse globale. Les racines ont donc été délipidées et les fractions polymériques et solubles analysées par GC-MS. La distribution des chaînes acyles entre la fraction polymérique et la fraction soluble a pu être calculée pour chaque stade de développement (Figure 5). La partition des différentes chaînes acyles est assez semblable de une à quatre semaines excepté pour les sphingolipides. En effet, la proportion de sphingolipides de la fraction polymérisée augmente au cours du développement. Cela est probablement dû à une augmentation du nombre de sphingolipides complexes (GIPC) qui ont tendance à ne pas être éliminés lors des étapes de délipidation. Ces résultats indiquent néanmoins que les coefficients utilisés pour estimer les quantités de chaînes acyles vouées à la synthèse de la subérine à 4 semaines (la subérine comprenant 100 % des acides gras α,ω -dicarboxyliques et ω -hydroxylés, 5 % des acides gras, 50 % des acides gras à très longue chaîne, et 20 % des alcools gras) à partir d'une analyse par transméthylation directe des racines sont donc valables aux semaines une à quatre.

La quantité totale de subérine a ensuite été calculée au cours des quatre semaines de développement (Figure 6A). La quantité augmente au cours du développement, atteignant à quatre semaines environ 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matériel frais de racines. La quantité totale étant déjà d'environ 1,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matériel frais à une semaine, la synthèse de la subérine semble néanmoins très forte dès les premiers jours de développement de la racine.

La distribution de l'ensemble des chaînes acyles dans la racine a aussi été étudiée chaque semaine. La proportion de chaînes acyles de la racine dédiées au polymère de subérine

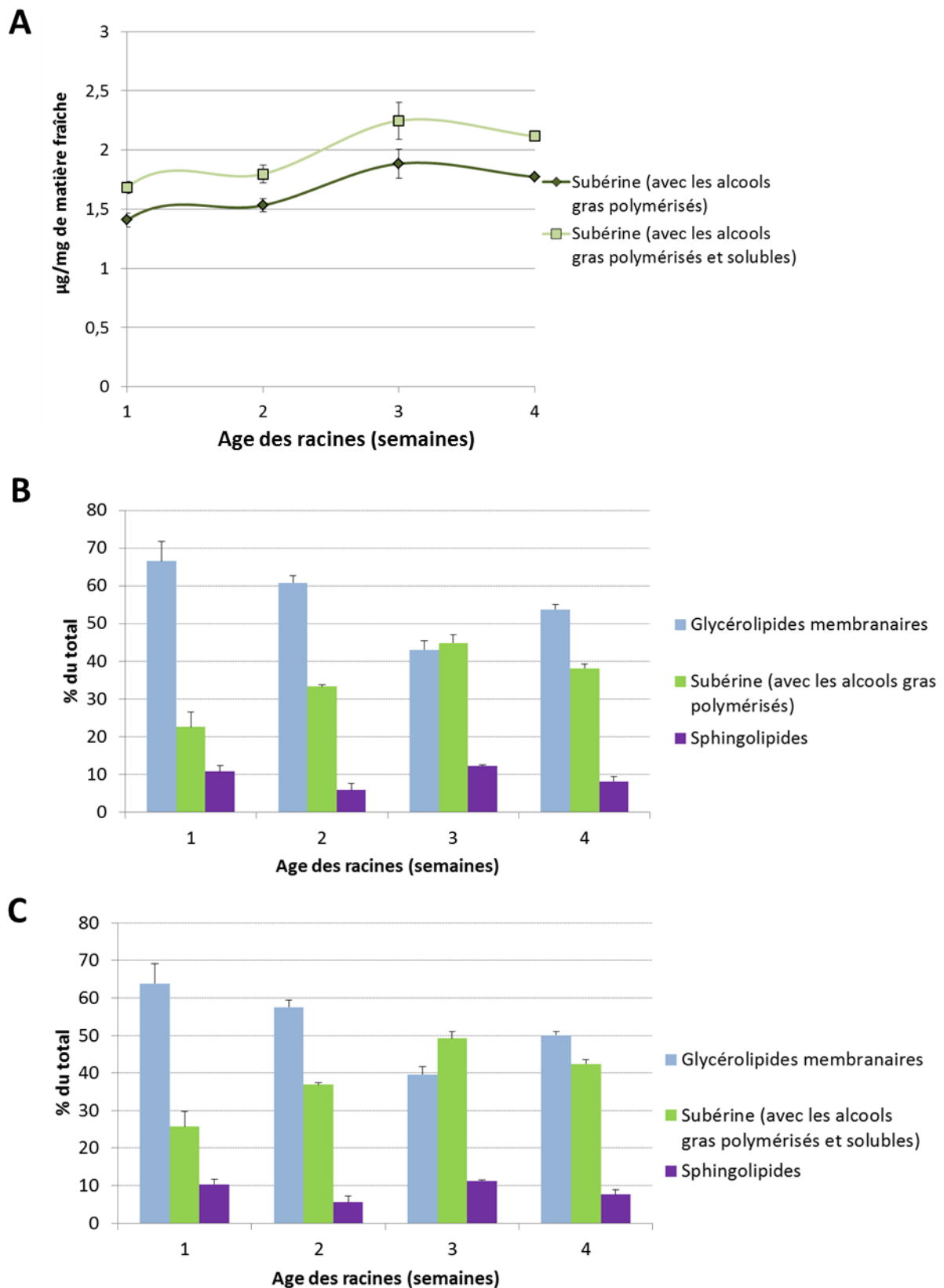


Figure 6 : Quantité de subérine et distribution des chaînes acyles au cours du développement (une à quatre semaines) de racines de plantes sauvages (Col-0) ayant poussé *in vitro*. (A) Quantité de subérine avec ou sans les alcools gras solubles en mg/µg de matière fraîche. (B, C) Distribution des chaînes acyles de la racine avec (C) ou sans (B) les alcools gras solubles pris en compte dans la subérine. Les pourcentages ont été calculés sur la base de la masse (µg) par unité de matière sèche (mg). (n=4).

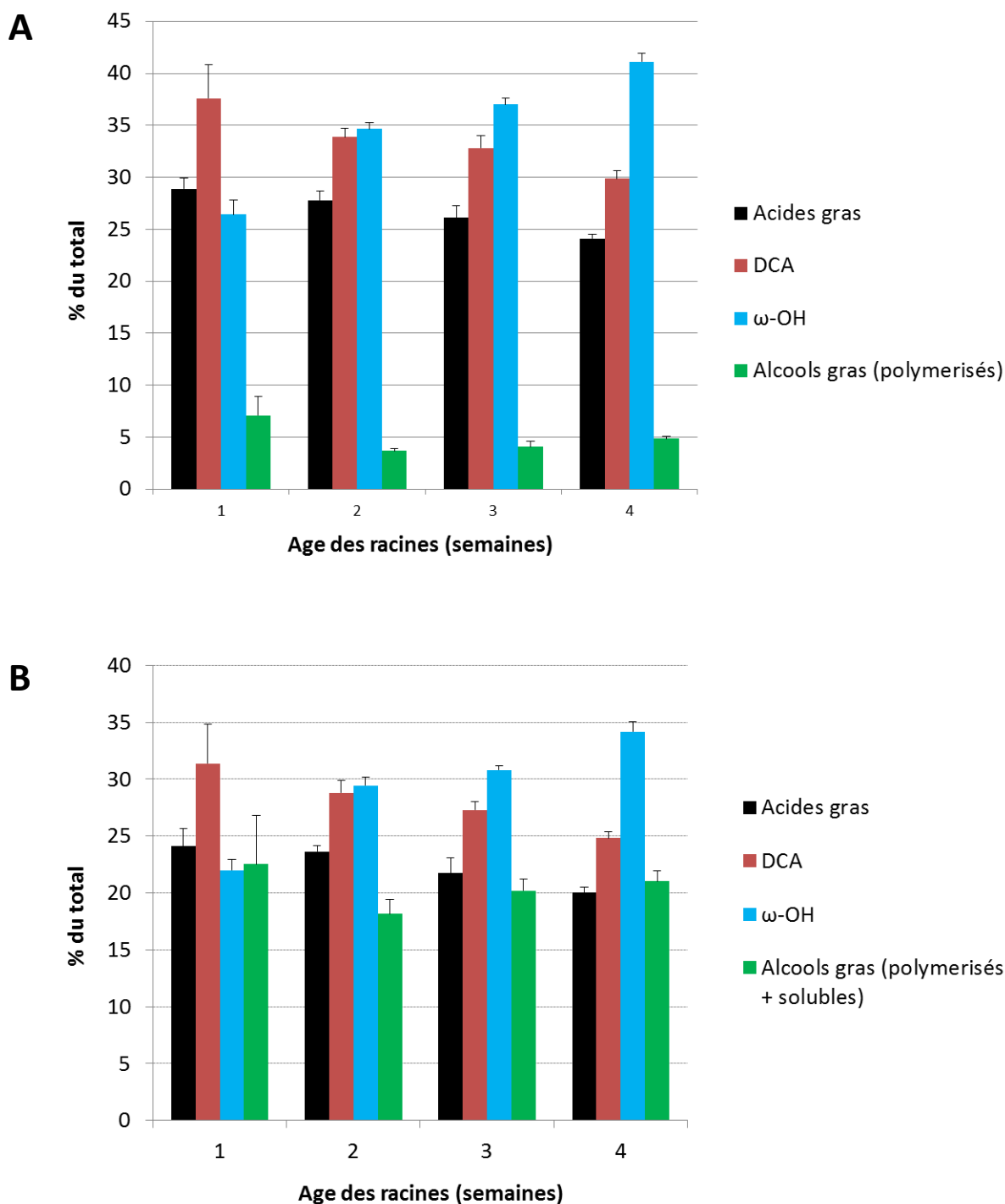


Figure 7 : Composition en chaînes acyles de la subérine de racines de plantes sauvages (Col-0) ayant poussé *in vitro* sur une période d'une à quatre semaines. Les alcools gras solubles ont été (B) ou n'ont pas été (A) pris en compte dans les calculs déterminant la composition globale de la subérine. Les pourcentages ont été calculés sur la base de la masse (μg) par unité de matière sèche (mg). DCA, acides gras α,ω -dicarboxyliques ; ω -OH, acides gras ω -hydroxylés. (n=4).

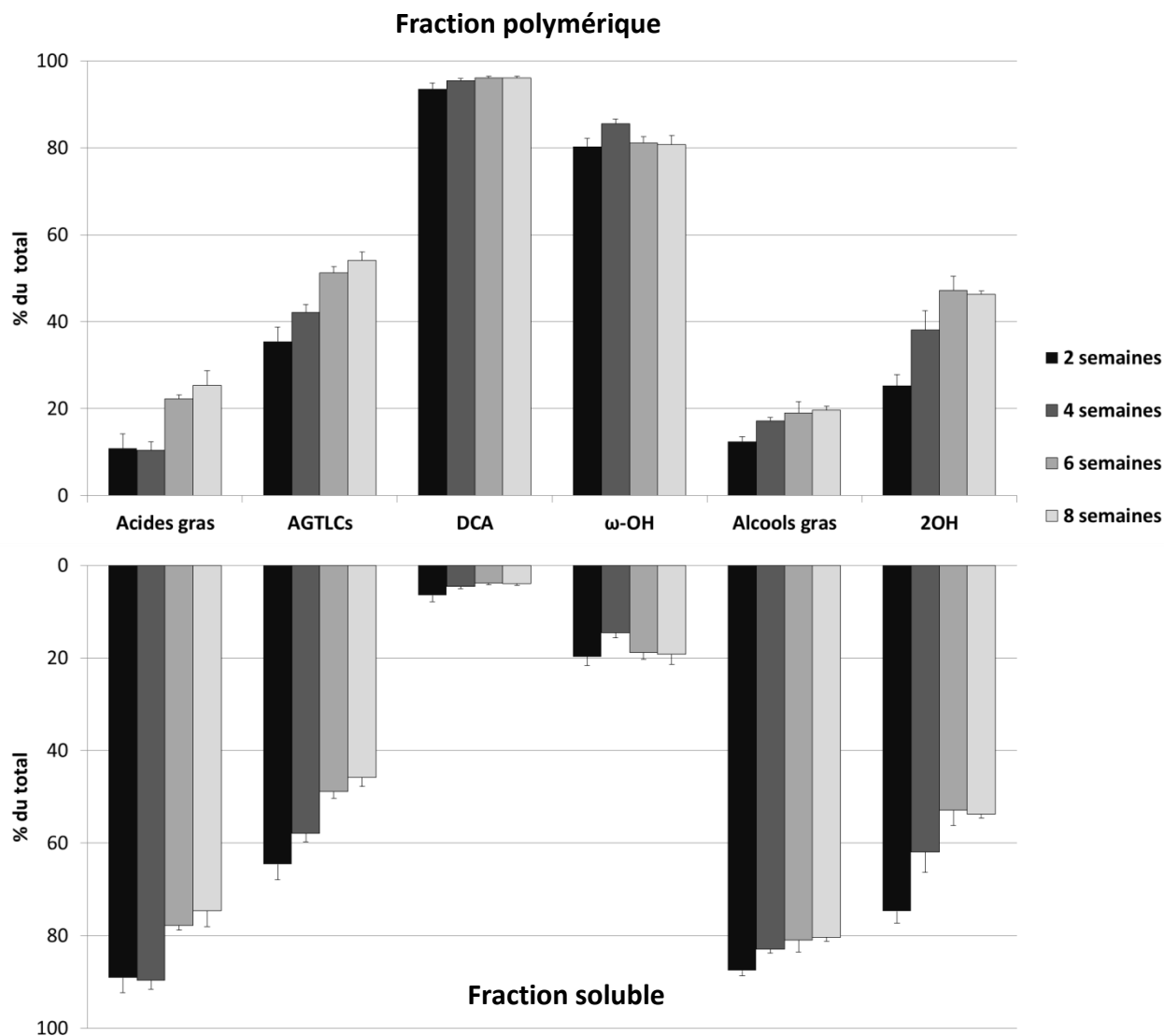


Figure 8 : Distribution des chaînes acyles entre la fraction polymérique et la fraction soluble de racines de plantes sauvages (Col-0) de deux à huit semaines ayant poussé en terre. Les pourcentages ont été calculés sur la base de la masse (μg) par unité de matière sèche (mg). AGTLCs, acides gras à très longue chaîne; DCA, acides gras α,ω -dicarboxyliques ; ω -OH, acides gras ω -hydroxylés ; 2-OH, acides 2-hydroxylés. (n=4).

est d'environ 20 % dans des racines d'une semaine et atteint 40 % à trois semaines (Figure 6B). La proportion de chaînes acyles constituant les glycérolipides formant les membranes diminue au cours du développement de la racine alors que celle des sphingolipides est assez stable. Si le fait d'inclure les alcools gras solubles dans les chaînes acyles de la subérine augmente d'environ 20% la quantité totale de subérine (Figure 6A), cela ne modifie pas de façon significative la distribution globale des chaînes acyles dans la racine (Figure 6C).

Les proportions de chaque classe de composés aliphatiques appartenant à la subérine ont aussi été évaluées au cours du développement de la racine (Figure 7). A une semaine, les acides gras non substitués, les acides gras α,ω -dicarboxyliques et les acides gras ω -hydroxylés représentent chacun environ 30 % de la totalité des chaînes acyles de la subérine (Figure 7A). Une diminution de la proportion des acides gras et des acides gras α,ω -dicarboxyliques (5% et 8% respectivement) est ensuite observée entre la première et la quatrième semaine. A l'inverse, une augmentation prononcée de la proportion des acides gras ω -hydroxylés (15%) est à noter au cours du développement. A une semaine, les acides gras ω -hydroxylés ne représentent que 25 % des chaînes acyles constituant la subérine alors qu'au bout de quatre semaines ils représentent 40 % du total. Quel que soit l'âge des racines, les alcools gras ne représentent que 5 % environ du total des chaînes acyles de la subérine (Figure 7A). Néanmoins, si l'on considère que les alcools gras solubles font aussi partie intégrante de la subérine, des variations similaires mais moins importantes sont observées au cours du développement pour les autres composés, et les alcools gras comptent alors environ pour 20% de la totalité des chaînes acyles de la subérine quel que soit le stade de développement (Figure 7B).

Afin d'être plus proche des conditions réelles et de voir l'effet du milieu de culture sur la composition et la quantité de subérine, des analyses similaires ont été faites sur des plantes ayant poussé en terre jusqu'à huit semaines. La répartition des chaînes acyles des racines entre les fractions polymérisées et solubles est similaire à celle observée pour des plantes cultivées *in vitro* (Figure 8). En effet, comme cela a été décrit pour les analyses *in vitro*, les fractions solubles contiennent la majorité des acides gras, des alcools gras et des acides 2-hydroxylés alors que l'essentiel des acides gras α,ω -dicarboxyliques et des acides gras ω -hydroxylés sont contenus dans la fraction polymérique. Dans les deux conditions, pratiquement 100% des acides gras α,ω -dicarboxyliques et seulement 20% des alcools gras sont retrouvés dans la fraction polymérique. Cependant des variations au niveau de la proportion de certains

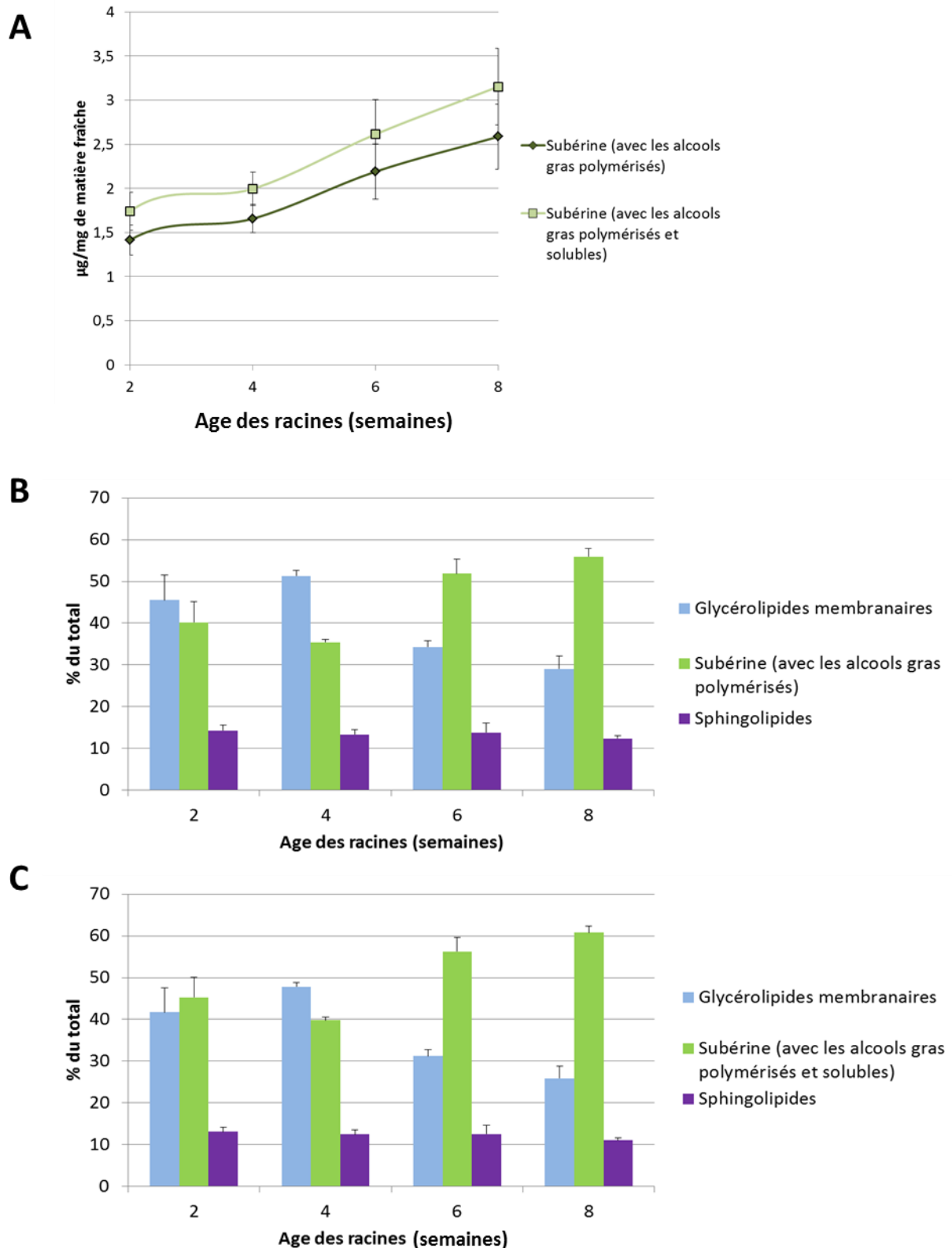


Figure 9 : Quantité de subérine et distribution des chaînes acyles au cours du développement (deux à huit semaines) de plantes sauvages (Col-0) ayant poussé en terre. (A) Quantité de subérine avec ou sans les alcools gras solubles en mg/µg de matière fraîche. (B, C) Distribution des chaînes acyles de la racine avec (C) ou sans (B) les alcools gras solubles pris en compte dans la subérine. Les pourcentages ont été calculés sur la base de la masse (µg) par unité de matière sèche (mg). (n=4).

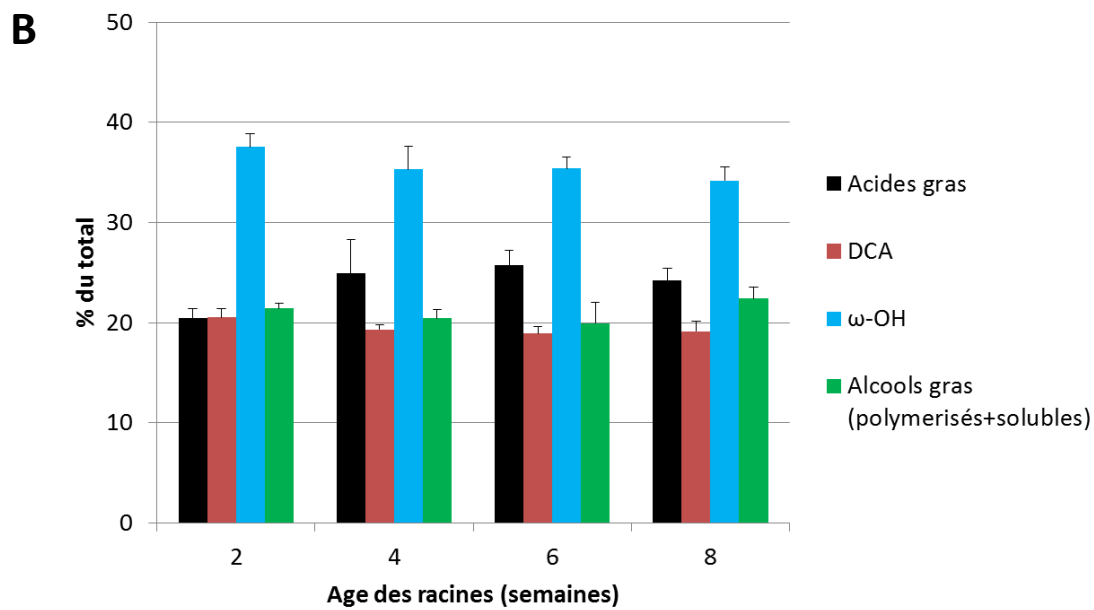
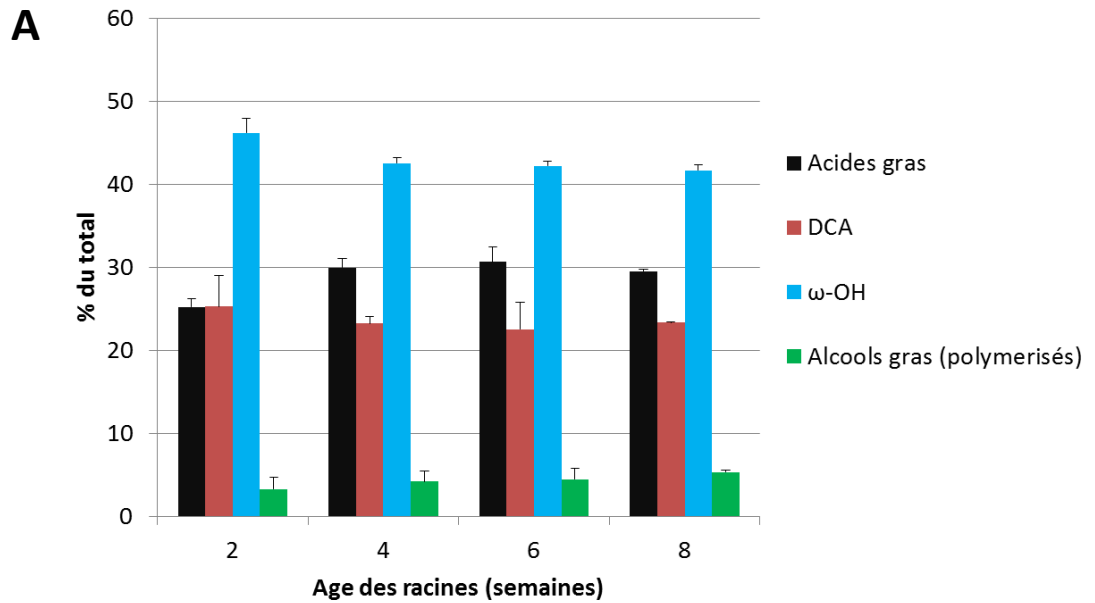


Figure 10 : Composition en chaînes acyles de la subérine de racines de plantes sauvages (Col-0) ayant poussé en terre sur une période de deux à huit semaines. Les alcools gras solubles ont été (B) ou n'ont pas été (A) pris en compte dans les calculs déterminant la composition globale de la subérine. Les pourcentages ont été calculés sur la base de la masse (μg) par unité de matière sèche (mg). DCA, acides gras α,ω -dicarboxyliques; ω -OH, acides gras ω -hydroxylés. (n=4).

composés ont pu être relevées entre les différentes conditions de culture. Alors qu'en condition *in vitro* la proportion des acides gras contenus dans la fraction polymérique des racines est inférieure à 5 % et constante au cours du développement (Figure 5), elle est environ de 10 % dès la deuxième semaine pour les racines de plantes ayant poussé en terre (Figure 8). Cette proportion augmente même jusqu'à 25% à huit semaines. De même, la proportion d'AGTLCs dans la fraction polymérique augmente entre deux et huit semaines en terre alors qu'elle était stable entre une et quatre semaines *in vitro*. Ces résultats suggèrent que dans les racines ayant poussé en terre il y aurait un enrichissement en acides gras non-substitués dans le polymère par rapport aux fractions solubles. Une proportion plus faible d'acides gras ω -hydroxylés polymérisé (environ 80 %) a également été constatée dans les racines ayant poussé en terre comparée à celles ayant poussée *in vitro* (environ 90 %).

La quantité totale de subérine augmente au cours du temps atteignant à huit semaines environ 2,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière fraîche sans comptabiliser les alcools gras solubles et environ 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière fraîche avec les alcools gras solubles (Figure 9A). Concernant la part de chaînes acyles consacrées à la biosynthèse de la subérine, comme pour la culture *in vitro*, elle est importante car elle représente déjà 40 % de la totalité des chaînes acyles dès la deuxième semaine de développement (Figure 9B). Dans le cas où les alcools gras solubles sont pris en compte dans la part des chaînes acyles consacrées à la subérine, cette dernière contient 60 % de toutes les chaînes acyles de la racine au bout de 8 semaines alors que celles des glycérolipides membranaires ne représentent que 25 % (Figure 9C). La part des chaînes acyles de la racine destinées aux sphingolipides est quant à elle constante au cours du développement (10 %) (Figure 9B et 9C).

Au niveau de la composition en chaîne acyles de la subérine, les acides gras ω -hydroxylés sont majoritaires à tous les stades de développement, que ce soit sans ou avec les alcools gras solubles (Figures 10A et 10B). De plus, alors que la proportion d'acides gras ω -hydroxylés augmente dans les racines de plantes ayant poussé *in vitro*, elle reste similaire au cours du développement des racines poussées en terre. Pour les acides gras α,ω -dicarboxyliques, alors qu'ils représentent les composés majoritaires des racines à une semaine *in vitro*, ils ne comptent que pour environ 25 % des chaînes acyles de la subérine de racines de plantes ayant poussé en terre, et ce quel que soit le stade de développement (Figure 10A). Dans le cas où les alcools gras solubles feraient partie de la subérine, ils seraient aussi

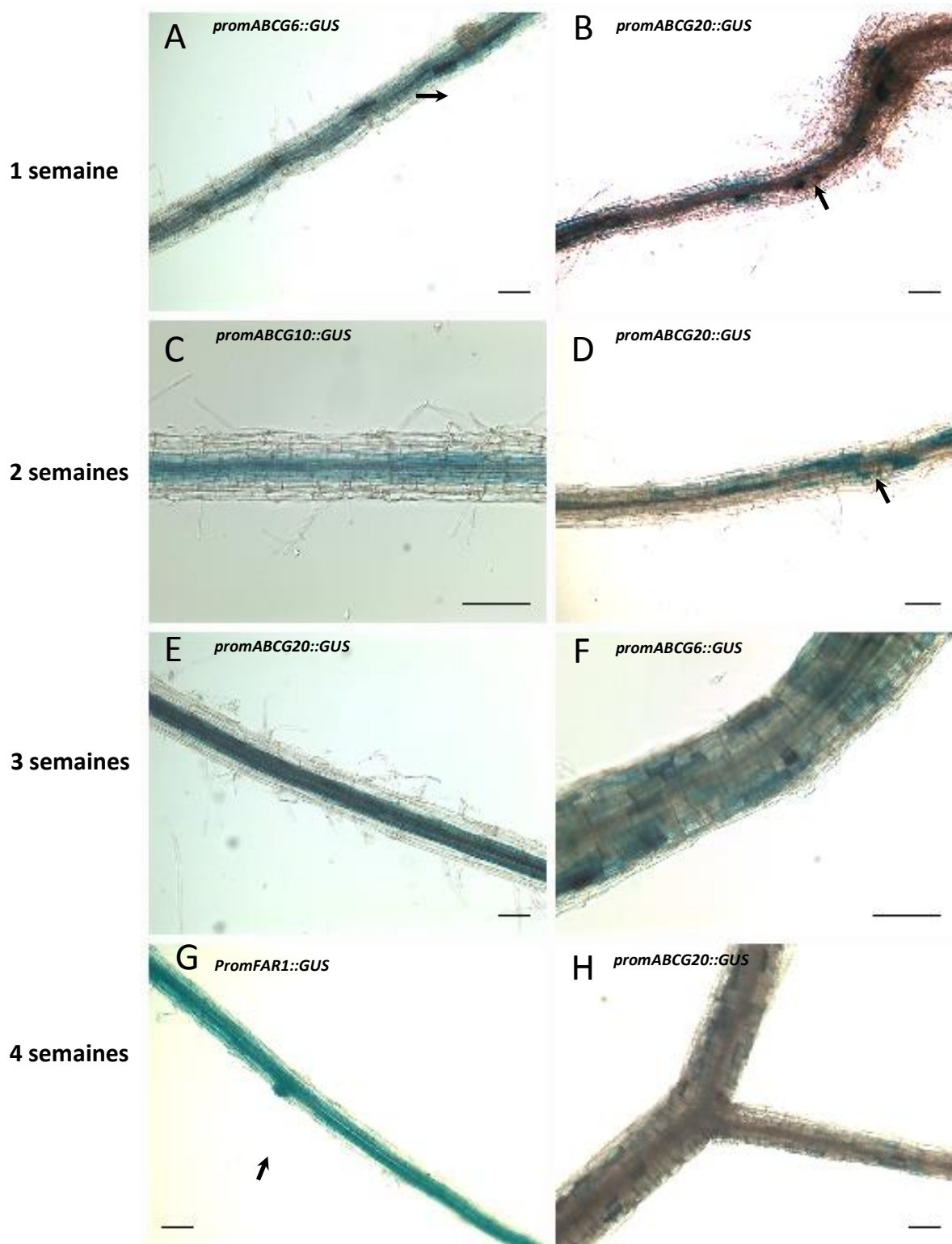


Figure 11 : Domaines d'expression de gènes de biosynthèse de la subérine détectés dans les racines de lignées transgéniques promoteur::*GUS* à une, deux, trois et quatre semaines. Les plantes d'*Arabidopsis Col-0* ont poussé *in vitro*. Les flèches indiquent des racines latérales émergeant du péricycle. Echelle = 100 μm.

abondants que les acides gras α,ω -dicarboxyliques (environ 20 % du total) à tous les stades de développement (Figure 10B).

4 - Déposition de la subérine au cours du développement des racines

Comme indiqué en introduction, les assises cellulaires subérisées des racines d'*Arabidopsis* sont l'endoderme et le périderme. L'endoderme est mis en place dès le début de la croissance racinaire alors que la formation du périderme se fait lors de la croissance secondaire. En fonction du stade de développement, les monomères de subérine analysés proviennent donc de l'endoderme et/ou du périderme. Les racines d'*Arabidopsis* étant très fines, il est impossible de séparer ces deux assises cellulaires et d'analyser leur composition en subérine séparément. Afin d'avoir une idée de la provenance de la subérine que nous avons analysée dans les racines des plantes ayant poussé une à quatre semaines *in vitro*, nous avons étudié les domaines d'expression de gènes impliqués dans la synthèse de la subérine (*ABCG6*, *ABCG10*, *ABCG20* et *FAR1*). Pour cela, nous avons analysé l'activité β -glucuronidase dans des lignées d'*Arabidopsis* ayant été transformées de façon stable avec des constructions contenant le promoteur de gènes impliqués dans le métabolisme de la subérine fusionné au gène rapporteur *GUS*. Ces plantes ont poussé quatre semaines *in vitro*, dans les mêmes conditions que pour les analyses lipidiques présentées précédemment.

A une semaine, seul un marquage continu au niveau de l'endoderme a été observé dans la majeure partie de la racine (Figure 11A). Dans la zone très proche des cotylédons, un marquage plus discontinu a pu être constaté (Figure 11B). Néanmoins il semble que ce soit des cellules de l'endoderme car le marquage est principalement détecté dans la région centrale des racines. Il se peut que les cellules de l'endoderme situées dans cette zone soient moins accessibles au substrat de la β -glucuronidase car les racines sont plus épaisses. Les mêmes observations ont été faites à deux semaines (Figure 11 C et D). La formation du périderme n'a donc pas dû débuter dans ces racines. Les premiers profils d'expression typiques du périderme ne sont détectés qu'à trois semaines au niveau de la partie haute de la racine principale (Figure 11 F). Dans ces mêmes racines, l'endoderme est toujours marqué (Figure 11 E). A quatre semaines, un profil endoderme et périderme est aussi observé (Figure 11 G et H). Ces résultats indiquent que jusqu'à deux semaines la subérine semble provenir exclusivement de l'endoderme alors qu'à partir de trois semaines, les analyses sont un mélange entre subérine de l'endoderme et du périderme.

Chapitre 2 - Partie 2 : Caractérisation des alcools gras de la fraction soluble des racines chez *Arabidopsis thaliana*

La deuxième partie du Chapitre 2 est présentée sous la forme d'un article dans lequel sont exposés les résultats obtenus sur la caractérisation des alcools gras présents dans la fraction soluble des racines d'*Arabidopsis*. Nos résultats suggèrent que chez *Arabidopsis* la subérine est composée du polymère, auquel sont consacrées la plupart des études sur la subérine, mais aussi d'une quantité importante de cires solubles principalement sous forme d'alkyl caféates. Ces résultats impliquent que les alcools gras, polymérisés et solubles, représentent chez *Arabidopsis* une des composantes majeures de la subérine, et qu'au niveau du métabolisme des lipides de la racine, la subérine représente une voie majeure. Cet article intègre certains résultats présentés dans la première partie et son état d'avancement, notamment au niveau de la discussion, est encore sous forme préliminaire. Néanmoins, nous espérons rapidement soumettre cet article pour publication à *Plant Physiology*.

Running head: Soluble fatty alcohols associated with suberin.

Corresponding Author: Frédéric Domergue

Laboratoire de Biogenèse Membranaire

UMR 5200 CNRS Université de Bordeaux

Bâtiment A3 - INRA Bordeaux Aquitaine,

71 av. E. Bourlaux CS 20032,

33140 Villenave D'Ornon,

FRANCE

Phone: (+33) 5 57 12 25 74

Fax: (+33) 5 57 12 26 44

frederic.domergue@u-bordeaux.fr

RESEARCH CATEGORY - ASSOCIATE EDITOR:

Biochemistry and Metabolism: Associate Editor Julian Hibberd (Cambridge)

Primary fatty alcohols are major components of suberized root tissues of Arabidopsis in the form of alkyl hydroxycinnamates^{1[W]}

Camille Delude, Laetitia Fouillen, Palash Bhar, Marie-Josée Cardinal, Stephanie Pascal, Dylan K. Kosma, Jérôme Joubès, Owen Rowland and Frédéric Domergue *

Department of Biology and Institute of Biochemistry, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada, K1S 5B6 (P.B., M.-J. C., O.R.)

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Nevada / Mail Stop 330, 1664 North Virginia Street, Reno, Nevada, 89557, USA (D.K.K.)

Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200 CNRS Université de Bordeaux, Bâtiment A3 - INRA Bordeaux Aquitaine, 71 av. E. Bourlaux CS 20032, 33140 Villenave D'Ornon, France (C.D., L.F., S.P., J.J., F.D.)

One-Sentence Summary: Fatty alcohols that are not covalently linked to the suberin polymer in Arabidopsis roots are soluble waxes in the form of alkyl hydroxycinnamates.

FOOTNOTES

¹ This work was supported by a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (CD) and by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OR). The Functional Genomic Center of Bordeaux - Metabolome/Lipidome platform was supported by the grant MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010.

*Corresponding author: frederic.domergue@u-bordeaux2.fr

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 (www.plantphysiol.org) is Frédéric Domergue (frederic.domergue@u-bordeaux.fr)

^[W]The online version of this article contains Web-only data.

ABSTRACT

Suberin is a complex hydrophobic polymer that acts as a barrier controlling water and solute fluxes and restricting pathogen infections. Suberin is deposited immediately outside of the plasmalemma in the cell wall of certain tissues such as endodermis of roots, aerial and underground periderms, and seed coats. Suberin consists of a variety of fatty acid derivatives polymerized with glycerol and phenolics. In the present study, we show using LC-MS/MS and GC-MS techniques that most of the fatty alcohols not covalently linked to the suberin polymer are in the form of alkyl hydroxycinnamates (AHCs), with alkyl caffeates predominating. Such compounds are not restricted to the periderm of mature roots, but are also most probably present in the endodermis of younger roots, where they are not extracted by rapid dipping in chloroform. Analysis of several mutants affected in key enzymes involved in the biosynthesis and export of suberin monomers suggests that the formation of the suberin polymer and associated waxes involves common pathways and is concomitantly occurring in Arabidopsis roots. Although fatty alcohols represent only minor components of the suberin polymer in Arabidopsis roots, this study demonstrates that they constitute the major aliphatics of suberin-associated waxes in the form of AHCs. Our results therefore indicate that esterified fatty alcohols, both soluble and polymerized forms, represent major constituents of Arabidopsis root suberized barriers, being as abundant as α,ω -dicarboxylic and unsubstituted fatty acids. In addition, our results show that suberized layers represent a major sink for acyl-lipid metabolism in Arabidopsis roots.

Word count: 247.

INTRODUCTION

Suberin is a hydrophobic plant biopolymer that acts mainly as a protective barrier to control the movements of water, solutes and gases, and to limit pathogen infections (Ranathunge et al., 2011; Vishwanath et al., 2013; Andersen et al., 2015). Suberin is deposited on the inside face of the cell wall of various tissues such as the endodermis and exodermis of primary roots, as well as in the periderm of mature roots that have undergone secondary growth. Underground storage organs, like potato tubers, also possess a suberized periderm. In aerial parts, suberin is found in the bundle sheath cells of grass leaves and in the periderm of mature stems with secondary growth (e.g. tree bark). Additionally, it is deposited in abscission zones as suberization is part of the wound-healing process of plants (Dean and Kolattukudy, 1976).

Suberin is a complex heteropolymer made up of aliphatics, phenolics and glycerol (Bernards, 2002). Typical aliphatic monomers are ω -hydroxy acids and α,ω -dicarboxylic acids, but suberin also contains long-chain (C16, C18) and very-long-chain (\geq C20) unsubstituted fatty acids and primary fatty alcohols. The predominant phenolic components of suberin are hydroxycinnamic acids, especially ferulic acid. The outer bark of cork-oak tree (*Quercus suber*) and the tuber periderm of potato (*Solanum tuberosum*) are suberin-rich tissues that have been used for decades as models to study the composition and structure of suberin. Recently, analyses by ESI-MS/MS and high resolution NMR of suberin oligomeric blocks obtained from partial depolymerisation experiments have provided new insights about the macromolecular structure of this complex polymer (Graça and Santos, 2006; Graça et al., 2015a). In both cork and potato skin suberin, glycerol – α,ω -diacid – glycerol diesters form the core structure of the aliphatic polyester, whereas glycerol – ω -hydroxy-acid – ferulic acid diesters are likely responsible for linking to the neighboring aromatics and carbohydrates of the cell wall. Whether suberin comprises both a polyaliphatic and a polyaromatic domain or should be restricted to the glycerol-aliphatic polyester that co-localizes with a lignin-type polyphenolic domain remains a matter of debate (Bernards, 2002; Graça, 2015b).

Solvent-extractable waxes are typically found in suberized tissues. These compounds are usually extracted by brief immersion in chloroform (Li et al., 2007; Molina et al., 2009; Kosma et al., 2012) or by extensive extraction in solvent (Schreiber et al., 2005; Yang and Bernards, 2006; Serra et al., 2010). A recent survey on the soluble waxes associated with the periderm or exodermis of various plants using chloroform dipping showed that suberin-

associated waxes (or 'root waxes') are widespread among higher plants, but with highly variable composition and content (Kosma et al., 2015). Most species contained linear aliphatics in the form of fatty acids (free or esterified to glycerol at the *sn*-2 position), free fatty alcohols, alkanes (and their mid-chain oxygenated derivatives), and sterols, with total amounts varying from about 0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in pea (*Pisum sativum*) to 5.17 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in *Arabidopsis*. Ten of the eleven species analysed in this study contained alkyl hydroxycinnamates with contents ranging from 2 to 93 mol% of total waxes. Notably, 4 of 11 species were dominated by alkyl hydroxycinnamates including one member of the Solanaceae and 3 members of the Brassicaceae. In the periderm of freshly harvested potato tubers, the amount of suberin-associated waxes reaches 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, and the composition is dominated by saturated alkyl ferulates (i.e. ferulic acid linked by an ester-bond to C16-C32 fatty alcohols) and free primary alcohols, which represent 47 and 33 % of the total, respectively, while alkanes (15 % of the total) and free fatty acids (5 % of the total) are minor components (Serra et al., 2009). Storing potato tubers for 3 to 4 weeks significantly increases the amount of soluble waxes (2 to 4 times) as well as the quantity of the polymerized aliphatics (45 to 100 %) (Schreiber et al., 2005; Serra et al., 2010). Nevertheless, soluble waxes of potato tubers represent only 5 to 20 % of the total periderm lipids such that most of the aliphatics are polymerized.

In *Arabidopsis*, root waxes have so far been detected by chloroform dipping using roots of 6 to 8-week-old soil-grown plants with a fully developed periderm (Li et al., 2007; Molina et al., 2009; Kosma et al., 2012; Vishwanath et al., 2013), but not in roots of 3 to 4-week-old tissue culture-grown plants (Molina et al., 2009; Vishwanath et al., 2013). *Arabidopsis* root waxes are particularly enriched in Alkyl HydroxyCinnamates (AHCs), which can represent up to 90 % of the total (Kosma et al., 2015). Also present in lesser proportions are free fatty acids, fatty alcohols, alkanes, monoacylglycerols and sterols (Li et al., 2007; Molina et al., 2009; Kosma et al., 2012; Vishwanath et al., 2013; Kosma et al., 2015). Despite varying proportions have been reported, all of these studies have revealed that 18:0, 20:0 and 22:0 alkyl caffeates are the most abundant components of the suberin-associated waxes in *Arabidopsis*. The Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Transferase (FACT) responsible for the synthesis of alkyl caffeates in *Arabidopsis* root has been characterized, and null mutants of the *FACT* gene have a near-complete lack of alkyl caffeate esters (Kosma et al., 2012).

Over the past 8 years, reverse genetic approaches in *Arabidopsis* have allowed for the identification of key enzymes involved in the synthesis of the major suberin aliphatic

monomers such that the suberin biosynthetic pathway is now well described (Franke et al., 2012; Vishwanath et al., 2015). Interestingly, several genes involved in the synthesis or export of compounds found in the suberin polymer are also important for the synthesis or export of root waxes, which indicates shared biosynthetic pathways. *GPAT5* encodes a glycerol 3-phosphate acyltransferase producing *sn*-2 monoacylglycerols (MAGs) that are found in the suberin polymer as well as in the suberin-associated waxes (Li et al., 2007). In the same way, three fatty acyl reductases (FAR1, FAR4 and FAR5) catalyze the formation of the 18:0, 20:0 and 22:0 fatty alcohols found in both the suberin polyester and root waxes (Domergue et al., 2010; Kosma et al. 2012). Recently, three ABCG transporters (ABCG2, ABCG6 and ABCG20) were shown to be involved in the export of suberin monomers and waxes in *Arabidopsis* roots (Yadav et al., 2014).

In our previous study (Vishwanath et al., 2013), we showed that only 20 % of the fatty alcohols present in *Arabidopsis* roots were covalently linked to the suberin polymer while the remaining 80 % were found in a soluble non-polymeric fraction. Such a partition was obtained using roots from 4-week-old tissue culture-grown plants that did not contain any detectable suberin-associated wax components in the fraction obtained by rapid chloroform dipping of roots. When fully mature roots of plants grown in soil for 6 weeks were used, 19 % of all fatty alcohols were found in the root waxes extracted by chloroform dipping, 24 % of the total was recovered in the polymerized fraction, but the majority (i.e. more than 56 % of all fatty alcohols) was recovered in the soluble fraction (Vishwanath et al., 2013). To further characterize these soluble fatty alcohols, we developed an LC-MS/MS method to quantify AHCs. Our analyses showed that most of the soluble fatty alcohols present in the non-polymeric fraction are in the form of alkyl caffeates and alkyl coumarates. These results suggest that all the soluble fatty alcohols of roots from 4-week-old tissue culture-grown plants may therefore represent suberin-associated root waxes that are not extracted by rapid dipping of roots in chloroform. In addition, our results show that soluble and polymerized fatty alcohols together represent a major part of *Arabidopsis* suberized layers and that suberin-associated lipids represent a major sink for acyl-lipid metabolism in *Arabidopsis* roots. Finally, measurements of AHCs and total fatty alcohol contents in the soluble fractions of several suberin mutants further confirmed that soluble and polymerized fatty alcohols are produced and exported by the same subset of proteins.

RESULTS

Fatty alcohols and hydroxycinnamates are mainly found in the soluble lipid fraction of *Arabidopsis* roots

We first carefully examined the distribution of fatty alcohols and hydroxycinnamates in three different fractions corresponding to surface lipids, soluble lipids, and polymerized lipids (Figure 1A). Surface lipids were extracted by dipping the roots for 90 s in chloroform, and these corresponded to the so-called root waxes. Soluble lipids were then isolated by exhaustive solvent extractions using hot isopropanol and a series of various chloroform / methanol mixtures, and thus comprised all membrane and storage lipids as well as all other soluble lipids. The remaining insoluble residue corresponded to cell wall material together with polymerized lipid-phenolics, i.e. the suberin polymer. When the surface lipid fraction from roots of 4-week-old tissue culture-grown wild-type (Col-0) seedlings was silylated and directly analyzed by GC-MS, only traces of AHCs (mainly alkyl coumarates) were detected. However, when this fraction was first transmethyated before silylation and analysed by GC-MS, 18:0 to 22:0 fatty alcohols as well as coumaric, ferulic and caffeic acids were readily detected (Figure 1B,C). Nevertheless, when the soluble and polymerized lipid fractions were similarly analysed, their fatty alcohol and hydroxycinnamate contents were much higher, especially those of the soluble fraction (Figure 1B,C). In total, more than 76 % of the fatty alcohols and hydroxycinnamates were found in the soluble lipid fraction, with about 17 % in the polymerized lipid fraction and less than 7 % in the surface lipid fraction. In addition, there were some differences in the distribution of the various hydroxycinnamates and fatty alcohol chain lengths. While the surface lipid and polymerized lipid fractions contained similar amounts of each fatty alcohol chain length, the soluble lipid fraction was enriched in very-long-chain fatty alcohols suggestive of a different spatial distribution of specific chain lengths of fatty alcohols. As shown in Figure 1B, the soluble fraction contained two and three times more 22:0 than 20:0 and 18:0 fatty alcohols, respectively. Conversely, the polymerized lipid fraction did not contain any 24:0-OH, but more than one fourth of all 18:0-OH. This fraction also contained only 1 % of all caffeate, less than 20 % of all coumarate, and more than 31 % of all ferulate, in agreement with ferulate being enriched in the suberin polymer. In contrast, the soluble fraction contained nearly all of the caffeate (96 %) and most of the coumarate (78 %). Since *Arabidopsis* root waxes were recently shown to be dominated by long-chain alkyl caffeates (Kosma et al., 2015), these partitions suggested that the fatty alcohols present in the

soluble fraction of 4-week-old roots might be in the form of AHCs, although they were largely not extracted by rapid dipping in chloroform.

Soluble fatty alcohols are mainly present in the form of AHCs

The soluble lipid fraction was a combination of all the solvent extractions that were used to leave behind a residue enriched in suberin polymer. This fraction therefore contained the vast majority of lipids present in the different root cell layers. Attempts to further fractionate this soluble lipid fraction using classical thin layer chromatography for isolating free fatty alcohols and/or AHCs failed, most probably because of the complexity of this fraction. We therefore synthesized 18:0, 20:0 and 22:0-AHC standards and developed a targeted LC-MS/MS approach to quantify such compounds in the soluble fraction (see Materials and Methods section). Separation was achieved using a reversed phase column and quantification performed using positive Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode, calibration curves along with 19:0-caffeate as internal standard (Supplemental Figure S1). The 10 AHCs which had been chemically synthesized showed the same MS/MS fragmentation behavior in positive ionization mode. AHCs being esters of a fatty alcohol and a phenolic acid, they all dissociated into characteristic fragments corresponding to the phenolic acylium ion, the hydrated phenolic acylium ion and the fatty alcohol specific fragment.

LC-MS/MS analysis of the soluble fraction from roots of 4-week-old tissue culture-grown wild-type (Col-0) plants revealed the presence of high AHC amounts, dominated by alkyl caffeates that represented about 80 % of the total. Alkyl ferulates were very minor components (less than 2 %), while alkyl coumarates accounted for about 19 % of the total AHCs (Table I). Alkyl ferulates and alkyl coumarates had very similar chain length distributions dominated by 22:0 species, which represented about 44 % of the total, while 20:0 and 18:0 species accounted for about 34 % and 20 % of the total, respectively. Alkyl caffeates were even more enriched in 22:0 species (64 % of alkyl caffeates), such that 22:0-caffeate alone represented more than half of all AHCs (Table I). In agreement with the presence of traces of 24:0-fatty alcohols in the soluble lipid fraction from roots (Vishwanath et al., 2013), 24:0-AHCs (about 2 % of the total) were also detected (Table I).

Overall, AHCs with 22:0 alkyl-chains represented about 58 % of the total, while 20:0 species were slightly more abundant than 18:0 species (about 23 and 18 % of the total, respectively). The relative quantities of the different fatty alcohol chain lengths present in the soluble fraction were also determined by GC-MS after transmethylation and silylation. The

proportions of the different chain lengths obtained with such an analysis were in very good agreement with those found by LC-MS/MS (Table I). In addition, since GC-MS analysis allowed quantification of the total amount of esterified fatty alcohols present in the soluble fraction, it could be calculated from the LC-MS/MS analysis that more than 85 % of these fatty alcohols were present in the form of AHCs (Table I). In terms of acyl-chain length, 81 and 74 % of the 18:0 and 20:0 fatty alcohols, respectively, were present in the form of AHCs, while the longer fatty alcohols (22:0 and 24:0) were almost exclusively found combined with phenolics (Table I).

Several suberin mutants are affected in their soluble AHC content and composition

The compositions of the AHCs found in the soluble fraction of 4-week-old *in vitro* grown wild-type Col-0 roots (this study) and in the taproot waxes of mature roots (Kosma et al., 2015) were very similar. AHCs consist of fatty alcohols esterified with hydroxycinnamates, both of which are also found in the suberin polymer. To test whether the genes involved in synthesis of AHCs in taproot waxes or in synthesis of the suberin polymer also participate in the synthesis of the AHCs that we found in the soluble fraction, we analyzed by LC-MS/MS the soluble fraction of the roots from several mutants affected in suberin deposition (grown 4 weeks *in vitro*). For these analyses, the minor amounts of surface lipids were not extracted by rapid dipping in chloroform before delipidation such that the resulting soluble lipid fraction contained both surface lipids and soluble lipids.

No differences in AHC content and composition of soluble lipids was observed in the *asft* mutant when compared to wild type (Figure 2A), in agreement with this mutant having less ferulate in the suberin polymer but being unaffected in its taproot waxes (Molina et al., 2009). In contrast, the soluble fraction of the *kcs2 kcs20* double mutant displayed a 50 % decrease in the content of both 22:0 and 24:0 AHCs, which was coupled with a 2-fold increase in 18:0 and 20:0 AHCs. The *far1 far4 far5** mutant (the asterisk indicating that *FAR5* was down-regulated in the *far1 far4* double knock-out background using an artificial microRNA approach; Vishwanath et al., 2013) was strongly affected as LC-MS/MS analyses showed a near complete lack of $\geq C20$ AHCs together with a 30 % decrease in 18:0 AHC content (Figure 2A). Such a strong effect is in agreement with our previous study (Vishwanath et al., 2013), which showed, according to GC-MS analyses, major reductions in the content of all fatty alcohols in the soluble fraction of roots from the *far1 far4 far5** mutant lines. In the *fact* mutant, a drastic reduction (99 %) in alkyl caffeates, a moderate decrease (52 %) in alkyl ferulates, and a slight increase (20 %) in $\geq C20$ alkyl coumarates

were observed (Figure 2A). Finally, LC-MS/MS analyses of the soluble fraction from the *abcg2 abcg6 abcg20* mutant revealed that the alkyl caffeate and alkyl ferulate levels were close to zero, 20:0 and 22:0 alkyl coumarates were decreased, while 18:0 alkyl coumarate was slightly increased (Figure 2A). Interestingly, for the *far1 far4 far5**, *fact* and *abcg2 abcg6 abcg20* mutant lines, the variations in AHC content and composition that we measured in the soluble fractions of 4-week-old *in vitro* grown roots were virtually identical to those reported in previous studies for the taproot waxes of 7-week-old soil-grown plants (Kosma et al., 2012; Vishwanath et al., 2013; Yadav et al., 2014).

The same soluble fractions and the corresponding dry residues containing the suberin polymer were transmethylated and silylated to analyze their acyl-chain compositions by GC-MS (Supplemental Figure S2). LC-MS/MS only allowed the quantification of the fatty alcohols present in the form of AHCs, while GC-MS analyses quantified the total fatty alcohol amounts of the soluble fraction. In the wild-type, *asft* and *kcs2 kcs20* mutant lines, most of the fatty alcohols (about 80 %) were in the form of AHCs (Figure 2B). In contrast, only about 40 % the remaining fatty alcohols present in the *far1 far4 far5** mutant were in the form of AHCs. In the *fact* and *abcg2 abcg6 abcg20* mutant lines, the proportion of fatty alcohols in the form of AHCs dropped below 20 %, indicating that most of the fatty alcohols present in the soluble fraction from these lines were not combined with phenolics. Taproot waxes of the *fact* and *abcg2 abcg6 abcg20* mutant lines, which were strongly affected in their AHC contents, presented higher levels of free fatty alcohols (Kosma et al., 2012; Yadav et al., 2014). Although the LC-MS/MS analyses that we performed did not allow the quantification of free fatty alcohols because of their very weak ionisation, it is likely that there were also more free fatty alcohols in the soluble fractions of 4-week-old *in vitro* grown roots from the *fact* and *abcg2 abcg6 abcg20* mutant lines.

Suberin lamellae are not affected in *far1 far4 far5 and *fact* mutant lines**

In the *fact* mutant, the soluble fraction of 4-week-old *in vitro* grown roots contained wild-type amounts of total fatty alcohols (Figure 2B) but 70 % less AHCs (Figure 2A), while the suberin polymer composition and content were unaffected (Figure S2). In the *far1 far4 far5** mutant, total amounts of fatty alcohols and AHCs were reduced by 80 and 85 %, respectively (Figure 2A and 2B), while the suberin polymer was only slightly affected with a 40 % decrease in the level of total fatty alcohols, which are low abundance components of the polymer (Figure S2). In order to test if these changes in AHCs and/or total fatty alcohol content affected the lamellar structure of the suberin layer, we performed TEM analysis of

mature roots (Figure 3). In the case of the *fact* mutant, the mature zone of roots (~ 2 cm below the shoot-root junction) from plants grown in soil for 6 to 7 weeks was used, while in the case of the *far1 far4 far5** mutant, plants were grown 4 weeks in tissue culture and mature roots about 5 mm below the rosette were used. At this developmental stage, the taproot of *Arabidopsis* seedlings had already undergone secondary growth as indicated by the presence of xylem vessels surrounded by phloem and pericycle layers. A periderm was often visible, although the state of these outermost cell layers was variable, sometimes being present and well-conserved and sometimes being in a state of dissolution or completely lost. Examination of intact periderm cells indicated that the suberin ultrastructure in the *fact* and the *far1 far4 far5** mutant lines was similar to that of wild-type roots (Figure 3). The typical light and dark lamellation of the suberized cell wall layer was observed in all 4 lines, suggesting that major alterations in the soluble waxes associated with the suberin polymer did not cause abnormalities in the lamellar architecture of the suberin layer.

The suberin layer represents a major sink for fatty acyl-chains in roots

GC-MS analysis of the acyl-chain compositions of both the soluble fraction and the polymerized lipid fraction containing the suberin polymer provided insights into fatty acyl-chain partitioning in mature *Arabidopsis* roots (grown for 4 weeks *in vitro*). We first considered that all the 2-hydroxy fatty acids found in both the soluble and polymerized fractions were part of sphingolipids for the two following reasons. First, when analyzing separately the different solvent mixtures used to delipidate the roots, the first two steps (isopropanol and chloroform/methanol (1:1, [v/v])) solubilised about 90 % of all acyl-chain types except 2-hydroxy fatty acids, of which more than 60 % of the total was solubilised by the last more polar steps (i.e. chloroform/methanol (1:2, [v/v]) and methanol; Supplemental Figure S3A). Second, when aqueous and saline (2M NaCl) washes were used to delipidate the roots as typically done for seed coat analysis (Molina et al., 2006), more than 85% of the 2-hydroxy fatty acids were eliminated from the polymer fraction (Supplemental Figure S3B), in agreement with these 2-hydroxy fatty acyl-chains being components of the highly glycosylated sphingolipids that are not solubilised by classical chloroform/methanol mixtures (Buré et al., 2011). To evaluate the distribution of acyl-chains in *Arabidopsis* roots, we then considered that all the unsubstituted fatty acids present in the soluble fraction were part of membrane glycerolipids, whereas all ω -hydroxy acids, α,ω -dicarboxylic acids and fatty alcohols (polymerized and soluble) together with the fatty acids found in the polymeric fraction were part of suberized layers. All fatty alcohols can be considered as suberin-specific

acyl-chains because 20 % of them are part of the polymer (Vishwanath et al., 2013), while most of the soluble fatty alcohols are in the form of AHCs (Figure 2B), and therefore most probably associated with the polymer in the form of waxes. With such considerations, membrane lipids accounted for 64 % of all root acyl-chains with glycerolipids and sphingolipids representing 55 and 9 % of the total, respectively (Figure 4A; Supplemental Figure S4). The suberized layers contained around 36 % of all the acyl-chains present in *Arabidopsis* roots grown for 4 weeks *in vitro*, therefore representing a major sink for root acyl-lipid metabolism.

For comparison, we evaluated the acyl-chain distribution in stems of 7-week-old plants (Supplemental Figure S5). Interestingly, we found very similar proportions since glycerolipids and sphingolipids respectively accounted for 59 and 7 % of the total, whereas about 33 % of all stem acyl-chains were part of the cuticle layer (Figure 4A). Nevertheless, the distribution within the cuticle and suberin layers clearly differed since the cuticle of stems was principally made of soluble waxes (the cutin polymer accounting for only 7 % of the total), whereas the suberized layers were principally made of the suberin polymer as suberin-like acyl-chains found in the soluble fraction accounted for only 24 % of the total (Figure 4B). These acyl-chain distributions not only highlight the importance of suberized layers in the global lipid metabolism of *Arabidopsis* roots, but also allowed new considerations about its global composition. As shown in Figure 4C, if all polymerized and soluble suberin-like acyl-chains (fatty alcohols, but also ω -hydroxy and α,ω -dicarboxylic acids) are considered as components of the root suberin barriers, the composition of suberized layers is still dominated by ω -hydroxy acids, which represent 32 % of all acyl-chains. Nevertheless, fatty alcohols then also become major constituents, being as abundant as α,ω -dicarboxylic (each class representing about 25 % of the total) and slightly more abundant than unsubstituted fatty acids (19 % of the total; Figure 4C).

Suberin deposition (both polymer and associated waxes) starts within the first week of growth and represents up to 55% of all root acyl-chains in plants grown in soil for 8 weeks

To understand the kinetics of *Arabidopsis* root suberization, we then performed a developmental study by analyzing the fatty acyl-chain compositions of the root soluble and polymerized fractions in plants grown *in vitro* over a four week period (Supplemental Figure S6). In one-week-old roots, glycerolipids contained most of the fatty acyl-chains (about 67 mol%), with suberized layers (suberin polymer and associated waxes) already accounting for

about one fourth of all fatty acyl-chains (24 mol%; Figure 5A). In the following weeks, the relative fatty acyl-chain content of glycerolipids decreased to around 53 mol%, while that of suberin and associated waxes increased to reach 41 mol% at week 4. In contrast, the fatty acyl-chain level in sphingolipids was stable, accounting for 5 to 9 mol% over the four week period (Figure 5A). The acyl-chain composition of suberized layers (suberin polymer and associated waxes) was similar at all four time points, although α,ω -dicarboxylic acids slightly decreased during the four week period (from 30 to 25 mol%), while ω -hydroxy acids continuously increased (from 25 to 36 mol%; Figure 5B). When considering the partition of the different types of acyl-chains between the polymer and soluble fractions over the four weeks, the distribution was similar at all stages, with the exception of ω -hydroxy acids and fatty alcohols which were, respectively, slightly less and more polymerized at week 1 (Figure 5C). Altogether, these data suggest that the deposition of suberin in roots grown *in vitro* occurs mainly within the first 3 weeks, and that the composition of the suberized layers as well as the partition of acyl-chains between the soluble and polymerized fraction remain about the same within the four week period.

Using the promoter:GUS lines that we generated for studying the spatio-temporal gene expression patterns of *FAR1* and *FAR4* (Domergue et al., 2010; Vishwanath et al., 2013), we found that the oldest part of one week-old roots, situated just below the hypocotyl, showed only endodermal expression at this developmental stage (Supplemental Figure S7A). In contrast, one week later, the older part of primary roots showed a patchy staining typical of periderm, while younger parts and secondary roots were only stained in their endodermis, suggesting that root periderm starts appearing between week 1 and 2 of growth *in vitro* (Supplemental Figure S7A). In addition, qPCR analyses using *in vitro* grown roots indicated that the expression of several genes involved in suberin biosynthesis, including that of *FACT*, *FAR1* and *FAR4*, which are responsible for the synthesis of most AHCs, were at about the same levels over the four week period of growth (Supplemental Figure S7B). Altogether, these results suggest that the suberin acyl-monomers detected after one week of *in vitro* growth represent suberized endodermis, and that this tissue most probably also contains roots waxes in the form of AHCs.

We then performed similar analyses using soil-grown plants in order to evaluate how suberization of Arabidopsis roots occurs under more normal growing conditions. Plants were grown during an 8-week period and all roots were carefully separated from the soil every two weeks before analysing the fatty acyl-chain compositions of both the soluble and polymerized fractions by GC-MS (Supplemental Figure S8). In 2 week-old roots, glycerolipids and

suberized layers (suberin polymer and associated waxes) contained similar amounts of fatty acyl-chains (44 mol%), while sphingolipids accounted for about 11 mol% (Figure 6A). During the next 6 weeks, the fatty acyl-chain contents of sphingolipids remained about the same, whereas that of glycerolipids slightly increased between week 2 and 4 before decreasing during the next four weeks. Conversely, the amounts of fatty acyl-chains found in suberized layers first decreased, but then increased constantly to represent as much as 55 mol% at week 8 (Figure 6A). The partition of all the different types of acyl-chains between the polymer and the soluble fractions was similar over the eight week period (Figure 6B). About 95 % of all α,ω -dicarboxylic acids, 87 % of all ω -hydroxy acids, and 17 % of all fatty alcohols and unsubstituted fatty acids were systematically found in the polymer (Figure 6B). The fatty acyl-chain composition of the suberized layers (suberin polymer and associated waxes) also remained similar between week 2 and 8, with ω -hydroxy acids being systematically the major type of acyl-chain (around 35 % of the total), while α,ω -dicarboxylic acids, fatty alcohols and fatty acids accounted, each, for 20 to 24 % of the total (Figure 6C and Supplemental Figure S8).

We also analyzed using LC-MS/MS the AHC content of the soluble fractions from the roots of soil-grown plants, and found striking differences between the different developmental stages (Figure 7A). In 2 week-old roots, more than 69 % of all AHCs were alkyl coumarates, with alkyl caffeates and alkyl ferulates accounted for 28 % and 3 % of the total AHCs content, respectively. In addition, 18:0- and 20:0-alkyl-chains largely dominated at two weeks, representing 58 and 26 % of the total, respectively, while 22:0-alkyl-chains accounted for only 16 % of the total and 24:0-alkyl-chains were below the detection level. In the following weeks, the levels of all alkyl ferulates as well as that of 18:0 alkyl-coumarate steadily decreased, whereas the levels of 20:0 alkyl coumarate remained unchanged. Inversely, the levels of 22:0 and 24:0 alkyl coumarates and 18:0 alkyl caffeate slightly increased steadily. The most significant alterations were the sharp increases in 20:0 alkyl caffeate between week 2 and 6, and in 22:0 and 24:0 alkyl caffeates between week 2 and 8 (Figure 7A). These variations perfectly reflected those observed when analyzing the same soluble fractions by GC-MS (Supplemental Figure S8). As shown in Figure 7B, the ferulate and coumarate contents decreased with time, while the level of caffeate increased. Also, whereas 18:0 fatty alcohols dominated at week 2 (representing 45 % of all fatty alcohols), 22:0 were the major fatty alcohol chain-length at week 8 (representing 62 % of all fatty alcohols). With such variations, the AHC composition of 8 week-old roots was dominated by alkyl caffeates, which represented 75 % of all AHCs, and by 22:0 alkyl-chain lengths, which

accounted for 56 % of the total (Figure 7A). Finally, when comparing the levels of fatty alcohols present in the form of AHCs (measured by LC-MS/MS) to the total amount of fatty alcohols (measured by GC-MS), only 70 % of all fatty alcohols of the soluble fraction were in the form of AHCs at week 2, whereas nearly all of them were esterified with hydroxycinnamic acids at week 4 to 8 (Figure 7C).

DISCUSSION

In *Arabidopsis*, suberin-associated root waxes have so far only been extracted by rapid dipping in chloroform using 6 to 8-week-old taproots with a fully developed periderm (Li et al., 2007; Molina et al., 2009; Kosma et al., 2012; Vishwanath et al., 2013; Kosma et al., 2015). Our present results suggest that such compounds are present much earlier in the development of roots and that the rapid dipping in chloroform procedure extracts only a portion of all suberin-associated waxes present in *Arabidopsis* roots. The LC-MS/MS targeted approach that we developed showed that most of the fatty alcohols not covalently linked to the suberin polymer are in the form of AHCs, with alkyl caffeates predominating. We propose that these soluble fatty alcohols should be considered as part of the suberized layers of *Arabidopsis* roots in the form of associated waxes. With such considerations, fatty alcohols, both soluble and polymerized, then represent a major constituent of suberized layers in *Arabidopsis* roots, being for example as abundant as α,ω -dicarboxylic and unsubstituted fatty acids. In addition, our results suggest that suberized layers represent a major sink for the global metabolism of acyl-chains in *Arabidopsis* roots.

Soluble fatty alcohols not extracted by rapid dipping in chloroform are predominantly in the form of alkyl-caffeates, and represent suberin-associated waxes

In the present study, we used a targeted LC-MS/MS method to show that 75 to 90 % of the soluble fatty alcohols that are not extracted by rapid dipping in chloroform are in the form of AHCs in roots of 4-week-old tissue culture-grown *Arabidopsis* seedlings (Table 1 and Figure 2B). Concerning the phenolic part, caffeic acid was most abundant, being present in about 80 % of all AHCs, while for the fatty alcohol part, the saturated C22 chain length dominated, being present in about 55 % of all AHCs. As such, 22:0 alkyl caffeate was the most abundant molecular species, representing around 55 % of the total (Table 1 and Figure

2A). In mature roots grown for 8 weeks in soil, alkyl caffeates accounted for up to 75 % of the total AHC content, with 22:0 alkyl caffeate alone representing 56 % of all AHC molecular species (Figure 7A). Interestingly, the soluble fractions of roots from plants grown for 4 weeks in tissue-culture or for 8 weeks in soil had nearly identical AHC compositions, while the total content was about 35 % greater in soil-grown plants. Although we observed important variations in AHC composition according to the developmental stage of the roots grown in soil (Figure 7A), 70 to 100 % of all the fatty alcohols from the soluble lipid fraction were systematically detected in the form of AHCs (Figure 7C). Since this fraction combined the different solvent extractions conducted over several days at room temperature to separate the suberin polymer from all soluble lipids, it might have been subjected to breakdown and hydrolysis, such that the amount of free fatty alcohols (as well as those of ω -hydroxy and α,ω -dicarboxylic acids) may be overestimated. Recently, Kosma et al. (2015) reported that up to 90 mol% of all compounds identified in Arabidopsis root waxes from 6 to 7-week-old soil-grown plants were AHCs, with alkyl caffeates accounting for 90 % of the total AHC content, and 22:0 alkyl caffeate being the most abundant molecular species (49 % of all AHCs). These values support the idea that most of wild-type Arabidopsis root waxes are indeed AHCs, the other components (free fatty acids, alkanes, monoacylglycerols as well as free fatty alcohols) being nearly negligible. Altogether, these analyses indicate that the vast majority of the fatty alcohols that are not covalently linked to the suberin polymer are present in the form of AHCs in Arabidopsis roots whatever the developmental stage.

The AHCs and free fatty alcohols contents reported here for the soluble lipid fraction (according to LC-MS/MS analyses) compared with previous studies of root waxes (according to GC-MS analyses) are not only a match for wild-type plants but also for that of the suberin mutants that we studied. Vishwanath et al. (2013) reported that the AHC content of the root waxes from the *far1 far4 far5** triple mutant was decreased by 90 % with a near-complete lack of C20 and C22 molecular species. In the present study, we found that the AHC content of the soluble lipid fraction from the *far1 far4 far5** triple mutant was decreased by 85 %, with \geq C20 AHCs being barely detected (Figure 2A). Similarly, in the study from Yadav et al. (2014), the root waxes of the *abcg2 abcg6 abcg20* triple mutant were nearly devoid of alkyl caffeates and alkyl ferulates, while the 18:0 alkyl coumarate and free fatty alcohols contents were increased. In the present study, we found that the alkyl caffeate and alkyl ferulate levels were close to zero, while those of 18:0 alkyl coumarate and free fatty alcohols contents were increased in the *abcg2 abcg6 abcg20* triple mutant (Figure 2). Finally, in the study from Kosma et al. (2012), the root waxes of the *fact* mutant lines were characterized by an absence

of alkyl caffeates and by an increase in the levels of $\geq C_{20}$ alkyl coumarate and free fatty alcohols. In the present study, the soluble fraction of the *fact* mutant did not contain any alkyl caffeate, while free fatty alcohols, especially 20:0 and 22:0 fatty alcohols, were increased (Figure 2). Altogether, these data show that mutations in *far1 far4 far5*, *fact* and *abcg2 abcg6 abcg20* had about the same impact on the root waxes extracted by chloroform dipping of mature plant (grown 6 to 7 weeks in soil) as on the soluble fractions from plants grown 4 weeks *in vitro*. This perfect concordance further supports the idea that the AHCs that we identified in the soluble fraction represent suberin-associated waxes.

Most suberin-associated root waxes are not extracted by rapid dipping in chloroform

When we tried to extract root waxes by chloroform dipping using roots from 4-week-old tissue culture-grown wild-type seedlings, GC-MS analysis only revealed very low amounts of alkyl coumarates and traces of alkyl ferulates. In addition, the vast majority of fatty alcohols (more than 76 % of the total) were recovered in the soluble fraction and characterised by LC-MS/MS as AHCs. These results imply that most of the suberin-associated root waxes are not extracted by rapid dipping in chloroform. Although the exact localisation of root waxes remains to be determined, it is most probable that they are co-localizing with the suberin polymer. Along the length of the root, deposition of the suberin lamellae is observed 7 to 8 mm from the root cap junction during state II endodermal differentiation (Martinka et al., 2012; Andersen et al., 2015), implying that the biosynthesis of the different monomers required to form the suberin barrier occurs in the very early stages of root development. Confocal microscopy imaging of transgenic Arabidopsis plants expressing the yellow fluorescent protein under the control of the *FACT* promoter revealed transcriptional activity in the endodermis of young roots (Kosma et al., 2012), suggesting that AHC biosynthesis is not restricted to the periderm, but also occurs in the endodermis. The promoter:GUS lines that we generated for studying the spatio-temporal expression of *FAR1*, *FAR4* and *FAR5* showed that all three *FAR* genes were expressed in the endodermis as well as in the periderm (Domergue et al., 2010; Vishwanath et al., 2013).

The expression patterns of *FAR1* and *FAR4* determined using the transgenic promoter:GUS lines reported in the present study (Supplemental Figure S7A) revealed that root periderm appears between week 1 and 2 of growth *in vitro*, implying that the suberin acyl-monomers that we detected after one week of *in vitro* growth specifically represent

suberized endodermis. Since the partition of the different types of acyl-chains indicated that about 80 % of all fatty alcohols were found in the soluble fraction after one week, these results strongly suggest that root waxes are produced in the endodermis of one-week-old roots. In addition, the fact that *FACT*, *FAR1* and *FAR4*, which are responsible for the synthesis of most AHCs, were expressed at similar levels over the four week period of growth (Supplemental Figure 7B), further supports the presence of roots waxes in the endodermis at the very early stages of root development. In agreement with this hypothesis, the presence of compounds typical of waxes (fatty alcohols and alkanes) has been described in the endodermis of soybean roots, which can easily be separated from the epidermis (Thomas et al., 2007).

Root waxes associated with the suberin layer of the endodermis would most probably not be extracted by dipping the root for 90 s in chloroform because of their internal location, below the root epidermis and cortex layers. Similarly, the periderm being composed of several cell layers, it is also possible that the rapid dipping procedure does not extract the soluble waxes associated with suberin of the innermost cell layers of the periderm. Finally, root waxes are most probably deposited within the polymer between the plasmalemma and the cell wall, and this internal cell wall location, in contrast to that of aerial cuticular waxes, could also prevent their complete extraction by the rapid chloroform dipping procedure. In agreement, Li et al. (2007) reported that a 10 s dip in chloroform was sufficient to recover 98 % (w/w) of total surface waxes from *Arabidopsis* stems, while such a procedure extracted only 66 % (w/w) of the root waxes. From our LC-MS/MS analyses, the total amount of AHCs present in the soluble lipid fraction from roots of 6-week-old soil-grown plants can be estimated as $1017 \pm 123 \mu\text{g/g FW}$. Using rapid dipping in chloroform, Kosma et al. (2015) evaluated the root wax AHC amounts of *Arabidopsis* grown for six weeks in soil to be $388 \pm 59 \mu\text{g/g FW}$. Although these values were obtained from plants grown in different conditions, they suggest that the rapid dipping in chloroform procedure extracted at most 40 % of all root waxes. In our previous study, we similarly found that only 25 % of the soluble fatty alcohols present in the roots from 7-week-old wild-type plants grown in soil were extracted by rapid dipping in chloroform (Vishwanath et al., 2013). All these data therefore support the view that an important proportion of suberin-associated root waxes are not extracted using the rapid dipping in chloroform procedure, most probably because of the internal location of suberized layers, and possibly because of a tight association of root waxes within the suberin polymer.

The suberin polymer and associated waxes are synthesized concomitantly

Our data showed that the acyl-chain composition of root suberin was rather similar at different developmental stages. All the analyses we performed indicated that ω -hydroxy acids were slightly more abundant than α,ω -dicarboxylic acids, fatty alcohols (soluble and polymerized) and unsubstituted fatty acids, which were all about equally abundant (Figures 4C, 5B and 6C). Similarly, the partition of the different types of acyl-chains between the soluble and polymerized fractions was very similar at the different developmental stages. While 80 to 95 % of all ω -hydroxy and α,ω -dicarboxylic acids were found in the polymeric fraction, the soluble fraction systematically contained about 80 % of all fatty alcohols (Figures 5C and 6B). These results suggest that all the aliphatic monomers making the suberin layer, i.e. the polymer and associated root waxes, are synthesized concomitantly, and that the endodermis and periderm likely have rather similar suberin compositions. The parallel formation of suberin polymer and root waxes is further supported by the involvement of a common set of proteins required for the synthesis of both components of suberized layers. As shown in the present study, the condensing enzymes KCS2 and KCS20 are necessary for the formation of the very-long-chain aliphatics present in the suberin polymer as well as in associated waxes (Figure 2A and Supplemental Figure S2; Lee et al., 2009; Franke et al., 2009). Similarly, the fatty acyl reductases FAR1, FAR4 and FAR5 are collectively responsible for biosynthesis of the fatty alcohols found as alkyl hydroxycinnamates in root waxes and polymerized into the suberin polyester (Figure 2A and Supplemental Figure S2; Vishwanath et al., 2013). Finally, our results also confirmed that three ABC transporters, ABCG2, ABCG6 and ABCG20, are involved in the export of the monomers making up the suberin polymer as well as the soluble waxes (Figure 2A and Supplemental Figure S2; Yadav et al., 2014). The fact that the same enzymes produce or export aliphatics present in both the suberin polymer and its associated waxes strongly supports that the synthesis of the two components of suberized root barriers is coordinated during root development.

,The absence of significant variation in the relative proportions of the different aliphatics making up suberin suggests in addition that the composition of suberin in the endodermis and periderm is similar. In the early stages of root development (i.e. after one week of *in vitro* growth), suberin is coming exclusively from the endodermis (Supplemental Figure S7A), whereas in later stages (i.e. after 8 weeks of growth in soil), the periderm, which contains several layers of suberized cells, should account for most of the root suberin.

However, the overall compositions of suberin reported throughout this study are relatively similar. A noticeable exception might be the total content of ω -hydroxy fatty acids which, in addition to being slightly higher than that of the other types of acyl-chains, increased with age as the periderm developed *in vitro* (Figure 5B). Such a situation was already observed in maize (Zeier et al., 1999) as well as in Arabidopsis where suberin analyses along the length of the roots showed that the mature part with a fully developed periderm contains more ω -hydroxy fatty acids than younger parts (Hofer et al., 2008). It could therefore be that periderm suberin is richer in ω -hydroxy fatty acids than endodermal suberin.

TEM imaging of intact periderm cells indicated that the lamellar architecture of the suberin layer was not affected in the roots from the *fact* and *far1 far4 far5** mutant lines (Figure 3). Since the soluble fraction of the *far1 far4 far5** mutant contained 80 to 85 % less AHCs and total fatty alcohols than that of wild type plants (Figure 2), our data suggest that the typical root wax components (i.e. AHCs) are not necessary for generating the typical light and dark lamellation of suberized layers. Similarly, since the soluble fraction of the *fact* mutant was characterized by large changes in its composition, specifically a 70 % decrease in AHCs and concomitantly higher levels of free fatty alcohols (Figure 2; Kosma et al., 2012), our data indicate that suberin ultrastructure is not affected by drastic changes in the composition of root waxes. In contrast, the *kcs2 kcs20* double mutant was reported to present an altered lamellation of the suberin in the endodermis (Lee et al., 2009), while the suberin appearance of the *abcg2 abcg6 abcg20* triple mutant was affected in both the endodermis and the mature root periderm (Yadav et al., 2014). These two mutant lines also have major alterations in their suberin polyester composition, and changes in the ratio of the different monomers comprising the polymer likely impact the lamellar structure of suberin. Also, the suberin-associated wax composition and/or content are also affected in the *kcs2 kcs20* and *abcg2 abcg6 abcg20* mutants (Figure 2; Yadav et al., 2014), so that alterations in both polymerized and soluble monomers could modify the lamellation of suberized layers. Whichever the case, these data contradict the idea that the light bands of the suberin lamellae are primarily made of waxes (Soliday et al., 1979).

Suberized layers represent a major sink for acyl lipid metabolism in Arabidopsis roots

Analyzing the acyl chain composition of both the soluble and polymerized fractions allowed us to get insights about the partitioning of all acyl-chains between the three major acyl pools of roots: sphingolipids, glycerolipids, and suberized layers. We considered that all

the 2-hydroxy acids (those found in the soluble fraction as well as those residually recovered in the polymerized fraction) represent the acyl-chains found in sphingolipids, while the non-substituted fatty acids of the soluble fraction reflect all the glycerolipids that form cellular membranes. Finally, all fatty alcohols, ω -hydroxy acids, and α,ω -dicarboxylic acids (both soluble and polymerized) as well as all non-substituted fatty acids of the polymeric fraction were considered as belonging to the suberized layers. With such considerations, we found that although the majority of the acyl-chains from roots of plants grown *in vitro* for 4 weeks were in membranes in the form of glycerolipids and sphingolipids, suberized layers nevertheless accounted for about 36 % of all acyl-chains (Figure 4A). In the case of plants grown in soil for 8 weeks, the proportion of acyl chains found in root suberin reached 55 % of the total (Figure 6A). At that late developmental stage, although suberin deposition is restricted to two cell types, the endodermis and periderm, it accounted for more acyl-chains than membranes, which are present in every living cell. Interestingly, the amounts of acyl-chains present in glycerolipids dropped at the latter stages of root development from plants grown *in vitro* and in soil (Figures 5A and 6A). Whether these decreases are related to the secondary growth of roots, which is characterized by the development of additional vascular tissues (i.e. xylem), remains to be determined. Nevertheless, our results indicate that a very large proportion (40 to 55 %) of the fatty acyl chains produced in roots is dedicated to the biosynthesis of suberized layers, demonstrating that suberin represents a major sink for acyl-lipid metabolism in Arabidopsis roots. Similarly, Suh et al., (2005) reported that about 60 % of the acyl-chains of epidermal cells from (middle) Arabidopsis stems were found in surface lipids, with the epidermal waxes load being about 8 times that of the cutin polyester load. Our analyses confirm that the cuticular barrier of stems is primarily made of soluble waxes (Figure 4B) and report that the majority of the acyl-chains constituting the suberized layers of Arabidopsis roots are in contrast part of the polymer (Figure 4B), like in the periderm of potato tubers (Schreiber et al., 2005; Serra et al., 2010).

CONCLUSIONS

In the present study, we showed that most of the fatty alcohols not covalently linked to the suberin polymer are present in the form of AHCs, with alkyl caffeates predominating, and represent suberin-associated waxes that are not extracted by rapid dipping in chloroform. Fatty alcohols, both soluble and polymerized, therefore represent a major constituent of

Arabidopsis suberized layers, being in total as abundant as α,ω -dicarboxylic and unsubstituted fatty acids. In addition, our results suggest that suberized layers represent, in Arabidopsis roots, a major sink for the metabolism of acyl-chains.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and growth conditions

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (ecotype Columbia-0) was used in all experiments. For *in vitro* growth, seeds were sterilized, plated on Murashige and Skoog medium supplemented with 0.7 % agar, 2.5 mM MES-KOH pH 5.7, and stratified in the dark for 3 to 4 days at 4°C. Plates were then transferred to a controlled environment growth chamber under long-day conditions (16 h of light, 8 h of darkness) at a temperature of 22°C, and seedlings were grown for up to 4 weeks. For soil-grown plants, seeds were sterilized, stratified in the dark for 3 days at 4 °C, and then sown onto pre-wetted peat moss-vermiculite-perlite growing medium (Promix BX, Premier Horticulture Ltée, Rivière-du-Loup, Québec, Canada). The seeds were germinated and grown at 22°C in a controlled environment growth chamber with ambient humidity under long-day conditions. Seedlings were transferred to individual pots after 10 days and continued growing under the same conditions for up to 8 weeks of total growth. Seed stocks of *far1-2 far4-1 far5** (Vishwanath et al., 2013), *asft-1* (Molina et al., 2009), *kcs2/daisy-1 kcs20* (Lee et al., 2009), *fact-1* (Kosma et al., 2012) and *abcg2-1 abcg6-1 abcg20-1* (Yadav et al., 2014) were used in the present study.

Lipid extractions

For the analysis of soluble and polymerized lipids from roots, freshly collected roots were immediately immersed in 4 ml of hot isopropanol. After incubation for 30 min at 85°C and then cooling, the isopropanol phase was collected. Roots were further extracted with 4 ml chloroform:methanol (2:1, v/v) for 24 h at room temperature on a tube rotator and the solvent phase was again collected. The delipidation of roots was completed by doing the same procedure with 4 ml chloroform:methanol (1:1, v/v), 4 ml chloroform:methanol (1:2, v/v), and 4 ml 100 % methanol. All the collected solvent phases were combined, evaporated under a gentle stream of nitrogen gas, and resuspended in chloroform:methanol (1:4, v/v). This fraction corresponded to the soluble lipids. The resulting solvent-extracted roots were dried in a fume hood at room temperature for 2 days and then in a dessicator for another 2 days, and this corresponded to the polymerized lipid fraction. When root waxes were extracted, freshly collected roots were first dipped in chloroform for 1.5 min before immersion in hot isopropanol. For the more extensive delipidation procedure, a series of supplemental

extractions in water (24 h), 2 M NaCl (8 h), water (24 h), and 100 % methanol (48 h), each at room temperature on a tube rotator, was added following the classical delipidation procedure.

Lipid analyses by gas chromatography

For lipid analyses by gas chromatography (GC), one fifth of the soluble lipid fraction and 5 to 25 mg of solvent-extracted dried residues were used. Samples were depolymerized by transmethylation at 85°C for 3 h in closed glass tubes containing 1 ml of 5 % (v/v) sulfuric acid in methanol and 5 µg each of heptadecanoic acid (17:0), pentadecanol (15:0-OH) and ω-hydroxy-pentadecanoic acid (ω-OH-15:0) as internal standards. After cooling, 2.2 ml of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and 1 ml of NaCl (2.5 %, w/v) were successively added. Tubes were mixed vigorously before centrifugation at 800 x g for 5 minutes at room temperature to promote phase separation. The upper MTBE phase was transferred to a fresh glass tube and washed with 1 mL of Tris-NaCl solution (100mM Tris base pH 8.0 in 0.09 % NaCl). After mixing and centrifugating, the upper MTBE phase was again transferred to a fresh glass tube, avoiding any aqueous phase, and evaporated under a gentle stream of nitrogen. For silylation, 150 µl of 99 % BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) + 1 % chlorotrimethylsilane (TMCS) was added and incubated at 110°C for 15 min. After cooling, the BSTFA-TMCS was evaporated under a gentle stream of nitrogen and samples were resuspended in heptane/toluene (1:1, v/v). GC analyses was performed on an Agilent 6850 gas chromatograph equipped with an Agilent 5975 mass spectrometer as described previously (Domergue et al., 2010). For analysis of root waxes, the chloroform extract was evaporated under a gentle stream of nitrogen and samples were either directly silylated and analyzed by GC, or treated as above for determining their total fatty alcohol and phenolic contents.

Synthesis and purification of alkyl hydroxycinnamate standards

The synthesis and purification of nonadecyl (19:0) caffeate was done as described in Razeq et al. (2014). The 18:0, 20:0 and 22:0 alkyl ferulates, alkyl *p*-coumarates and alkyl caffeates (the nine naturally occurring compounds) were synthesized according to the procedure reported previously by Nishimura et al. (2009) with minor modifications. Briefly, a chemoselective Mitsunobu esterification reaction was employed to couple the phenolic acids with the fatty alcohols in the presence of diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) and triphenylphosphine. A typical procedure involved the very slow dropwise addition of a solution of DIAD (4.37 mL, 22.2 mmol) in dry tetrahydrofuran (20 mL) into a stirring

solution of *p*-coumaric acid (3.64 g, 22.2 mmol), 1-octadecanol (3.0 g, 11.1 mmol) and triphenylphosphine (5.82 g, 22.2 mmol) in dry tetrahydrofuran (80 mL) at room temperature under N₂ atmosphere. The complete reaction mixture was stirred for an additional 1 h at room temperature during which it was judged to be complete by thin layer chromatography. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL) to give the crude product that was then purified by flash chromatography on silica gel (60Å, 230-500 mesh) using a gradient (5-15 %) of ethyl acetate in hexane. The desired product was obtained as pure crystalline white solid (3.6 g, 78%). Structure as well as purity of the product was confirmed by melting point, *R_f*, IR, ¹H and ¹³C NMR along with GC-MS analysis of the silylated product. The same procedure was followed to prepare the other eight compounds and varying yields (67-89 %) were obtained similar to that reported before (Nishimura et al., 2009).

Lipid analyses by liquid chromatography mass spectrometry

For lipid analyses by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), the soluble lipid fraction was first diluted to 80 mg DR per ml in chloroform:methanol (1:4, v/v). Two further dilutions, 1/3 and 1/15, were made for alkyl ferulate and alkyl coumarate / alkyl caffeate quantification, respectively. Each dilution contained 2 nmol·μl⁻¹ of 19:0-caffeate as internal standard. LC-MS/MS analyses were performed using the LC system Ultimate 3000 (Dionex) coupled to the MS model QTRAP® 5500 (ABSciex). Sample (5 μl) separations were carried out at room temperature on a reversed phase Jupiter C4 50×1 mm column, with 300 Å pore size and 5 μm particles (Phenomenex). Eluent A was water with 0.1 % (v/v) formic acid and eluent B was acetonitrile with 0.1 % (v/v) formic acid. The gradient elution program was as follows: 0-2 min, 60% B; 2-6 min, 60-75 % B; 6-26 min, 75-85 % B. The flow rate was set at 100 μl min⁻¹. MS/MS (MRM mode) analyses were achieved in positive mode. Nitrogen was used for the curtain gas (set to 25), gas 1 (set to 25) and gas 2 (set to 10). Needle voltage was at +5500 V without needle heating, the declustering potential was set at +200 V and the entrance potential at 10 V. The collision gas was also nitrogen, collision energy was set at +25 eV, and the dwell time was set at 1.5 ms. For defining the MRM transitions, the Q1 mass analyzer selected the protonated molecular ion [M+H]⁺ as precursor ion while the Q3 mass analyzer selected the phenolic acylium ion [R-CH=CH-C=O+H]⁺ (where R represents the phenolic ring) for alkyl-caffeates and alkyl-coumarates or its hydrated form [R-CH=CH-C=O+H₂O+H]⁺ for alkyl-ferulates as daughter ion. The areas of the different AHC peaks were determined using MultiQuant software (v2.1, ABSciex).

Quantification was based on the signal from the internal standard 19:0-caffeate (IS) and calibration curves obtained using the nine synthesized 18:0, 20:0 and 22:0 alkyl hydroxycinnamates.

Transmission Electron Microscopy

For transmission electron microscopy analysis, 4 week-old *in vitro* grown Arabidopsis seedlings were gently removed from MS medium. About 1 mm long root sections were cut at the base of the rosette and fixed with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). After a 10 min vacuum step at 200 mbars, the fixed samples were rinsed 3 times in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), post-fixed in 1 % OsO₄ in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 2 h at 4°C, rinsed 3 times in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), stained with tannic acid (1 % in water) for 30 min at room temperature, rinsed 3 times in water, dehydrated through an ethanol series (30, 50, 70, 85, 95 and 100 %), and impregnated in increasing concentrations of EPON 812 resin (Electron Microscopy Sciences) in propylene oxide over a period of 3 days before being polymerized at 60°C for 24 h. Sections 60 nm thick were imaged at 120 kV using an FEI TEM Tecnai Spirit equipped with a 4 k eagle charge coupled device.

Accession numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: *FAR1*, At5g22500; *FAR4*, At3g44540; *FAR5*, At3g44550; *ASFT*, At3g23840; *KCS2/DAISY*, At1g04220; *KCS20*, At5g43760; *FACT*, At5g41040; *ABCG2*, At2g37360; *ABCG6*, At5g13580; *ABCG20*, At3g53510; *GPAT5*, At3g11430; *CYP86B1/RALPH*, At5g23190; *CYP86A1/HORST* At5g58860.

ACKNOWLEDGMENTS

F.D. thanks Lysiane Brocard and Brigitte Battailler from the Bordeaux Imaging Center (which is a member of the national infrastructure France BioImaging) for transmission microscopy analyses, and the Metabolome Facility of Bordeaux for lipid analyses. The authors thank Isabel Molina (Alcoma University) for providing the *asft-1* seeds, Mi-Chung Suh (Chonnam National University) for providing the *kcs2/daisy-1 kcs20* seeds, and Jason W. Reed (University of North Carolina) for providing the *abcg2-1 abcg6-1 abcg20-1* seeds.

LIST OF AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.D., D.K.K. and O.R. conceived the research plans; F.D. O.R. and J.J. supervised the experiments; C.D., F.D., L.F. S.P., P.B. and M.-J.C. performed the experiments; F.D. and C.D. designed the experiments, analyzed the data, and wrote the article with contributions from all the authors.

Table I. Quantification of the soluble fatty alcohols present in the form of AHCs

The AHC and fatty alcohol contents of the soluble fraction from roots of 4-week-old tissue culture-grown wild-type (Col-0) were determined by LC-MS/MS and GC-MS as described in the Materials and Methods section. Data are expressed in nmol.mg⁻¹ of delipidated roots dry weight (DR) and each value is the mean +/- SD from four replicates.

	Quantification method	18:0-OH	20:0-OH	22:0-OH	24:0-OH
Alkyl Ferulate	LC-MS/MS	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.00 ± 0.00
Alkyl Coumarate	LC-MS/MS	0.36 ± 0.10	0.56 ± 0.11	0.71 ± 0.10	0.03 ± 0.01
Alkyl Caffeate	LC-MS/MS	1.13 ± 0.22	1.32 ± 0.21	4.57 ± 0.55	0.12 ± 0.02
Total Fatty Alcohols in the form of AHCs	LC-MS/MS	1.66 ± 0.22	2.15 ± 0.22	5.42 ± 0.64	0.16 ± 0.05
Soluble Fatty Alcohols	GC-MS	1.99 ± 0.37	2.90 ± 0.49	5.67 ± 0.12	0.16 ± 0.02
Soluble Fatty Alcohols in the form of AHCs (%)		81.1 ± 13.0	74.3 ± 13.0	90.5 ± 10.5	98.8 ± 1.7

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Distribution of fatty alcohols and hydroxycinnamates between surface, soluble and polymerized lipids from roots of 4-week-old tissue culture-grown wild-type seedlings.

- A. Protocol used to isolate surface lipids (root waxes), soluble lipids (mainly containing the cellular membrane constituents), and polymerized lipids (corresponding to suberin polymer).
- B. Fatty alcohol content of the different fractions. Acyl-chains were released by acid-catalysed transmethylation and hydroxyl groups silylated before separation by GC and detection by mass spectrometry (MS).
- C. Coumarate, ferulate and caffeate content of the different fractions. Hydroxycinnamic acids were released by acid-catalysed transmethylation and hydroxyl groups silylated before separation by GC and detection by mass spectrometry (MS).

Mean values are shown in nmol.mg^{-1} of delipidated dry residue (DR) \pm SD of five replicates.

Figure 2. Alkyl HydroxyCinnamate (AHC) content and composition of the soluble fractions from roots of wild-type and suberin mutant lines grown for 4 weeks in tissue culture.

- A. AHC content, sorted into individual compounds, of soluble fractions from roots of wild-type, *asft*, *kcs2 kcs20*, *far1 far4 far5**, *fact* and *abcg2 abcg6 abcg20* mutant lines grown in tissue culture for 4 weeks. AHCs were separated and quantified by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS).
- B. Total fatty alcohol content of the soluble fractions and fatty alcohol content in the form of AHCs in the soluble fractions from roots of wild-type, *asft*, *kcs2 kcs20*, *far1 far4 far5**, *fact* and *abcg2 abcg6 abcg20* mutant lines grown in tissue culture for 4 weeks. Fatty alcohols are sorted into individual chain lengths. Fatty alcohols present in the form of AHCs were calculated from (A), whereas the total fatty alcohol content of the soluble fractions was determined by GC (see Supplemental Figure S2).

Mean values are shown in nmol.mg^{-1} of delipidated dry residue (DR) \pm SD of four replicates.

Figure 3. Transmission electron microscopy of the suberin layer of peridermal cells from roots of wild-type and suberin mutants.

Transverse sections were made in the mature zone of the roots (below the shoot-root junction) and periderm cells were used for acquiring transmission electron microscopy images. Wild-type and *far1 far4 far5** seedlings were grown for 4-weeks in tissue culture on vertically oriented plates and sections about 5 mm below the rosette were made, whereas for the *fact* mutant, the mature zone of roots (~ 2 cm below the shoot-root junction) from plants grown in soil for 6 to 7 weeks was used.

Figure 4. Acyl-chain distribution in roots and stems, in root suberized layers and stem cuticle, and global acyl-chain composition of suberized layers from roots of wild-type plants.

- A. Total acyl-chain distribution in roots of wild-type plants grown for 4-weeks in tissue culture and in stems of wild-type plants grown for 6 to 7-weeks in soil. For roots, the soluble fraction derived from the delipidation procedure and the remaining dry residue containing the suberin polymer were each transmethylated, derivatized, and their acyl-chain composition determined by GC-MS. Membrane glycerolipids accounted for all unsubstituted and very-long-chain fatty acids present in the soluble fraction while sphingolipids accounted for all 2-hydroxy fatty acids found in both the soluble and polymerized fractions. Suberized layers accounted for all acyl-chains, except 2-hydroxy fatty acids, found in the polymerized fraction and for all suberin-type acyl-chains (ω -hydroxy acids, α,ω -dicarboxylic acids and fatty alcohols) found in the soluble fraction. For stems, waxes were first extracted, derivatized, and quantified by GC-MS. Dewaxed stems were then transmethylated, derivatized, and their acyl-chain composition determined by GC-MS. Membrane glycerolipids and sphingolipids accounted, respectively, for all unsubstituted fatty acids and all 2-hydroxy fatty acids present in the dewaxed stems. Cuticle accounted for all acyl-chains present in waxes as well as all cutin-type acyl-chains present in the dewaxed stems.
- B. Total acyl-chain distribution in suberized layers of roots of wild-type plants grown for 4-weeks in tissue culture and in the cuticle of stems of wild-type plants grown for 7-weeks in soil. Suberin polymer accounted for all acyl-chains except 2-hydroxy fatty

acids found in the polymerized fraction, while suberin waxes accounted for all suberin-type acyl-chains (ω -hydroxy acids, α,ω -dicarboxylic acids and fatty alcohols) found in the soluble fraction. For stems, waxes accounted for all acyl-chains present in chloroform extracts while cutin accounted for all cutin-type acyl-chains present in the dewaxed stems (see Supplemental Figure S5 for details).

- C. Global acyl-chain composition of the suberized layers from roots of wild-type plants grown for 4-weeks in tissue culture. Fatty acids accounted for unsubstituted fatty acids present in the polymerized fraction while ω -hydroxy acids, α,ω -dicarboxylic acids and fatty alcohols accounted for compounds found in both the soluble and polymerized fractions.

Mean values are shown in $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ of delipidated dry residue (DR) \pm SD of four replicates.

Figure 5. Fatty acyl-chain distribution in roots of wild-type seedlings grown over a 4-week period in tissue culture.

- A. Total acyl-chain distribution in roots of wild-type plants grown for 1, 2, 3 or 4 weeks in tissue culture. The amounts of the acyl-chains present in membrane glycerolipids, sphingolipids and suberized layers were determined as in Figure 4A.
- B. Fatty acyl-chain composition of the suberized layers from roots of wild-type plants grown for 1, 2, 3 or 4 weeks in tissue culture. The amounts of the different acyl-chain types were determined as in Figure 4C.
- C. Amount (in percentage of total) of the different types of acyl-chains found in the suberin polymer from roots of wild-type plants grown for 1, 2, 3 or 4 weeks in tissue culture.

Mean values are shown in mol% \pm SD of four replicates.

Figure 6. Fatty acyl-chain distribution in roots of wild-type plants grown over an 8-week period in soil.

- A. Total acyl-chain distribution in roots of wild-type plants grown for 2, 4, 6 or 8 weeks in soil. The amounts of the acyl-chains present in membrane glycerolipids, sphingolipids and suberized layers were determined as in Figure 4A.
- B. Amount (in percentage of total) of the different types of acyl-chains found in the suberin polymer from roots of wild-type plants grown for 2, 4, 6 or 8 weeks in soil.

- C. Fatty acyl-chain composition of the suberized layers from roots of wild-type plants grown for 2, 4, 6 or 8 weeks in soil. The amounts of the different acyl-chain types making the suberized layers were determined as in Figure 4C.

Mean values are shown in mol% \pm SD of four replicates.

Figure 7. Alkyl HydroxyCinnamate (AHC), hydroxycinnamate and fatty alcohol contents of the soluble fractions from roots using wild-type plants grown over an 8-week period in soil.

- C. AHC content, sorted into individual compounds, of the soluble fractions from roots of wild-type plants grown for 2, 4, 6 or 8 weeks in soil. AHCs were separated and quantified by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS).
- A. Hydroxycinnamate and fatty alcohol content and composition of the soluble fractions from roots of wild-type plants grown for 2, 4, 6 or 8 weeks in soil. Acyl-chains and hydroxycinnamic acids were released by acid-catalysed transmethylation and hydroxyl groups silylated before separation by GC and detection by mass spectrometry (MS).
- B. Total fatty alcohol content and fatty alcohols in the form of AHCs in the soluble fractions from roots of wild-type plants grown for 2, 4, 6 or 8 weeks in soil. Fatty alcohols present in the form of AHCs were calculated from (A), whereas the total fatty alcohol content was calculated from (B).

Mean values are shown in nmol \cdot mg⁻¹ (A, C) or μ g \cdot mg⁻¹ (B) of delipidated dry residue (DR) \pm SD of four replicates.

Supplemental data

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

Supplemental Figure S1: LC-MS/MS quantification of AHCs.

- A. Separation of AHCs using a reversed phase column.
- B. MRM transitions: the protonated molecular ion $[M+H]^+$ and the phenolic acylium adduct ion $[R-CH=CH-C=O+H]^+$ (where R represents the phenolic ring) or its hydrated form $[R-CH=CH-C=O+H_2O+H]^+$ were selected for defining the MRM transitions.
- C. Representative calibration curves: for quantification, calibration curves of the 9 naturally occurring AHCs that have been chemically synthesized were prepared using MRM transition as indicated in B. A_{mol} and A_{IS} stand respectively for the area of the molecule considered and the area of the internal standard 19:0-caffeate that was set at $2\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Supplemental Figure S2. Acyl-chain content of the polymerized and soluble fractions from roots of wild-type and suberin mutant lines grown for 4 weeks in tissue culture.

Freshly harvested roots were directly delipidated as indicated in the Materials and Methods section and the resulting soluble and polymerized fractions were transmethylated, derivatized, and their acyl-chain composition determined by GC-MS. Mean values are shown in $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ of fresh weight (FW) \pm SD of four replicates.

Supplemental Figure S3. Acyl chain composition of the different solvent mixtures used to delipidate the roots (A) and of the polymerized fraction after classical or extensive delipidation (B).

Roots from 4-week-old seedlings grown *in vitro* were delipidated and the acyl-chains recovered in each solvent mixture were analyzed by GC-MS. For classical delipidation, the solvent mixtures indicated in (A) were used whereas for the extensive delipidation, supplemental aqueous and saline extractions were added as described in the Materials and Methods section. CM, chloroform-methanol mixture; VLCFA, very-long-chain fatty acids.

Supplemental Figure S4. Acyl-chain content of the polymerized and soluble fractions of roots from wild-type plants grown for 4-weeks in tissue culture.

Freshly harvested roots were directly delipidated as indicated in the Materials and Methods section and the resulting soluble and polymerized fractions were transmethylated, derivatized, and their acyl-chain composition determined by GC-MS. Mean values are shown in nmol.mg^{-1} of fresh weight (FW) \pm SD of four replicates.

Supplemental Figure S5. Acyl-chain distribution in stem waxes of 7-week-old plants.

Epicuticular waxes were extracted by dipping stems for 1 min in chloroform, silylated and quantified by GC-MS. Dewaxed stems were then directly transmethylated and their global acyl-chain composition determined by GC-MS. Mean values are shown in nmol.mg^{-1} of fresh weight (FW) \pm SD of eight replicates.

Supplemental Figure S6. Acyl-chain content of the polymerized and soluble fractions of roots from wild-type plants grown from 1 to 4 weeks in tissue culture.

Freshly harvested roots were directly delipidated as indicated in the Materials and Methods section and the resulting soluble and polymerized fractions were transmethylated, derivatized, and their acyl-chain composition determined by GC-MS. Mean values are shown in nmol.mg^{-1} of fresh weight (FW) \pm SD of four replicates.

Supplemental Figure S7. Expression patterns of *FAR1* and *FAR4* detected in transgenic promoter:GUS lines (A) and relative transcript levels of suberin genes in roots from wild-type plants grown from 1 to 4 weeks in tissue culture (B).

- A. Expression patterns of *FAR1* and *FAR4* detected in transgenic promoter:GUS lines. Primary root tissues were collected from 1 and 2-week-old seedlings grown on vertical plates in tissue culture. Histochemical staining for GUS activity was performed as reported in Domergue et al., (2010).
- B. Relative transcript levels of genes involved in suberin biosynthesis in roots of wild-type and suberin mutants grown *in vitro* for 1 to 4 weeks measured by real-time RT-PCR analysis. Results are presented as relative transcript abundance using *ACT2* (At3g18780) in each sample to normalize for differences of total RNA amount. The expression of *FAR1* at week 1 was set as 1. The data represent means of two biological replicates, each with three technical replicates.

Supplemental Figure S8. Acyl-chain content of the polymerized and soluble fractions of roots from wild-type plants grown over an 8-week period in soil.

Freshly harvested roots were directly delipidated as indicated in the Materials and Methods section and the resulting soluble and polymerized fractions were transmethylated, derivatized, and their acyl-chain composition determined by GC-MS. Mean values are shown in nmol.mg^{-1} of fresh weight (FW) \pm SD of four replicates.

Figure 1

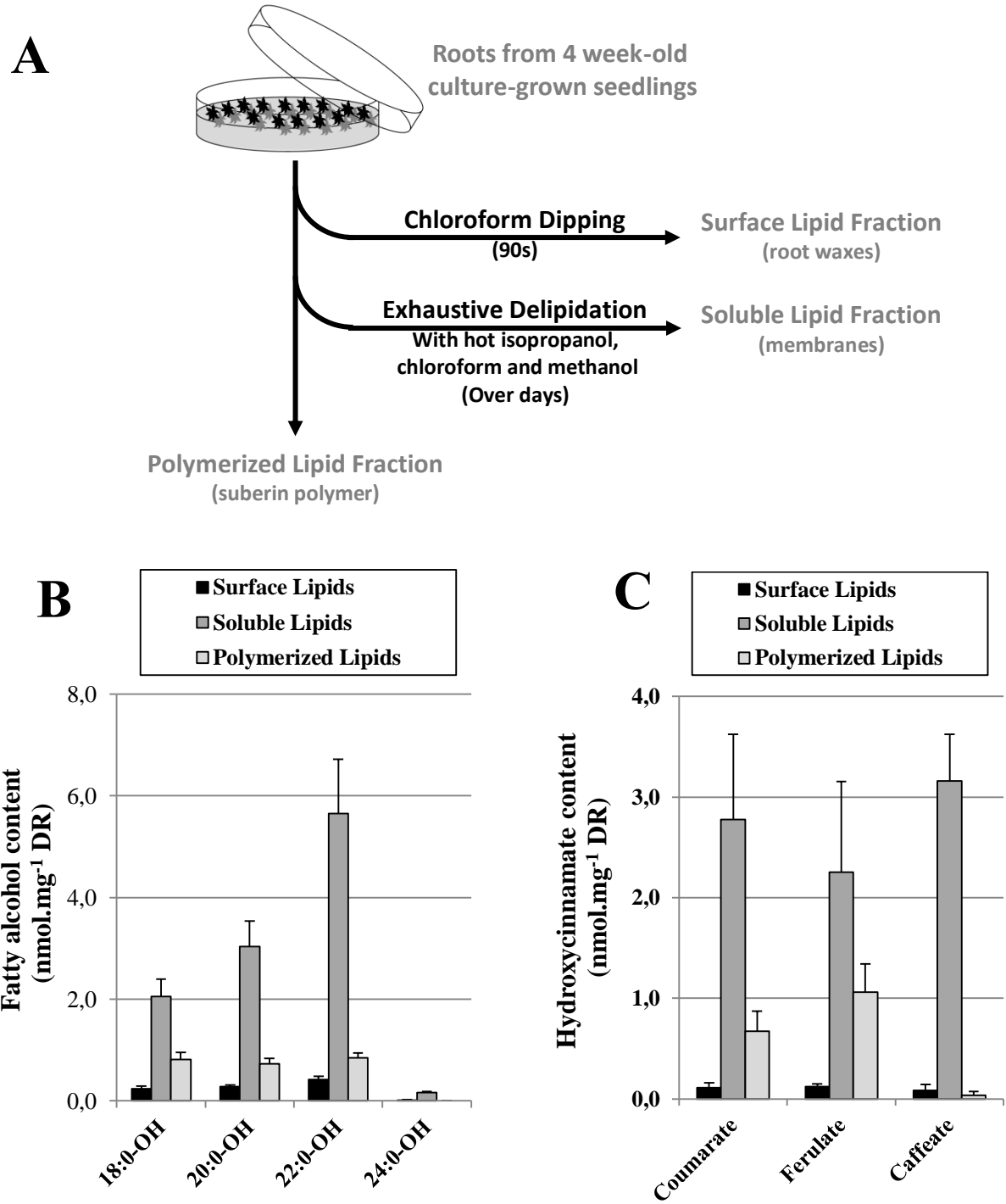


Figure 2

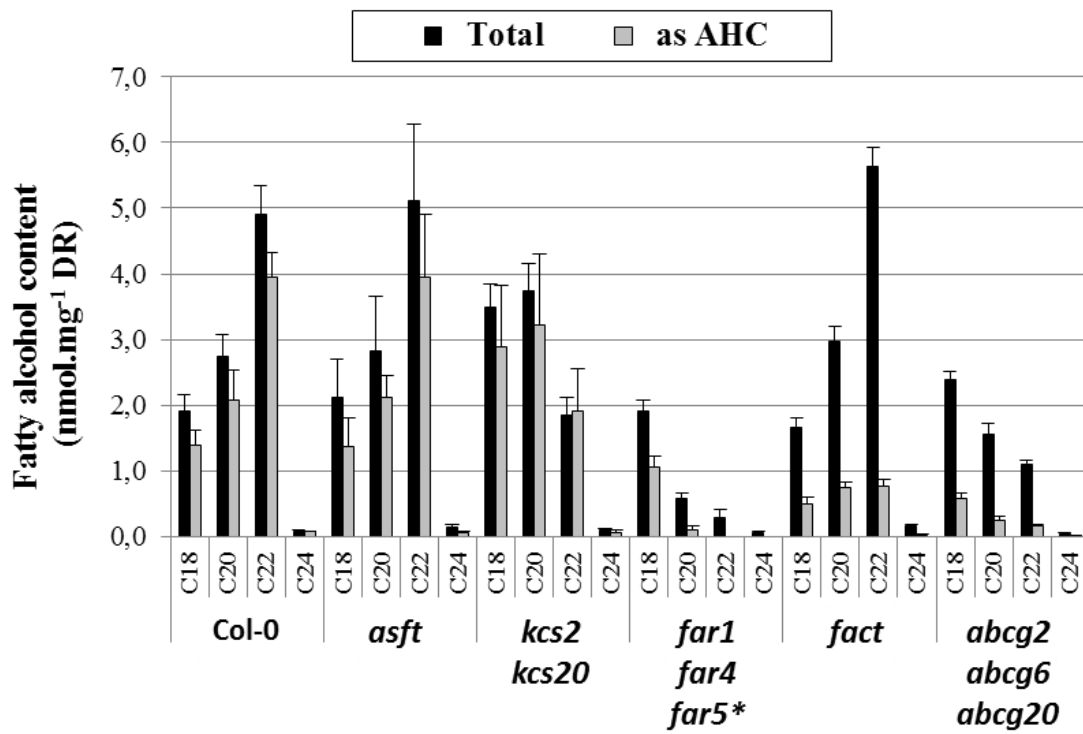
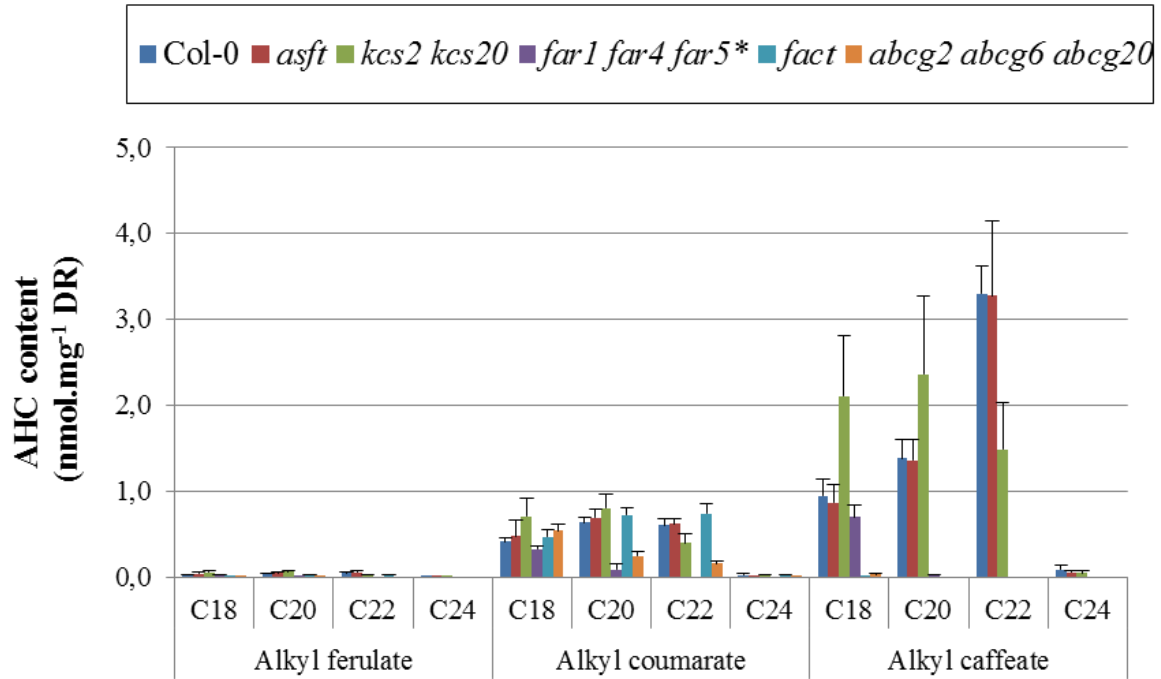


Figure 3

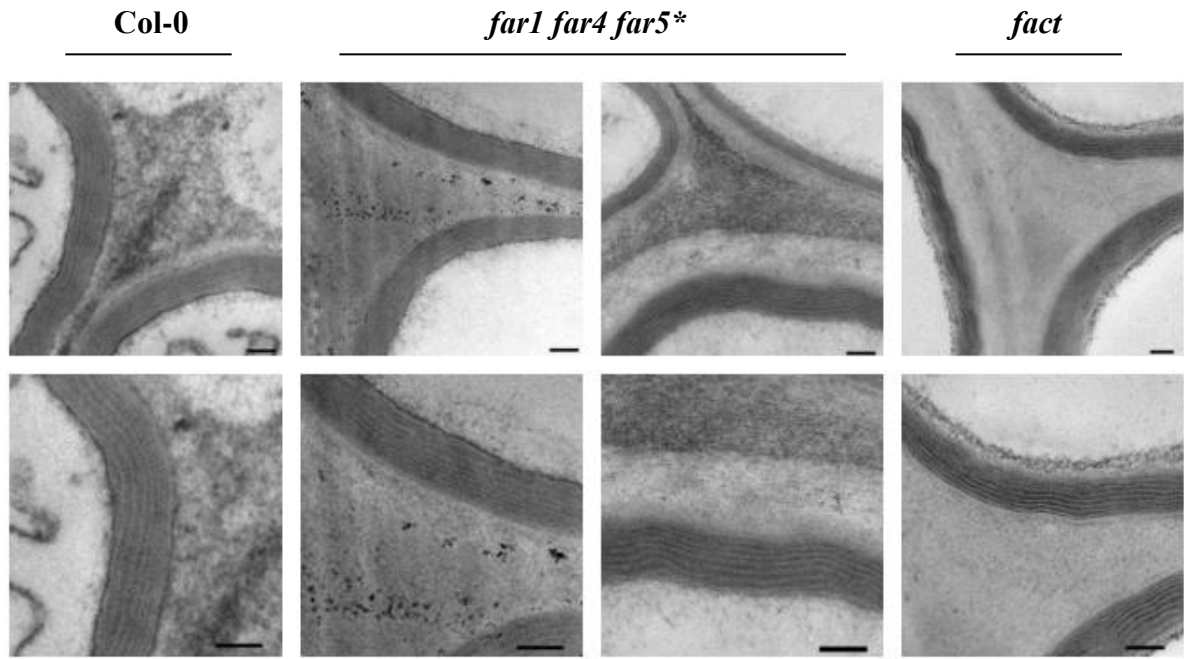


Figure 4

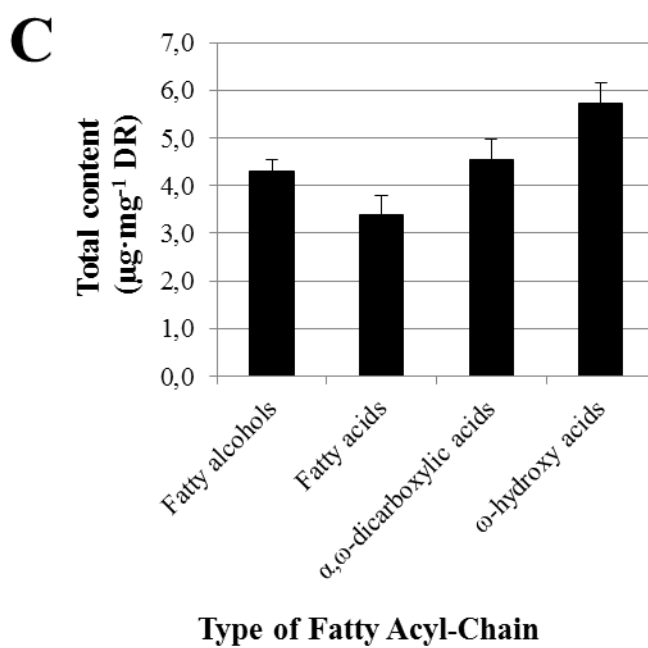
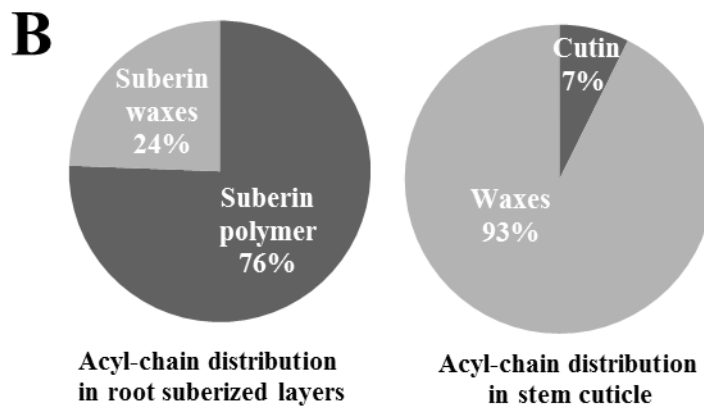
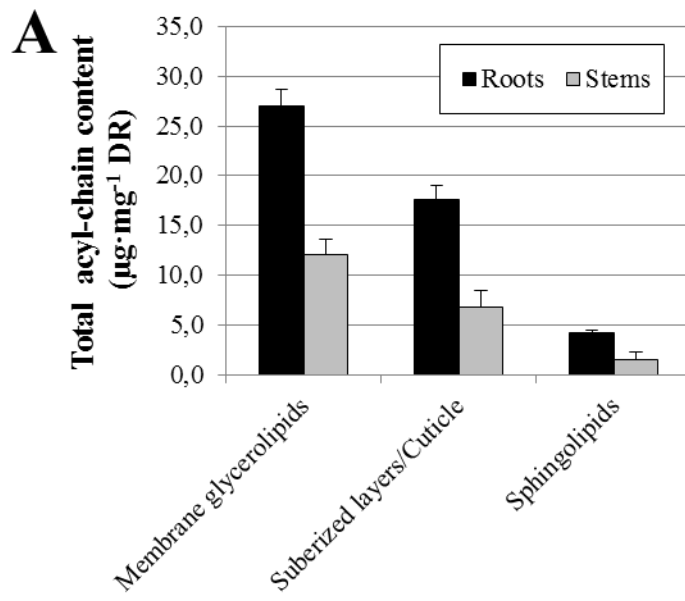


Figure 5

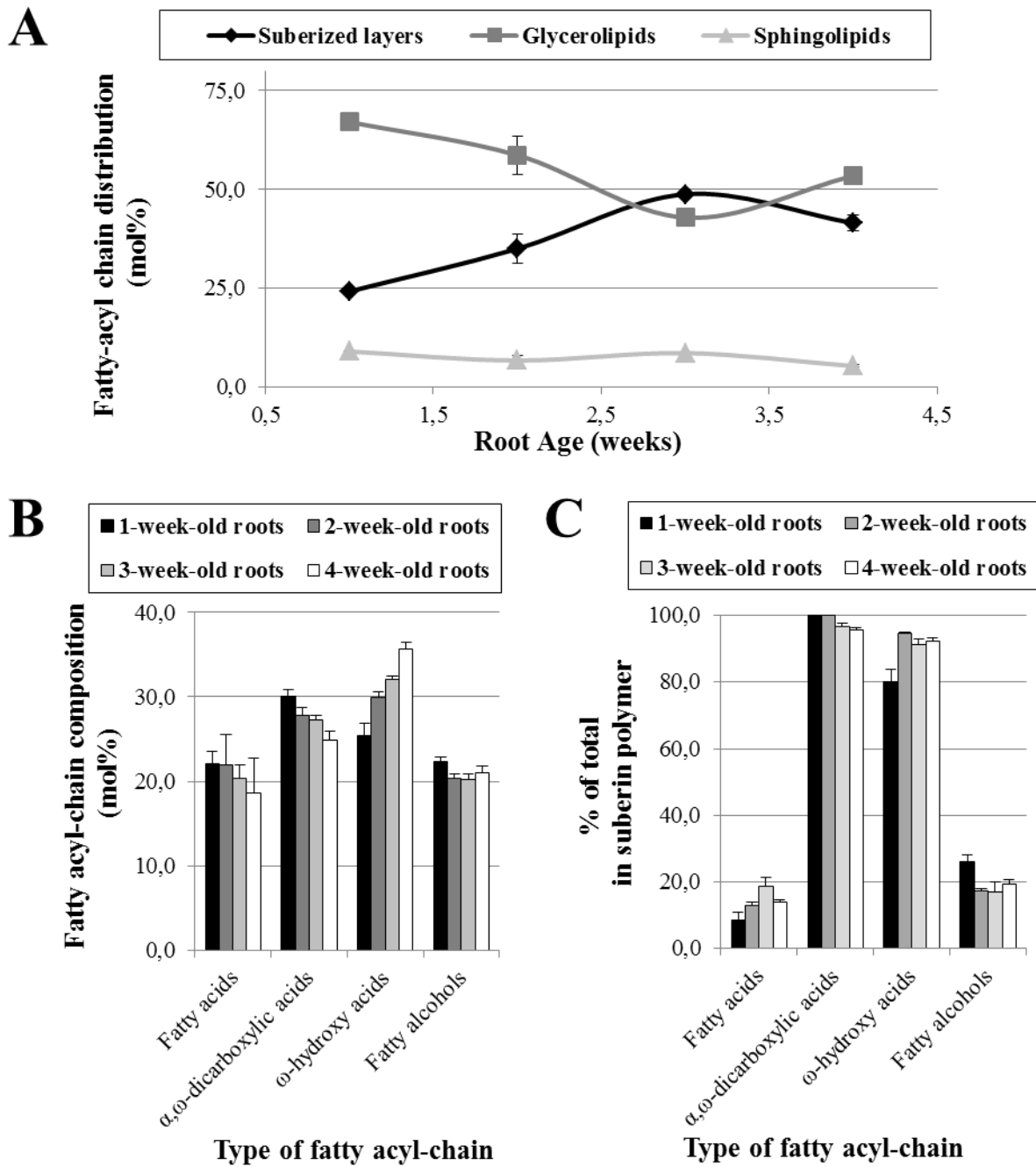


Figure 6

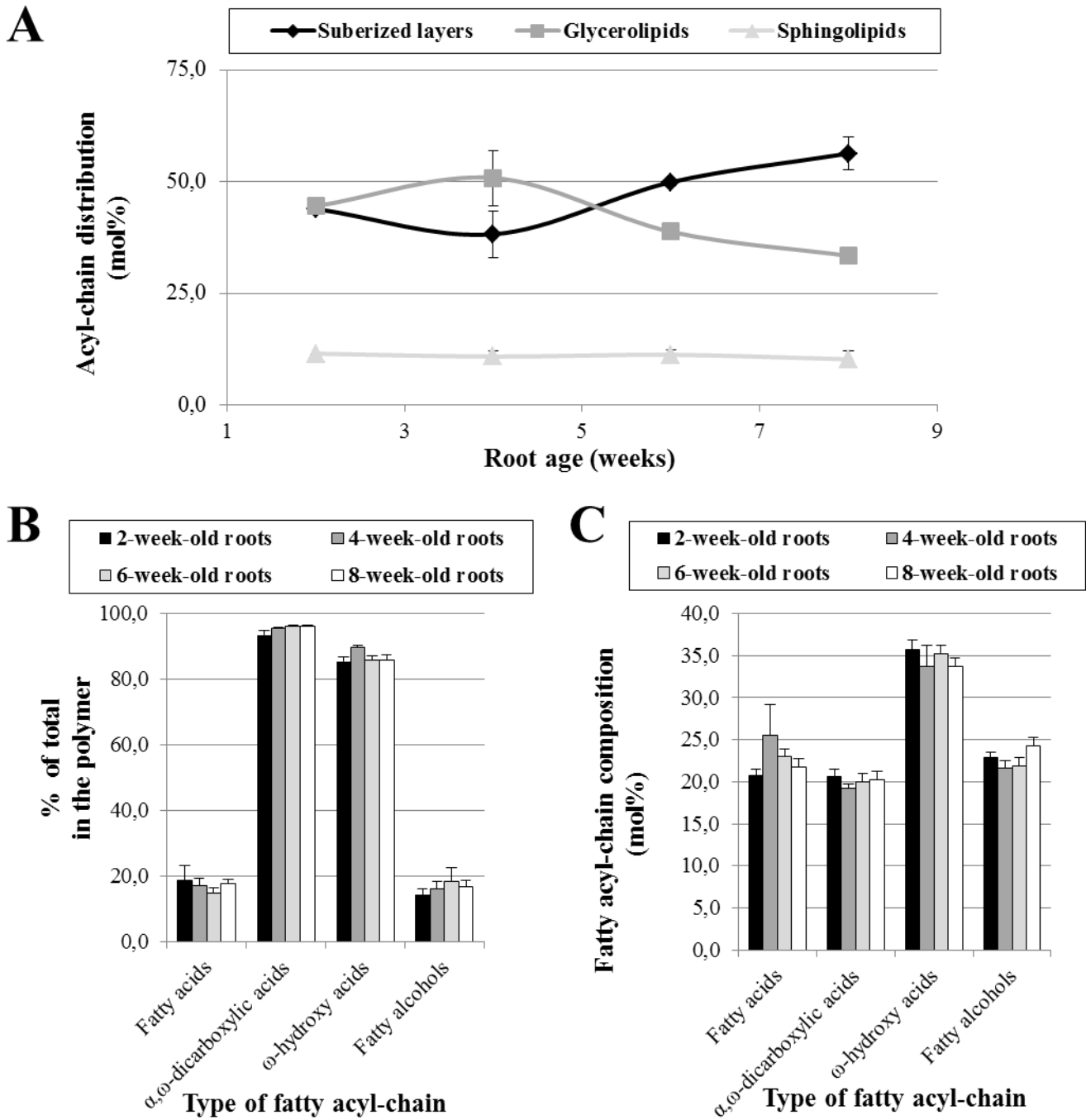


Figure 7

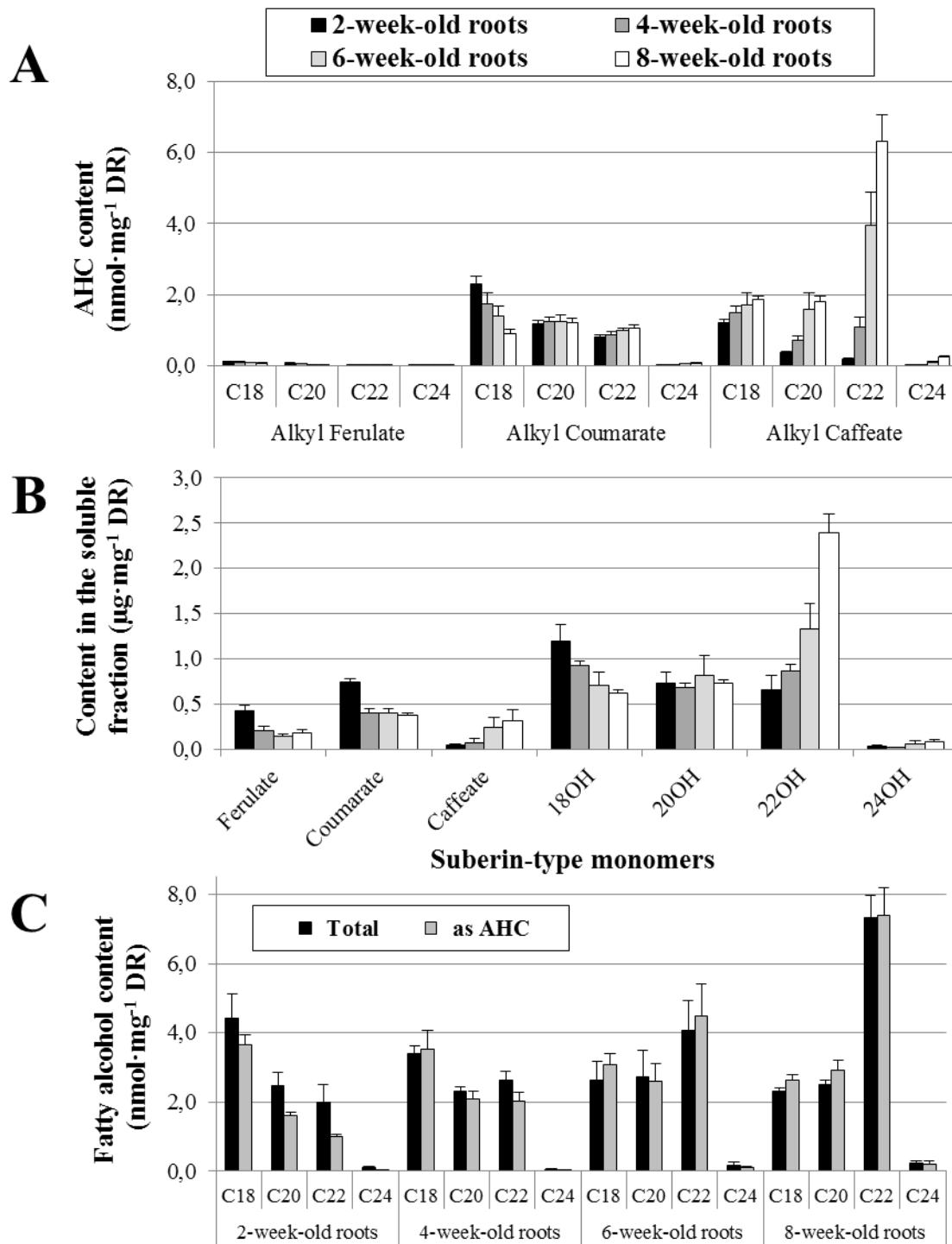
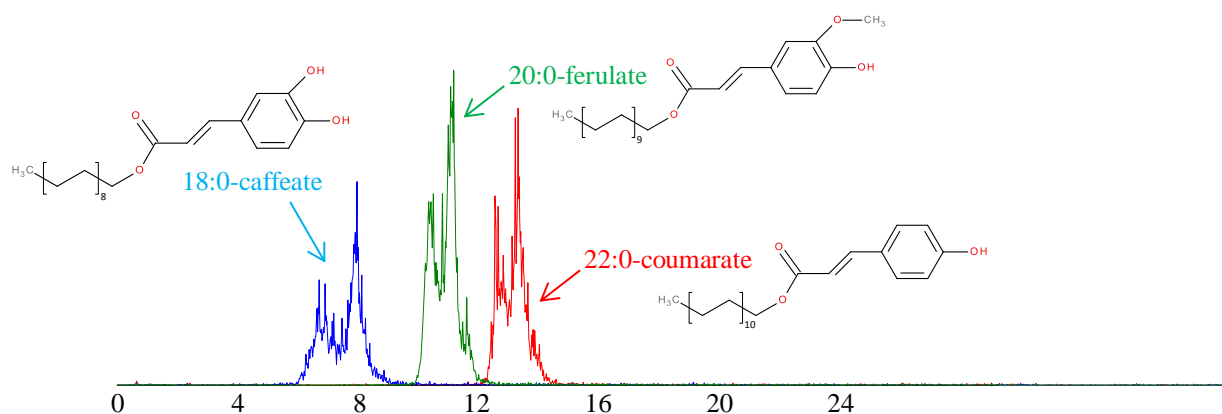


Figure S1

A



B

AHC molecular species	Fatty alcohol	Phenolic	Precursor ion [M+H] ⁺	Daughter ion [R-CH=CH-C=O+H] ⁺ or [R-CH=CH-C=O+H ₂ O+H] ⁺	MRM transitions
18:0-ferulate	18:0	Ferulate	447,5	195,2	447,5/195,2
20:0-ferulate	20:0	Ferulate	475,4	195,2	475,4/195,2
22:0-ferulate	22:0	Ferulate	503,4	195,2	503,4/195,2
24:0-ferulate	24:0	Ferulate	531,5	195,2	531,5/195,2
18:0-coumarate	18:0	Coumarate	417,4	147,1	417,4/147,1
20:0-coumarate	20:0	Coumarate	445,5	147,1	445,5/147,1
22:0-coumarate	22:0	Coumarate	473,5	147,1	473,5/147,1
24:0-coumarate	24:0	Coumarate	501,5	147,1	501,5/147,1
18:0-caffeate	18:0	Caffeate	433,4	163,1	433,4/163,1
19:0-caffeate (IS)	19:0	Caffeate	447,4	163,1	447,4/163,1
20:0-caffeate	20:0	Caffeate	461,4	163,1	461,4/163,1
22:0-caffeate	22:0	Caffeate	489,4	163,1	489,4/163,1
24:0-caffeate	24:0	Caffeate	517,5	163,1	517,5/163,1

C

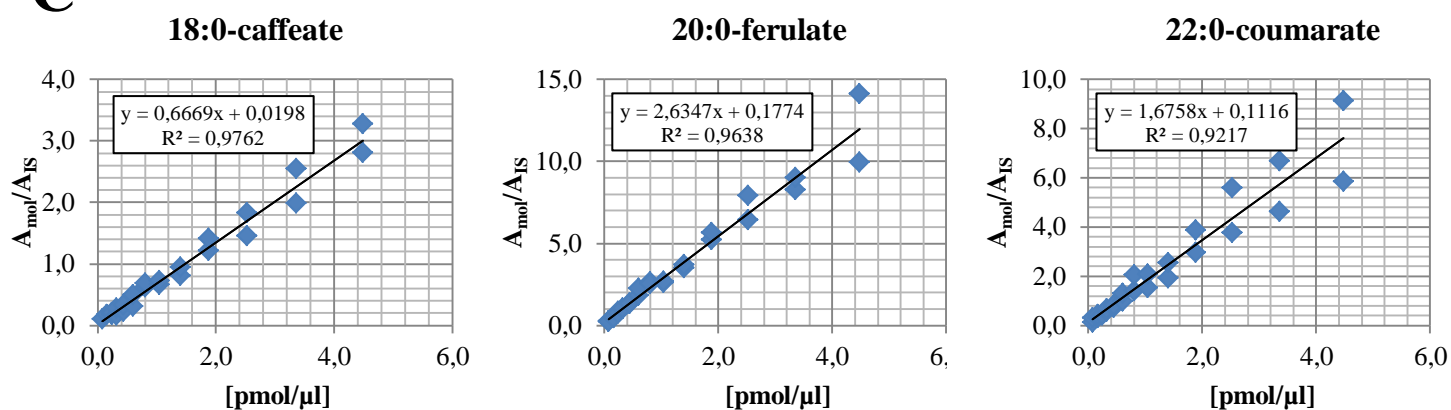


Figure S2

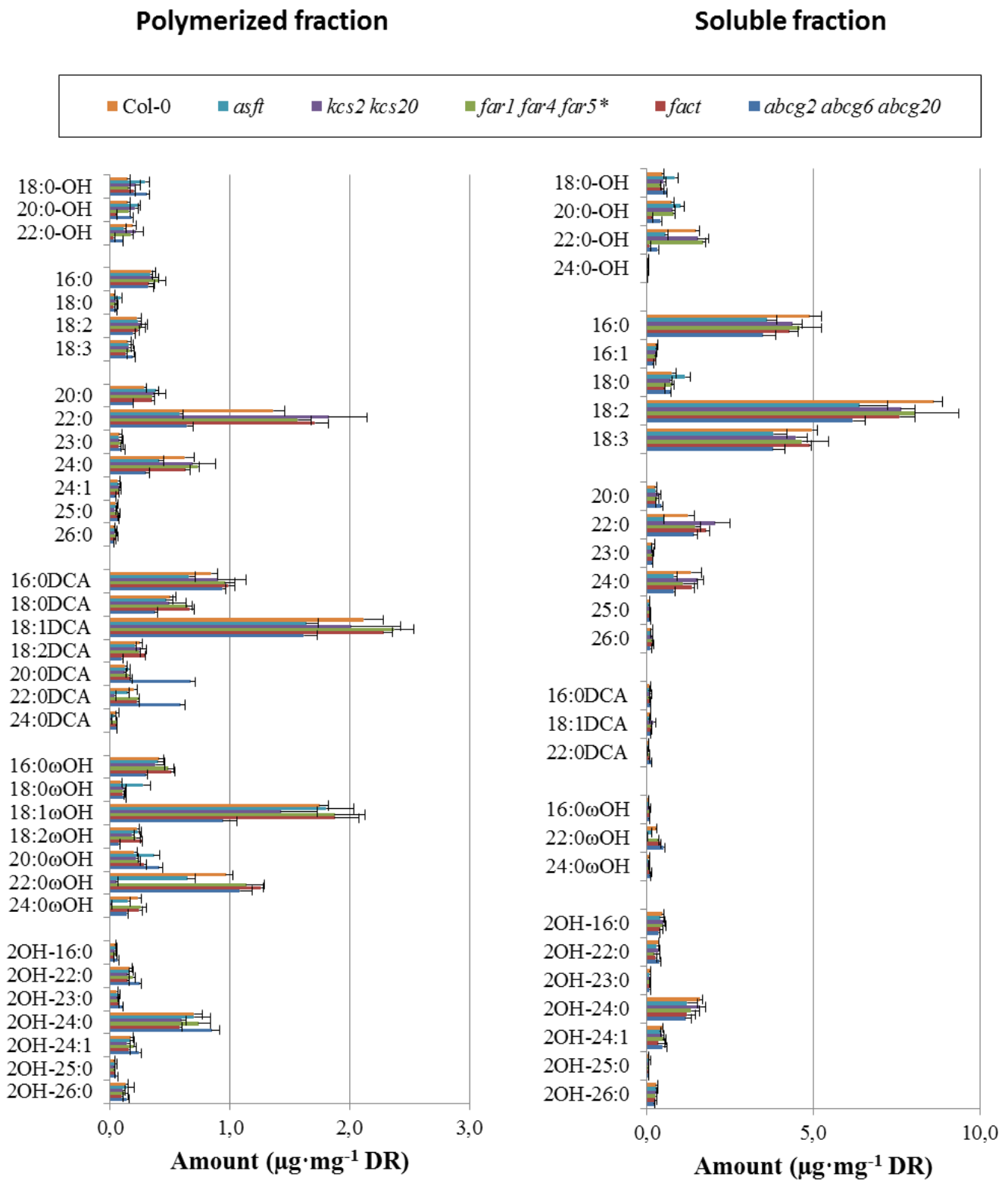


Figure S3

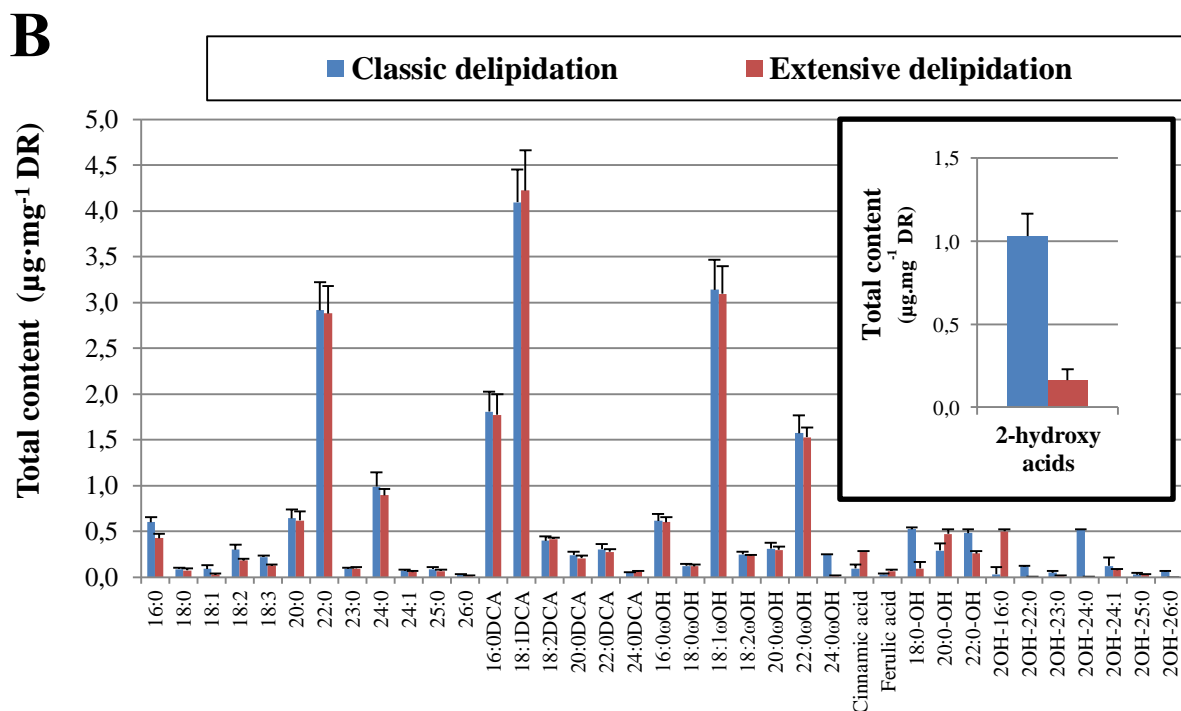
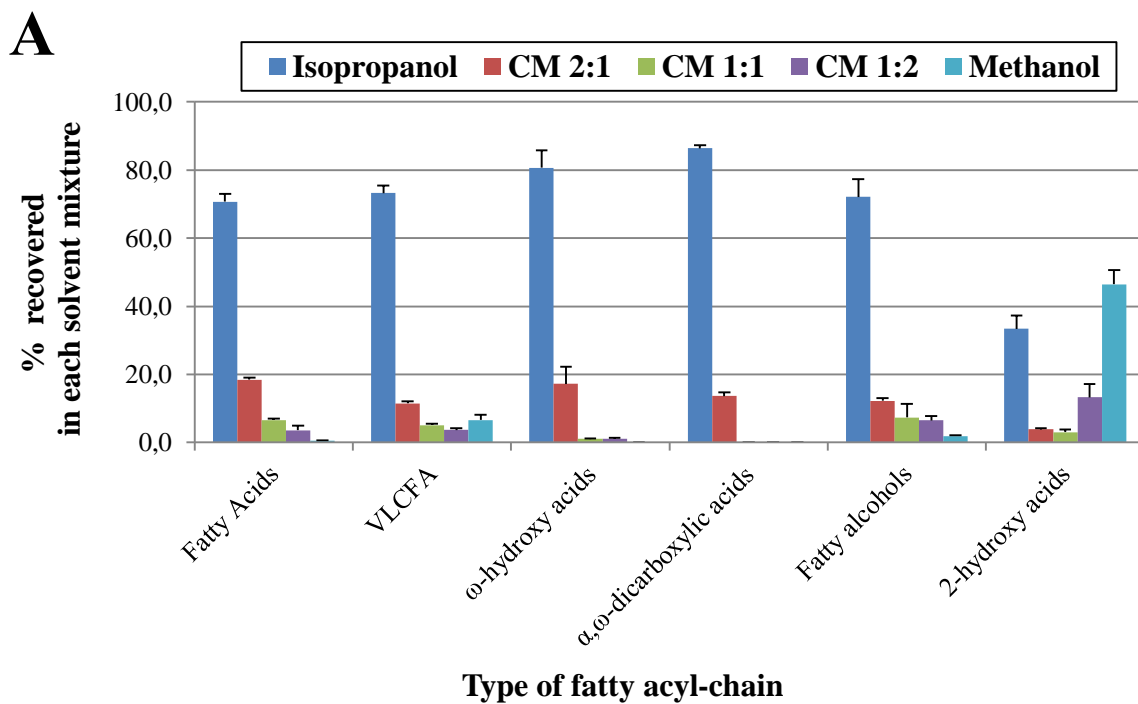


Figure S4

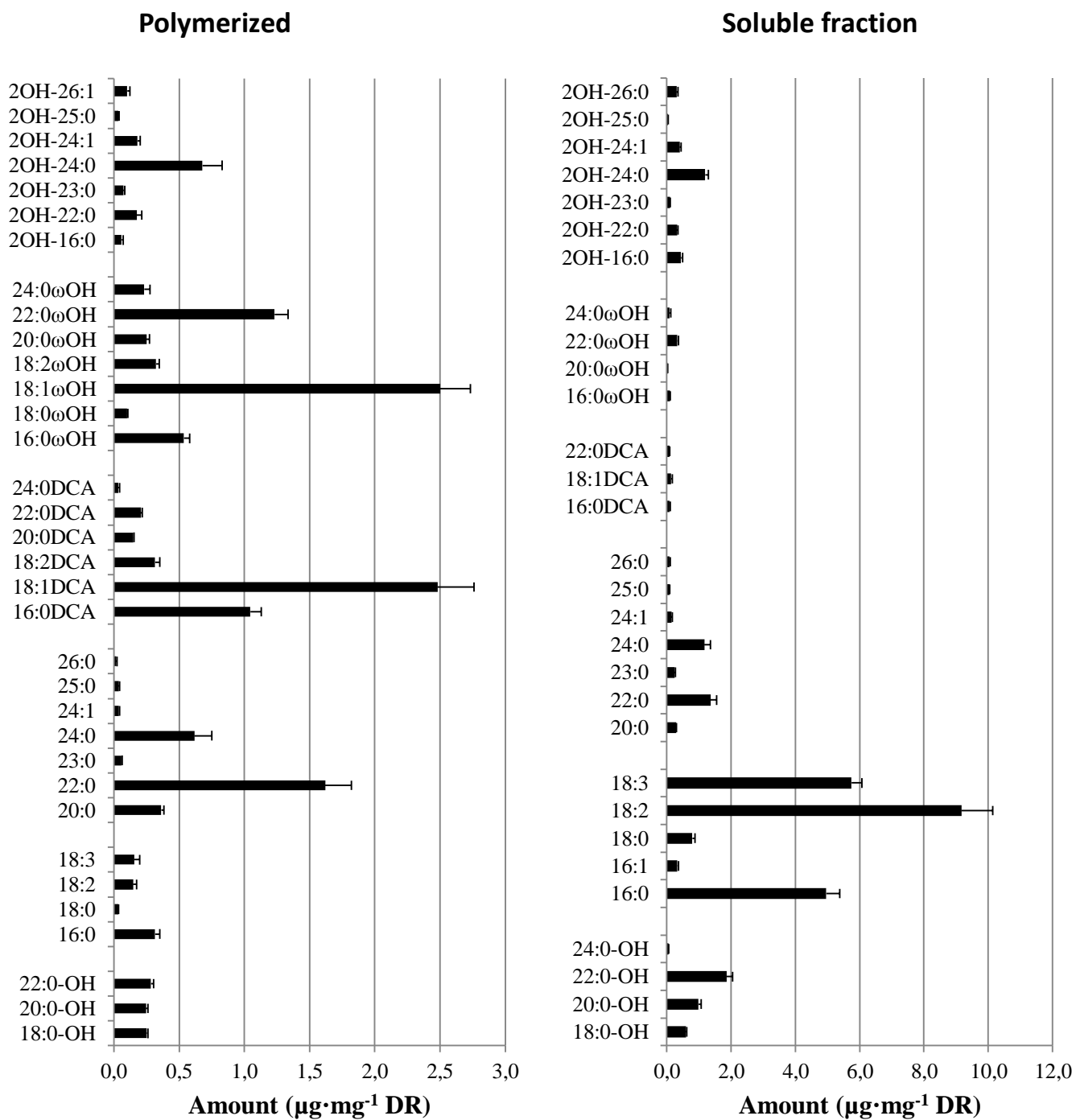


Figure S5

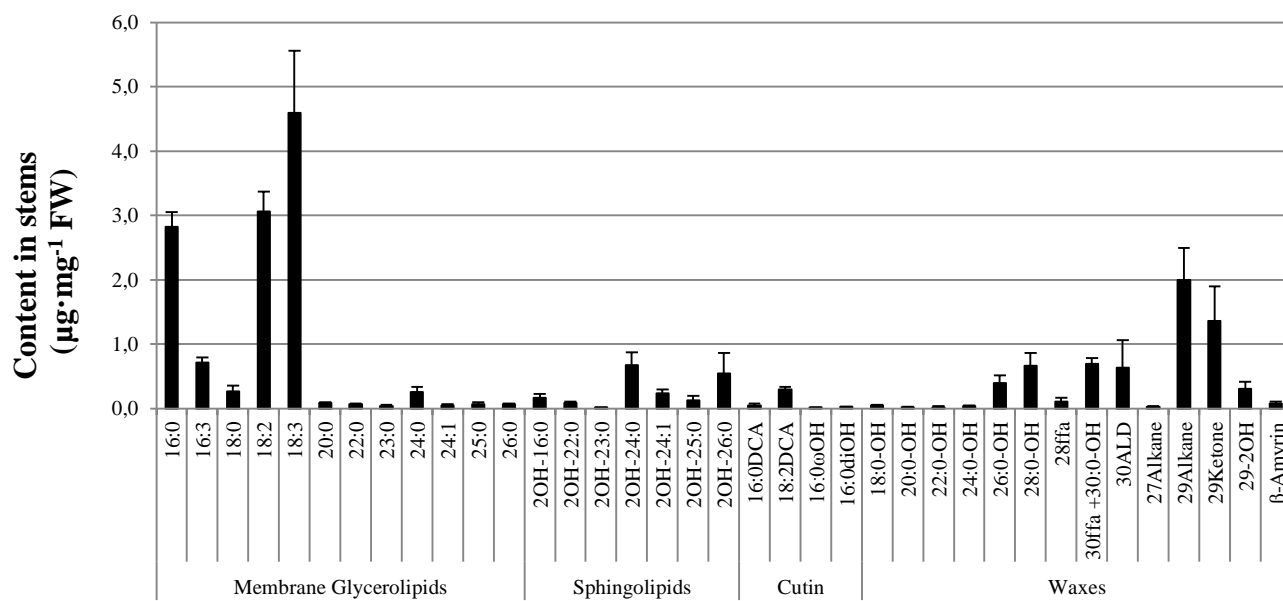
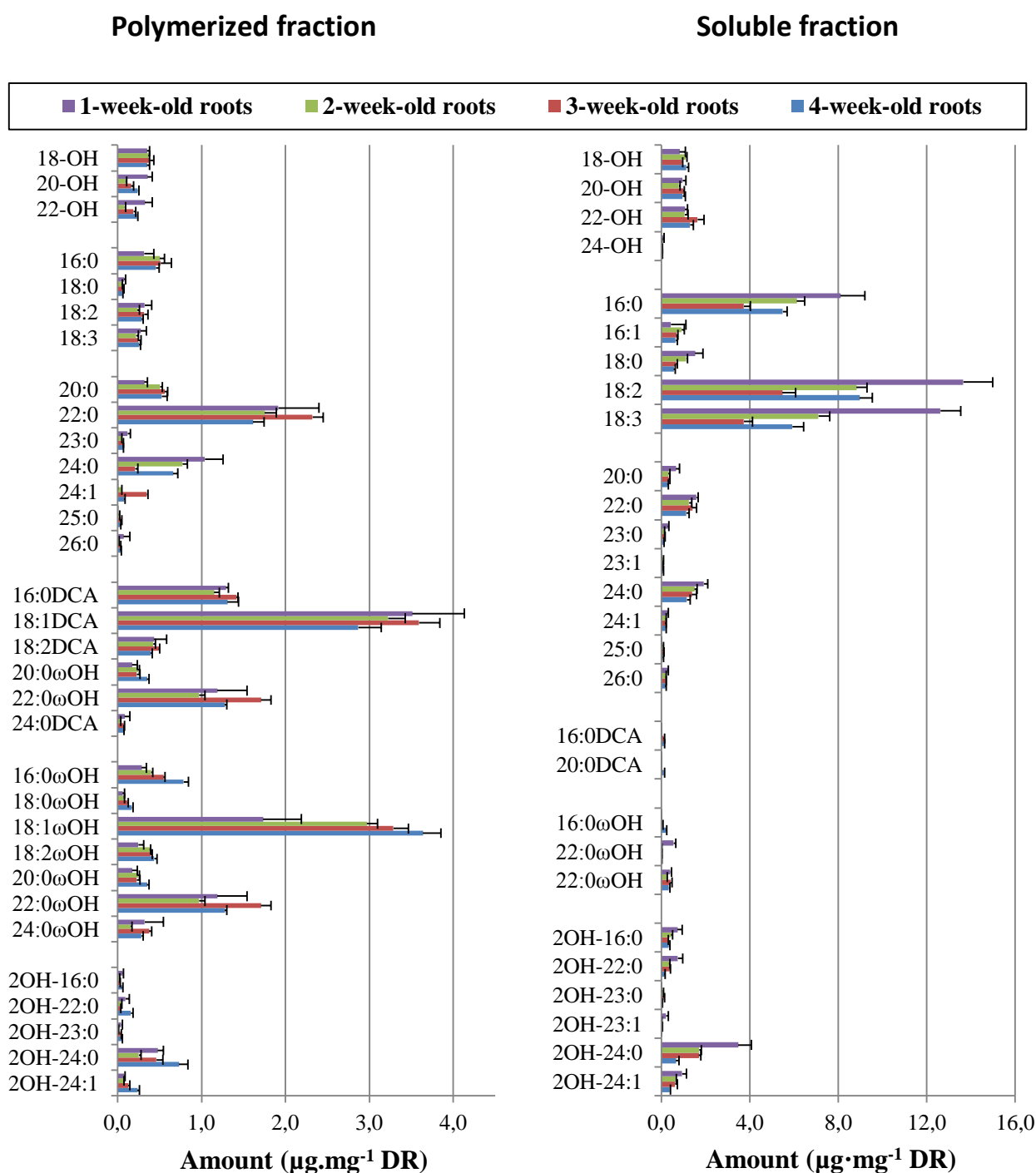


Figure S6



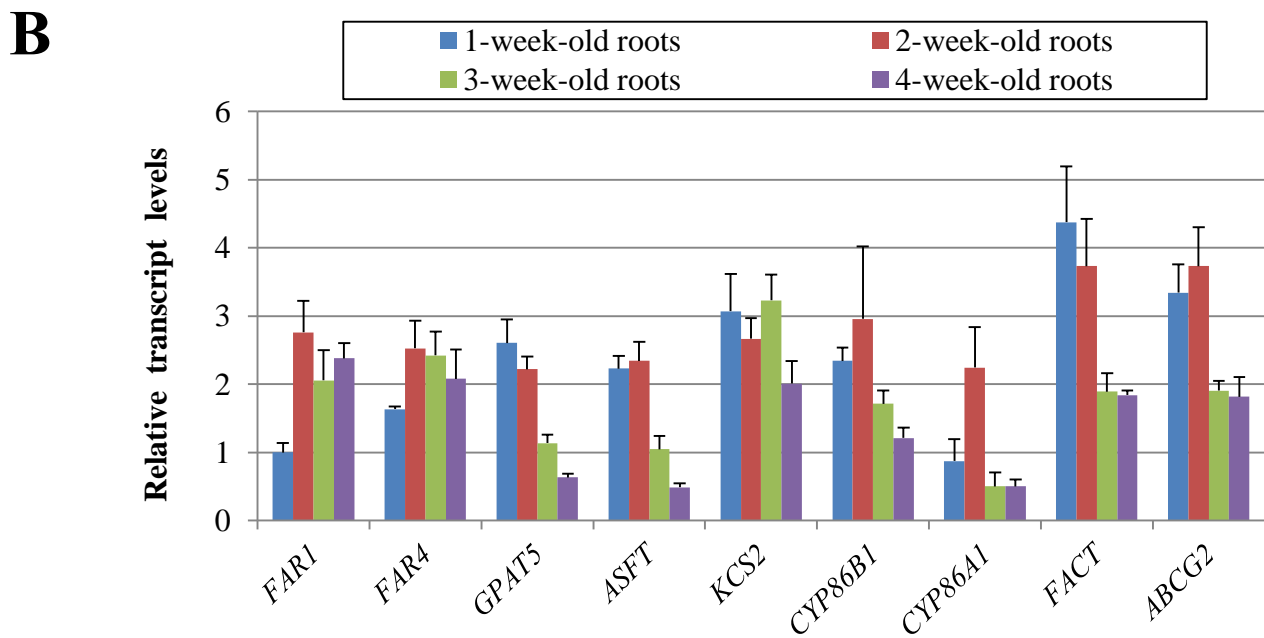
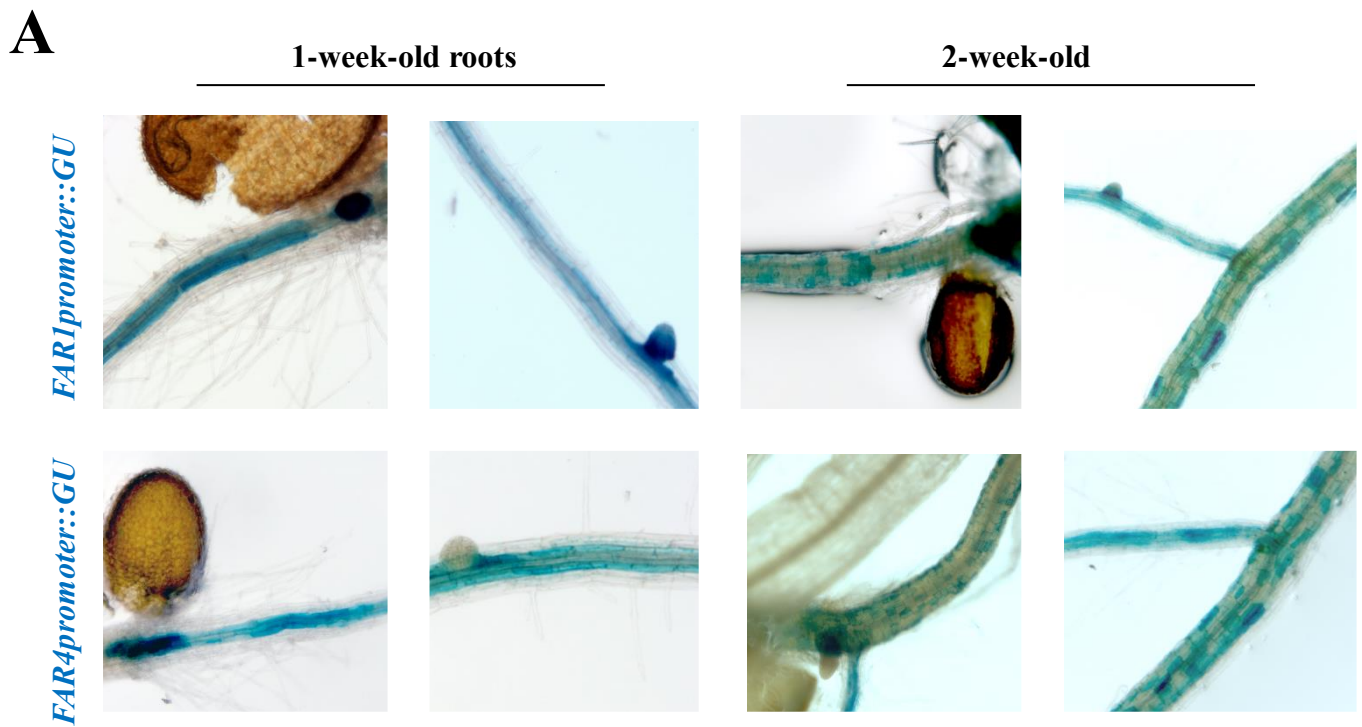
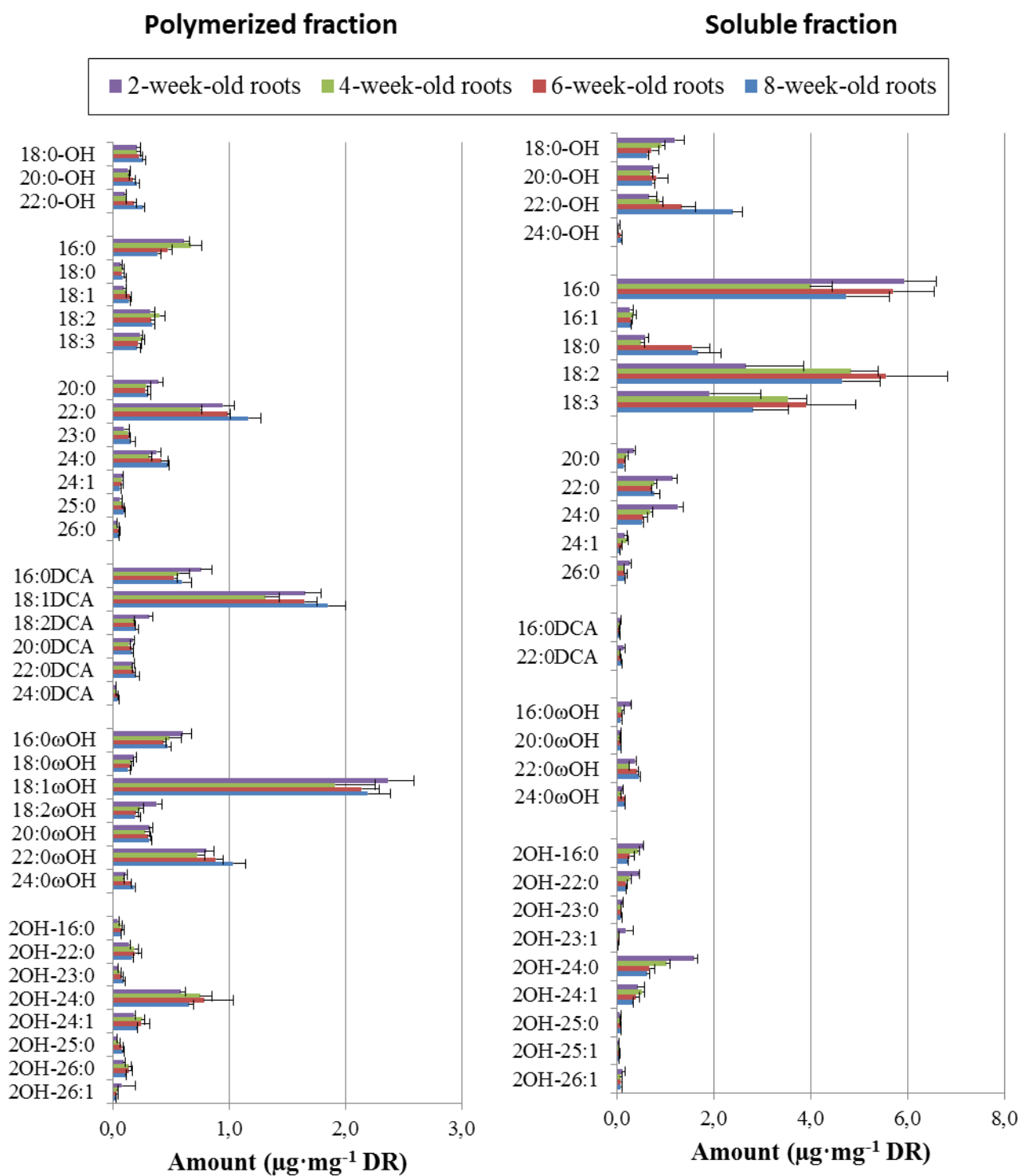


Figure S8



LITERATURE CITED

1. Andersen, T.G., Barberon, M. and Geldner, N. (2015) Suberization-the second life of an endodermal cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28: 9-15
2. Bernards, M. A. (2002). Demystifying Suberin. *Can. J. Bot.* 80: 227-240
3. Buré, C., Cacas, J.-L., Wang, F., Gaudin, K., Domergue, F., Mongrand, S. and Schmitter, J.-M. (2011) Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spec.* 25: 3131-3145
4. Dean, B.B. and Kolattukudy, P.E. (1977) Synthesis of suberin during wound-healing in Jade leaves, tomato fruit, and bean pods. *Plant Physiol.* 58: 411-416
5. Domergue, F., Vishwanath, S.J., Joubès, J., Ono, J., Lee, J., Bourdon, M., Alhattab, R., Lowe, C., Pascal, S., Lessire, R. and Rowland, O. (2010). Three Arabidopsis Fatty Acyl-CoA Reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiol.* 153: 1539-1554
6. Franke, R., Hofer, R., Briesen, I., Emsermann, M., Efremova, N., Yephremov, A. and Schreiber, L. (2009) The DAISY gene from Arabidopsis encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza-micropyle region of seeds. *Plant J.* 57: 80-95
7. Graça, J. and Santos, S. (2006) Glycerol-derived ester oligomers from cork suberin. *Chem. Phys. Lipids* 144: 96–107
8. Graça, J., Cabral, V., Santos, S., Lamosa, P., Serra, O., Molinas, M., Schreiber, L., Kauder, F. and Franke, R. (2015a). Partial depolymerization of genetically modified potato tuber periderm reveals intermolecular linkages in suberin polyester. *Phytochemistry* 117: 209-219
9. Graça, J. (2015b) Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Front Chem.* 3:62
10. Kosma, D.K., Molina, I., Ohlrogge, J.B. and Pollard, M. (2012). Identification of an Arabidopsis fatty alcohol:caffeoyl-coenzyme A acyltransferase required for the synthesis of alkyl hydroxycinnamates in root waxes. *Plant Physiol.* 160: 237-248
11. Kosma, D.K., Rice, A. and Pollard, M. (2015). Analysis of aliphatic waxes associated with root periderm or exodermis from eleven plant species. *Phytochemistry* 117: 351-362
12. Lee, S.B., Jung, S.J., Go, Y.S., Kim, H.U., Kim, J.K., Cho, H.J., Park, O.K. and Suh, M.C. (2009) Two Arabidopsis 3-Ketoacyl CoA Synthase genes, KCS20 and

- KCS2/DAISY, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *Plant J.* 60: 462-475
13. Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J. and Pollard, M. (2007) Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin associated acyltransferase. *Plant Physiol.* 144: 1267-1277
 14. Martinka, M., Dolan, L., Pernas, M., Abe, J. and Lux, A. (2012) Endodermal cell-cell contact is required for the spatial control of Casparian band development in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot.* 110: 361-371
 15. Molina, I., Beisson-Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J. and Pollard, M. (2009) Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-CoA transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiol.* 151: 1317-1328
 16. 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
 17. Nishimura, K., Takenaka, Y., Kishi, M., Tanahashi, T., Yoshida, H., Okuda, C. and Mizushima, Y. (2009) Synthesis and DNA polymerase α and β inhibitory activity of alkyl p-coumarates and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, 57: 476-480
 18. Ranathunge, K., Schreiber, L. and Franke, R. (2011). Suberin research in the genomics era - new interest for an old polymer. *Plant Science* 180:399-413
 19. Razeq, F.M., Kosma, D.K., Rowland, O. and Molina, I. (2014) Extracellular lipids of *Camelina sativa*: characterization of chloroform-extractable waxes from aerial and subterranean surfaces. *Phytochemistry* 106: 188-196
 20. Schreiber, L., Franke, R. and Hartmann, K. (2005). Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpiration. *Planta* 220: 520-530
 21. 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. *Plant J.* 62: 277-290
 22. Soliday, C.L., Kolattukudy, P.E. and Davis, R.W. (1979) Chemical and ultrastructural evidence that waxes associated with the suberin polymer constitute the major diffusion barrier to water vapor in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Planta* 146: 607-614
 23. Thomas, R., Fang, X., Ranathunge, K., Anderson, T.R., Peterson, C.A. and Bernards, M.A. (2007). Soybean root suberin: anatomical distribution, chemical composition,

- and relationship to partial resistance to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol.* 144: 299-311
24. Vishwanath, S.J., Kosma, D.K., Pulsifer, I.P., Scandola, S., Pascal, S., Joubès, J., Dittrich-Domergue, F., Lessire, R., Rowland, O. and Domergue, F. (2013) Suberin-associated fatty alcohols in *Arabidopsis thaliana*: distributions in roots and contributions to seed coat barrier properties. *Plant Physiol.* 163: 1118-1132
 25. Vishwanath, S. J., Delude, C., Domergue, F. and Rowland, O. (2015) Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier. *Plant Cell Rep.* 34: 573-586
 26. Yadav, V., Molina, I., Ranathunge, K., Castillo, I.Q., Rothstein, S.J. and Reed, J.W. (2014) ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 3569-3588
 27. Yang, W.-L. and Bernards, M. (2006). Wound-induced metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) Tubers. *Plant Signal. Behav.* 1: 59-66
 28. Zeier, J., Ruel, K., Ryser, U. and Schreiber, L. (1999) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta.* 209: 1-12

Chapitre 2 - Partie 3 : Export des monomères de subérine

Chez *Arabidopsis*, la cutine et la subérine ont une composition assez proche et la synthèse des précurseurs de ces polymères fait intervenir des protéines appartenant aux mêmes familles d'enzymes. Les connaissances concernant la cutine sont néanmoins plus avancées que celles concernant la subérine puisque des acteurs impliqués dans l'export des molécules de la cuticule ont été caractérisés.

Il a été montré que des ATP-Binding-Cassette transporteurs (ABC transporteurs) de type G sont impliqués dans l'export des lipides formant la cutine (Pighin et al. 2004; Bird et al. 2007; Panikashvili et al. 2007; Ukitsu et al. 2007). Chez les plantes, les ABC transporteurs constituent une large famille de protéines. Le génome d'*Arabidopsis* code pour environ 130 ABC transporteurs classés en huit sous familles. La sous famille G est celle qui regroupe le plus de protéines ABC avec plus de quarante membres. Il a également été montré que des protéines de transfert de lipide non spécifiques possédant une ancre GPI (nsLTPG) sont requises pour l'exportation des cires cuticulaires (De Bono et al. 2009; Kim et al. 2012). Les LTPs sont des petites protéines (<10 kDa) qui possèdent une cavité hydrophobe leur permettant de lier et de transporter des lipides. Chez *Arabidopsis*, les nsLTPs sont codées par une large famille multigénique. La famille des LTPs de type G est la plus importante avec environ trente membres.

Aucun transporteur impliqué dans l'export des monomères de subérine n'avait encore été identifié lorsque j'ai débuté la thèse. Au vu des similitudes entre la cuticule des parties aériennes et la subérine des racines, nous avons logiquement décidé de rechercher chez *Arabidopsis* des candidats pour le transport des précurseurs de subérine appartenant aux familles multigéniques des ABCG transporteurs et des LTPGs. Les candidats ont été sélectionnés parmi des gènes co-exprimés avec des gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine. Une approche de génétique inverse a ensuite été menée afin de déterminer le rôle potentiel des candidats sélectionnés dans le transport des précurseurs de subérine.

Tableau 1 : Liste des gènes candidats sélectionnés. Les gènes sélectionnés codent pour des ABCG transporteurs et des LTPs co-exprimés avec des gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine. Bases de données de co-expression utilisées : ATTED-II et Expression Angler.

	Gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine					
	<i>ASFT</i>	<i>RALPH</i>	<i>GPAT5</i>	<i>FARI</i>	<i>FAR4</i>	<i>FAR5</i>
<i>ABCG</i> co-exprimés						
<i>ABCG6</i> (At5g13580)	**	**	*	*	*	*
<i>ABCG10</i> (At1g53270)	*	*	*		*	*
<i>ABCG20</i> (At3g53510)	*	*	**	*	*	**
<i>LTPG</i> co-exprimés						
<i>LTPG30</i> (At5g13900)	**	**	**		**	*
<i>LTPG15</i> (At2g48130)	**	*	*	*	*	*
<i>LTPG16</i> (At2g48140)	**	*	**	*	**	**
<i>LTPG20</i> (At3g22620)	**	*	*	*	*	*

*Co-exprimés avec ATTED

**Co-exprimés avec Expression Angler

1 - Recherche de candidats impliqués dans le transport des précurseurs de subérine

Des gènes ayant un profil d'expression comparable aux gènes déjà identifiés comme participant à la synthèse de la subérine ont été recherchés à l'aide de base de données de co-expression (ATTED-II : <http://atted.jp/>; Expression Angler : http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi). Nous avons utilisé six gènes correspondant à quatre enzymes clé de la voie de biosynthèse de la subérine comme appâts. Les gènes « appâts » qui ont été utilisés sont : *ASFT* (At5g41040) qui est impliqué dans l'incorporation du férulate dans le polymère de subérine (Molina et al. 2009; Gou et al. 2009), *FAR1*, *FAR4* et *FAR5* (At5g22500, At3g44540 et At3g44550) qui sont responsables de la biosynthèse des alcools gras présents au niveau de la subérine (Domergue et al. 2010), *GPAT5* (At3g11430) qui catalyse l'estérification des chaînes acyles de la subérine sur le glycérol (Beisson. et al. 2007) et *RALPH* (At5g23190) qui catalyse l' ω -hydroxylation des acides gras à très longue chaîne du polymère de subérine (Compagnon et al. 2009). Parmi les gènes co-exprimés avec les gènes « appâts », seuls ceux codant pour des ABC transporteurs et des LTPs de type G ont été présélectionnés. Ainsi, 8 ABCG et 18 LTPG, co-exprimés au moins avec un gène subérine, ont été obtenus. Des gènes candidats ont également été recherchés parmi des gènes d'*Arabidopsis* homologues aux gènes induits lors de la formation du liège, un tissu majoritairement composé de subérine (Soler et al., 2007), et seul *ABCG6* est ressorti de cette recherche. Le fait que certains gènes sont retrouvés à la fois avec ATTED-II et Expression Angler a aussi été pris en compte dans le choix des candidats car cela renforce la significativité des résultats de co-expression. Enfin, les profils d'expression des différents candidats ont été étudiés *in silico* grâce aux serveurs eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/>); AtGenexpress (<http://jsp.weigelworld.org/>) et Genevestigator (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>) afin de confirmer si les gènes sélectionnés étaient bien exprimés au niveau des zones subérisées connues. Au final, nous avons décidé de nous restreindre à trois candidats pour les ABCG et à quatre pour les LTPG. Ces trois ABCG et ces quatre LTPG étaient co-exprimés avec le plus de gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine. Les trois ABCG choisis comme candidats sont *ABCG6* (At5g13580), *ABCG10* (At1g53270) et *ABCG20* (At3g53510). Les quatre gènes codant des LTPs retenus sont *LTPG15* (At2g48130), *LTPG16* (At2g48140), *LTPG20* (At3g22620), et *LTPG30* (At5g13900) (Tableau 1). Il faut signaler que les gènes *LTPG15* (At2g48130) et *LTPG16* (At2g48140) sont situés côte à côte sur le chromosome 2 avec des orientations opposées et

Tableau 2 : Modules de co-expression de *LTPG*. Module I : cuticule, module II : subérine, module III : sporopollénine. D’après Edstam et al. 2013. Les gènes soulignés sont les candidats sélectionnés.

Modules	Gènes
AtI	<i>AtLTPG1</i> , <i>AtLTPG2</i> , <i>AtLTPG6</i>
AtII	<i>AtLTPG5</i> , <u><i>AtLTPG15</i></u> , <u><i>AtLTPG16</i></u> , <i>AtLTPF17</i> , <u><i>AtLTPG20</i></u> , <i>AtLTPG22</i> , <u><i>AtLTPG30</i></u>
AtIII	<i>AtLTPG3</i> , <i>AtLTPG4</i> , <i>AtLTPG23</i> , <i>AtLTPG26</i>

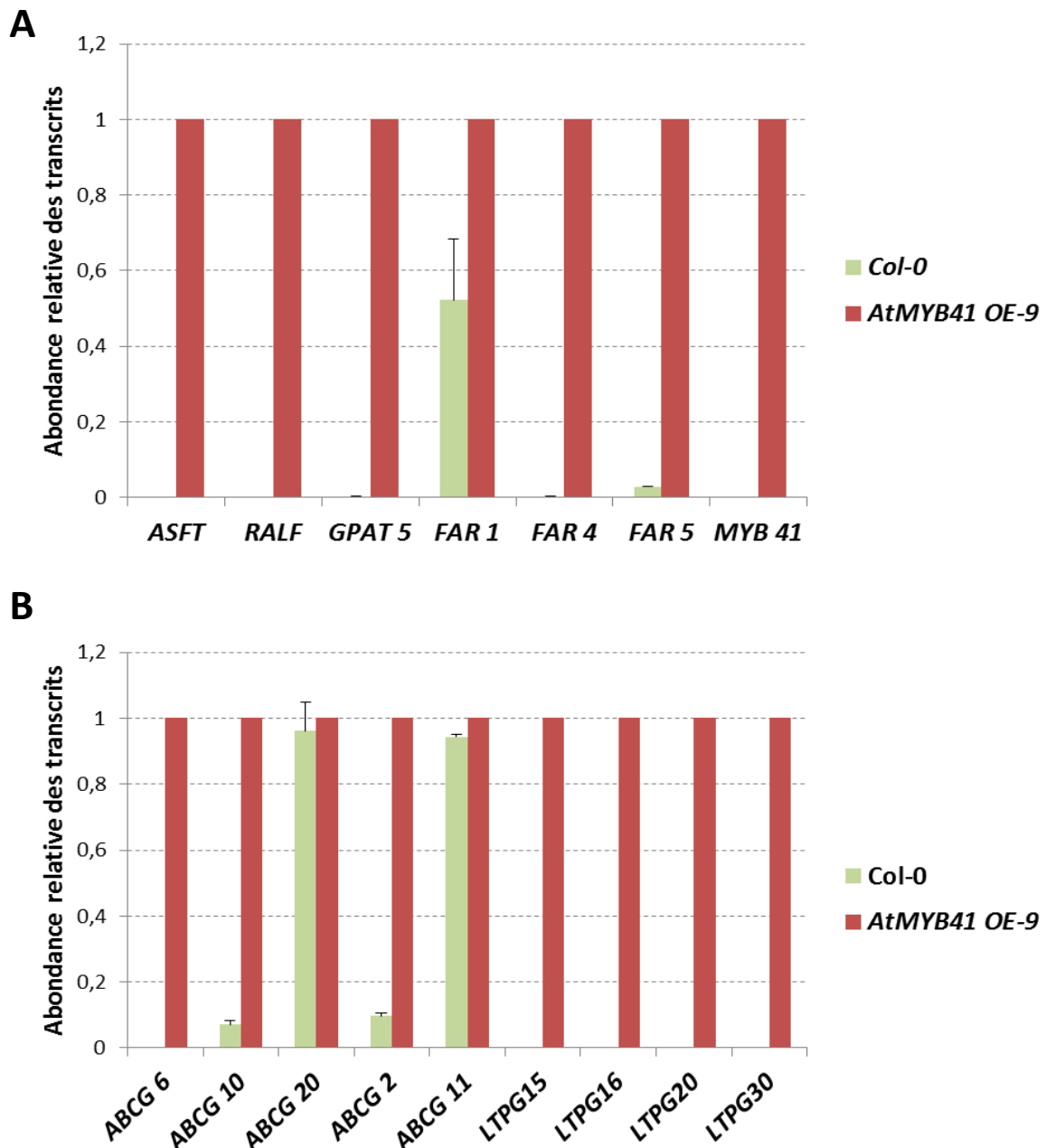


Figure 1 : Abondance relative des transcrits des gènes de biosynthèse de la subérine et des gènes candidats au transport des précurseurs de la subérine dans des feuilles de plantes sauvages Col-0 et de plantes *AtMYB41 OE-9* surexprimant *MYB41*. (A) Gènes de biosynthèse de la subérine. (B) Gènes candidats. Le niveau d’expression des gènes a été déterminé par RT-PCR quantitative. Pour chaque gène, le niveau de transcrits dans le sauvage est relatif au niveau de transcrits dans le surexprimeur qui a été normalisé à 1. Le niveau de transcrits a été normalisé par rapport à l’actine. (n=3).

qu'ils partagent donc leur séquence régulatrice (promoteur). Au cours de ma thèse, plusieurs études publiées ont permis de renforcer le choix des candidats ou même de confirmer leur rôle dans l'export des monomères de subérine. Dans une étude publiée en 2013 par Edstam et ses collaborateurs, les LTPs de type G ont été réparties en trois groupes en fonction de leur domaine d'expression (Tableau 2) et il a été suggéré que les LTPs du module II participaient à la synthèse de la subérine. Les quatre LTPs choisies comme candidates appartiennent toutes au groupe II, renforçant leur rôle putatif dans l'export des précurseurs de subérine. En 2014, Kosma et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de *AtMYB41*, un gène codant pour un facteur de transcription, induisait au niveau des feuilles la surexpression de gènes connus comme étant impliqués dans la synthèse de la subérine, la détection de monomères typiques de la subérine ainsi que la production de structures lamellaires semblables à celles de la subérine. Cominelli et ses collaborateurs avaient déjà établi en 2008 une liste des gènes surexprimés et sous exprimés chez des lignées d'*Arabidopsis* surexprimant *AtMYB41*. Trois des LTP candidates (LTPG16, LTPG20 et LPG30) ainsi que le transporteur ABCG6 figuraient dans cette liste. Enfin en 2014, l'étude de Yadav et ses collaborateurs, a confirmé l'implication de deux de nos candidats (ABCG6 et ABCG20) dans l'export des précurseurs de subérine.

Nous avons utilisé les plantes surexprimant *MYB41* générées par Kosma et ses collaborateurs (2014) pour évaluer l'expression de nos gènes « appâts » et candidats. Nous avons également évalué l'expression du gène *ABCG2*, un des ABCG transporteurs identifié comme étant requis pour l'export des précurseurs de subérine dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014) mais non sélectionné au cours de notre recherche de gènes candidats. L'expression du gène *ABCG11* a également été étudiée. En effet, si de nombreuses études réalisées sur ce gène ont démontré son implication dans l'export des précurseurs de la cuticule, une parmi elles (Panikashvili et al. 2010) a proposé que *ABCG11* jouerait aussi un rôle dans le transport des monomères de subérine. Tous les gènes « appâts » sont clairement surexprimés dans la lignée *AtMYB41* OE-9 surexprimant *MYB41* (Figure 1A), en accord avec les résultats obtenus par Kosma et al., (2014). Les gènes codant pour les transporteurs ABCG2 et ABCG6 sont aussi surexprimés dans la lignée *AtMYB41* OE-9 (Figure 1B) confirmant les résultats de transcriptomiques obtenus pour *ABCG6* par Cominelli et ses collaborateurs (2008) et leur rôle dans le transport des monomères de subérine proposé par Yadav et ses collaborateurs (2014). Bien qu'*ABCG20* ait été caractérisé comme étant

Tableau 3 : Pourcentage d'identité entre les différentes séquences protéiques des candidats obtenu à partir de l'alignement réalisé avec Geneious. aa, taille des protéines en acides aminés.

	aa	ABCG6	ABCG10
ABCG6	727		
ABCG10	590	29,36%	
ABCG20	732	64,35%	30,84%

	aa	LTPG15	LTPG16	LTPG20
LTPG15	183			
LTPG16	200	24,88%		
LTPG20	203	27,04%	36,97%	
LTPG30	151	19,88%	17,07%	14,63%

impliqué dans le transport de la subérine dans cette même étude, son niveau d'expression chez le surexprimeur est similaire à celui du sauvage (Figure 1B). Il se peut néanmoins qu'un autre facteur de transcription régule *ABCG20*. Comme *ABCG2* et *ABCG6*, *ABCG10* est lui aussi surexprimé dans la lignée *AtMYB41* OE-9, ce qui renforce son rôle potentiel dans le transport de la subérine. A l'inverse, le gène *ABGC11*, pour lequel un rôle dans le transport de la subérine a été proposé par Panikashvili et ses collaborateurs (2011), n'est pas surexprimé dans la lignée surexprimant *AtMYB41* (Figure 1B). Il est donc peu probable que le transporteur *ABCG11* soit directement impliqué dans l'export des précurseurs de la subérine. Pour ce qui est des gènes codant pour les quatre LTPG candidates (*LTPG15*, *LTPG16*, *LTPG20* et *LTPG30*), ils sont tous fortement surexprimés dans *AtMYB41* OE-9 (Figure 1B), en accord avec les résultats obtenus par Cominelli et ses collaborateurs (2008) pour *LTPG16*, *LTPG20* et *LTPG30*.

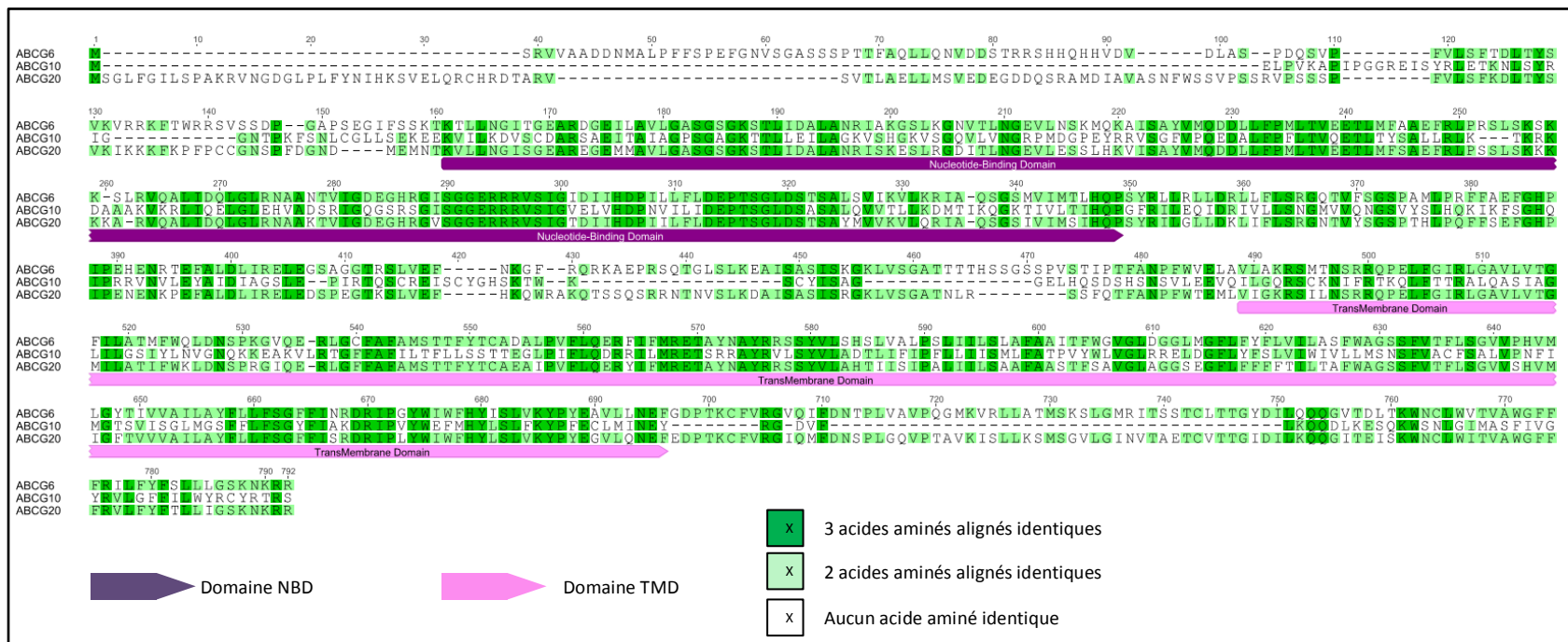
Au final, tout comme les gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine, la majorité des gènes candidats que nous avons sélectionnés sont surexprimés lorsque *AtMYB41* est surexprimé. Nos gènes candidats pourraient donc aussi être régulés par ce facteur de transcription, et impliqués dans la formation de la subérine déposée dans les feuilles surexprimant *AtMYB41*. Néanmoins, il a été montré que *AtMYB41* était exprimé seulement en condition stressée (Kosma et al. 2014). Nos gènes candidats pourraient alors être requis pour la synthèse de subérine uniquement en condition de stress. Le transporteur *ABCG20*, qui, d'après Yadav et ses collaborateurs (2014) est impliqué dans l'export des précurseurs de subérine, ne semble pas être régulé par *AtMYB41* dans la lignée *AtMYB41* O9-E. Cela suggère que d'autres facteurs de transcription qui n'ont pas encore été identifiés participeraient à la régulation de la synthèse de la subérine (Rowland, 2015).

2 - Analyses *in silico* des candidats

2 - 1 - Analyses des séquences protéiques

Les séquences des protéines candidates ont été alignées avec Geneious6.1.2 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012) et analysées avec BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) afin d'évaluer les homologies (Tableau 3) et de déterminer

A



B

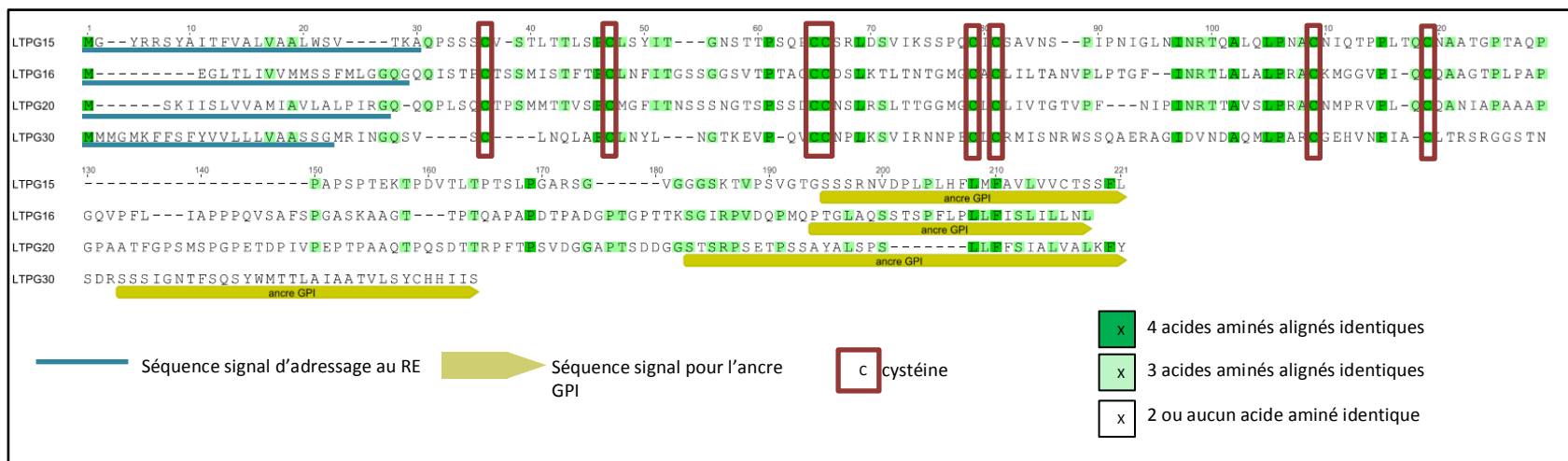


Figure 2 : Alignement global des séquences protéiques ABCG et LTPG candidates. Matrice : Blossum 62. Gap open penalty : 10. Gap extension penalty : 0.5. Refinement interactions : 2. Les domaines et motifs spécifiques à chaque famille de protéines sont indiqués sur les alignements.

les domaines spécifiques des familles auxquelles appartiennent les protéines candidates (Figure 2). ABCG6 et ABCG20 possèdent 64% d'identité de séquence protéique alors que ces derniers n'ont respectivement que 29% et 31% d'identité de séquence protéique avec ABCG10 (Tableau 3). Néanmoins, ABCG6 et ABCG20 ont une longueur de séquence d'environ 700 acides aminés alors qu'ABCG10 ne comporte que 590 acides aminés. De plus, sur l'arbre phylogénétique proposé par Kang et ses collaborateurs (2011) (Figure 16 de l'introduction), ABCG6 et ABCG20 appartiennent à un clade différent de ABCG10 indiquant une divergence évolutive entre ces protéines. Comme tous les ABCG WBC transporteurs, les trois protéines ABCG candidates possèdent un domaine NBD et un domaine TMD (Figure 2A). Le programme de prédiction de domaines transmembranaire utilisé, TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), propose six domaines transmembranaires (hélices alpha) situés dans la partie TMD pour les trois protéines candidates. Les domaines TMD des ABC transporteurs contiennent généralement quatre à six hélices transmembranaires (Rea, 2007).

LTPG16 et LTPG20 sont les protéines partageant le pourcentage d'identité de séquence le plus important (37%) parmi les quatre LTPG sélectionnées (Tableau 3). Les quatre LTPGs sélectionnées présentent toutes le motif C-X_n-C-X_n-CC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C typique de la famille des LTPs non spécifiques (Figure 2B). Ces huit cystéines forment quatre ponts disulfures qui permettent de stabiliser la structure tertiaires des protéines. La séquence signal pour les ancres GPI ainsi que la séquence du peptide signal d'adressage au RE ont été indiquées pour chaque LTPG candidates sur l'alignement des séquences protéiques (Figure 2B). Un logiciel (http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html) a été utilisé pour identifier la séquence signal pour l'ancre GPI. Les séquences signal d'adressage au RE ont été déterminées avec SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

2 - 2 - Profils d'expression

Les profils d'expression des gènes candidats et des gènes « appâts » ont été étudiés avec les logiciels eFP Browser du BAR (<http://bar.utoronto.ca/>), AtGenexpress (<http://jsp.weigelworld.org>) et Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>). Ces logiciels intègrent et facilitent l'interprétation de données d'expression obtenues à partir des nombreuses analyses faites par puces à ADN et RNA-seq. L'outil eFP Browser du BAR

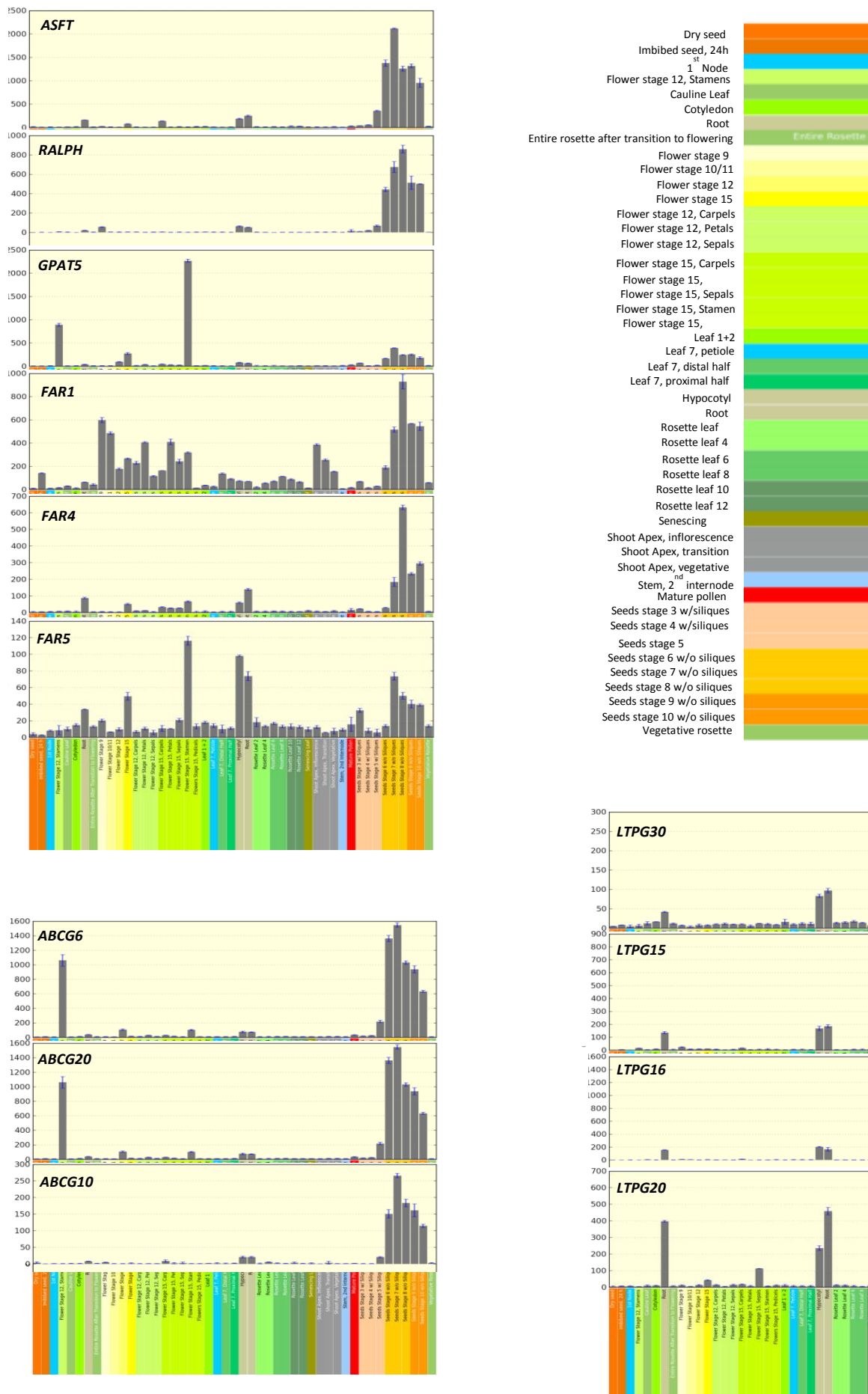


Figure 3 : Profils d'expression des gènes candidats et de gènes de biosynthèse de la subérine au cours du développement obtenus à partir d'Arabidopsis eFP Browser.

permet, entre autres, de déterminer les domaines d'expression d'un gène dans les différents tissus d'*Arabidopsis thaliana* au cours du développement.

D'après les résultats obtenus avec eFP Browser (Figure 3), tous les gènes « appâts » sont exprimés dans les graines aux stades 6 à 10 du développement qui correspondent à la phase de maturation de la graine avant l'entrée en dormance. Cette phase se caractérise par une augmentation de la taille de l'embryon et une accumulation de réserves. Tous les gènes « appâts » sont aussi exprimés dans les racines et l'hypocotyle de jeunes plantules (stade 2 cotylédons) ainsi que dans les racines de plantes plus âgées. Une expression dans les étamines des fleurs entre les stades 12 et 15, qui correspondent aux stades tardifs du développement des grains de pollens, est aussi relevée pour les gènes *GPAT5* et *FAR5*. Contrairement aux autres gènes « appâts » qui sont uniquement exprimés dans les graines, les racines et pour certains les étamines, le gène *FAR1* a une expression plus générale. Il est en effet exprimé tout au long du développement des fleurs ainsi que dans les feuilles de la rosette, en accord avec nos données de qPCR (Figure 1). En comparant les profils d'expression des différents gènes « appâts », il semble que seuls *ASFT*, *RALPH* et *FAR4* décrivent parfaitement les tissus constitutivement subérisés chez *Arabidopsis* puisque ces trois gènes sont exprimés exclusivement dans les racines et les graines.

Tous les gènes candidats ont un niveau d'expression élevé dans les graines (stades 6 à 10) comme les gènes « appâts ». Ils sont aussi tous exprimés dans les racines et l'hypocotyle. *ABCG6* et *ABCG20* sont de plus exprimés dans les étamines des fleurs (au stade 12 de développement). *ABCG6* et *ABGC20* ont donc un profil d'expression très similaire à celui de *GPAT5* et *FAR5* alors que *ABCG10* et les quatre *LTPG* ont un profil semblable à ceux de *ASFT*, *RALPH* et *FAR4*, qui sont les gènes ayant le profil d'expression typique des gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine.

Les résultats obtenus avec AtGenexpress proposent une représentation graphique qui permet de visualiser rapidement les tissus dans lesquels les gènes sont le plus exprimés (Figure 4). Les domaines d'expression de nos gènes d'intérêt obtenus sur ce site sont néanmoins très similaires à ceux de eFP Browser : *ABCG6*, *ABGC20*, *GPAT5*, *FAR4* et *FAR5* sont exprimés dans les graines, les racines, l'hypocotyle et les étamines des fleurs, alors que *ABCG10*, les quatre *LTP*, *ASFT* et *RALPH* sont exprimés plus spécifiquement dans les racines et les graines (Figure 4). Enfin, *FAR1* présente un domaine d'expression beaucoup plus homogène puisque son expression est détectée dans de très nombreux tissus (Figure 4).

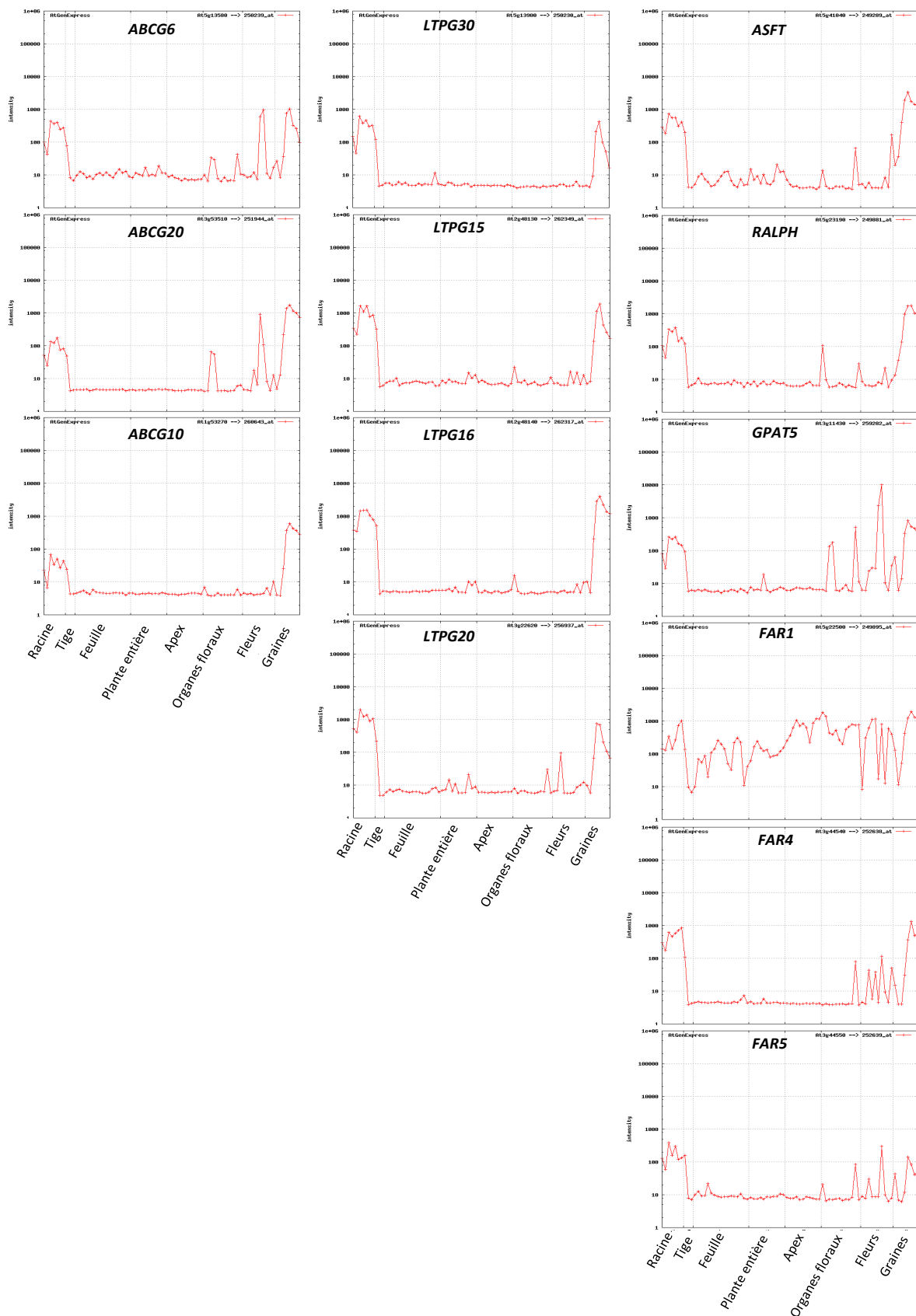


Figure 4 : Profils d'expression des gènes candidats et de gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine obtenus à partir d'AtGenexpress.

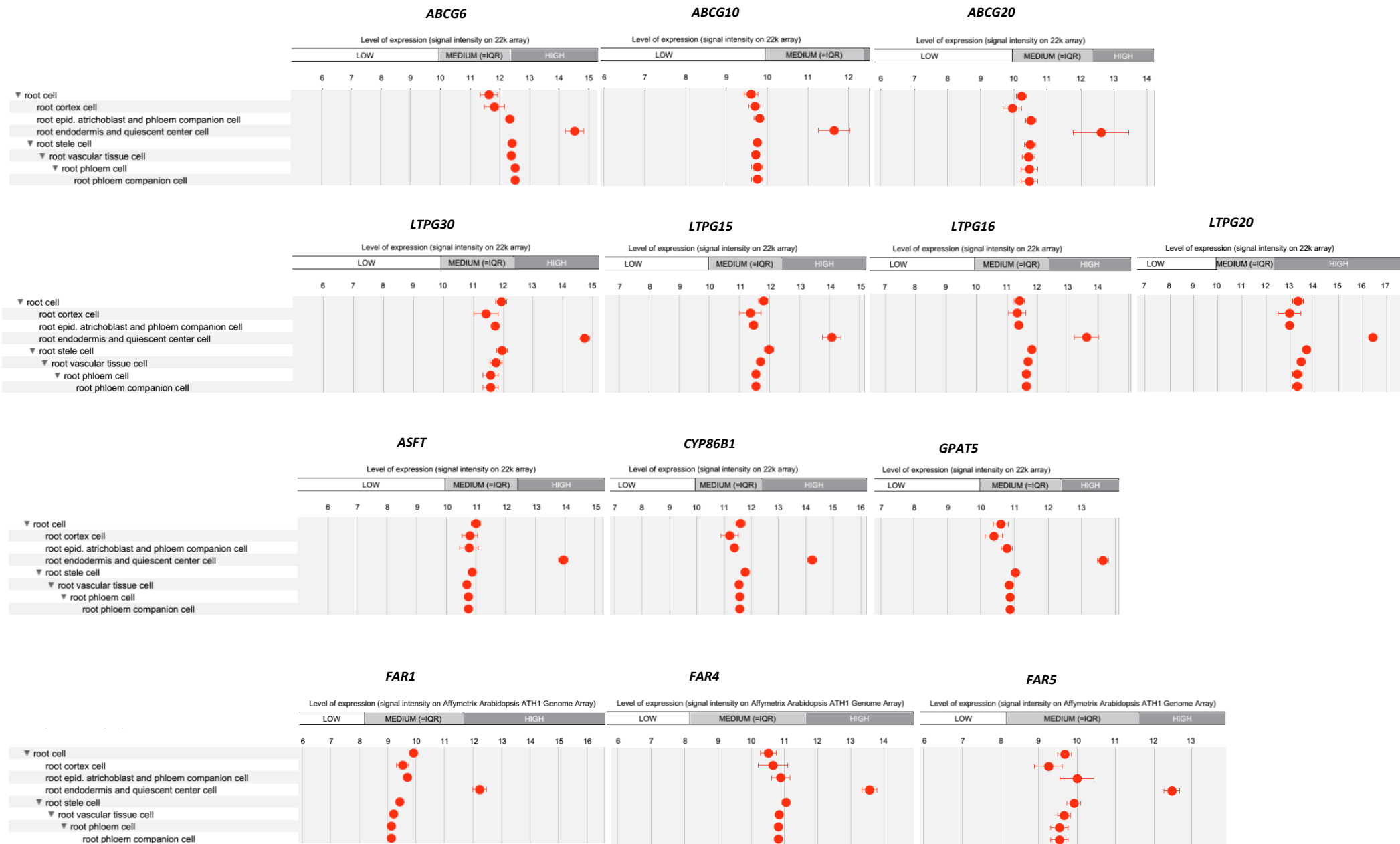


Figure 5 : Profils d'expression des gènes candidats et des gènes de biosynthèse de la subérine dans les cellules racinaires. Les profils ont été obtenus à partir de Genevestigator.

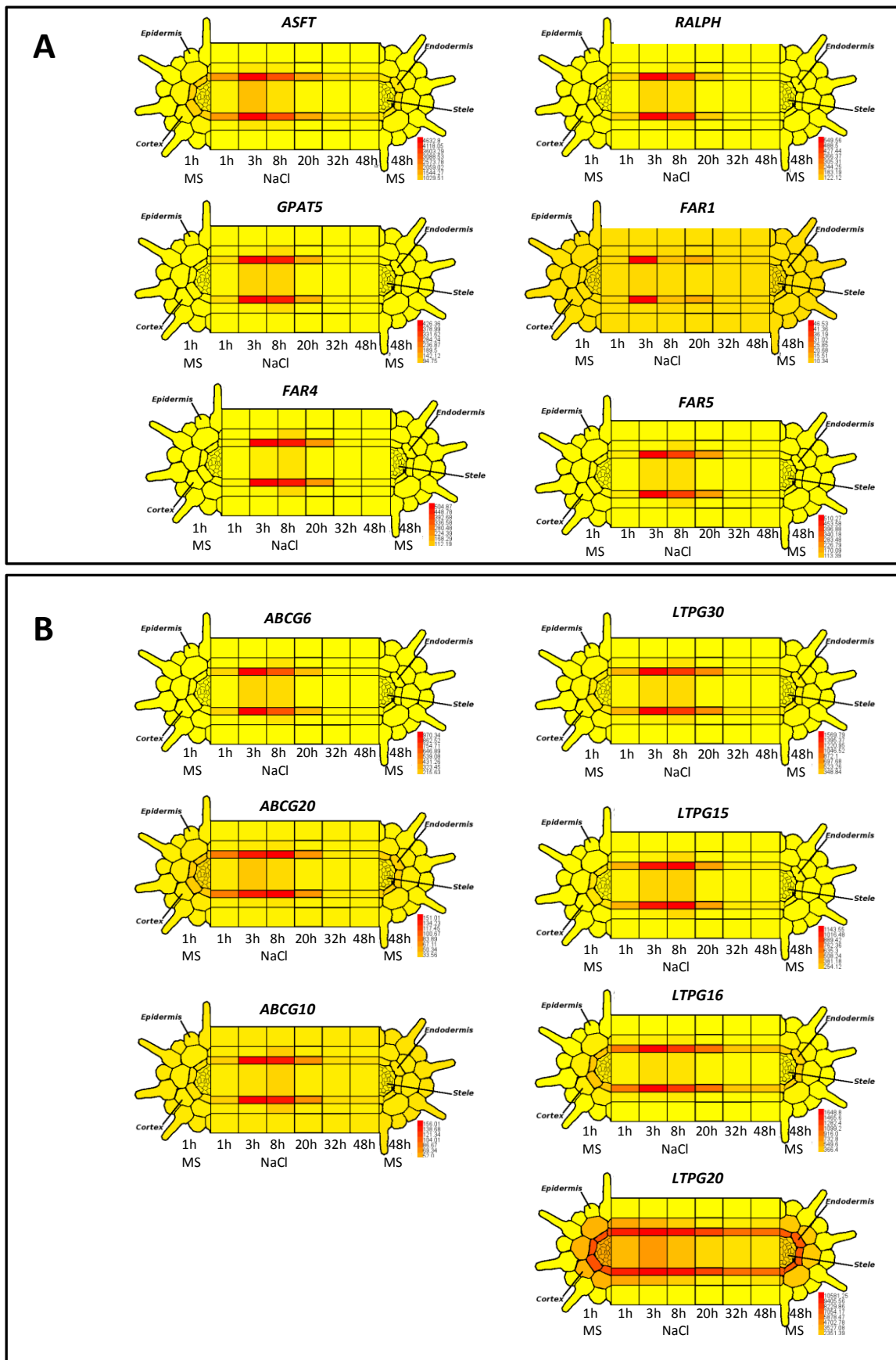


Figure 6 : Profils d'expression des gènes candidats et de gènes de biosynthèse de la subérine dans les différentes assises cellulaires de la racine en condition de stress salin. Les profils ont été obtenus à partir d'Arabidopsis eFP Browser.

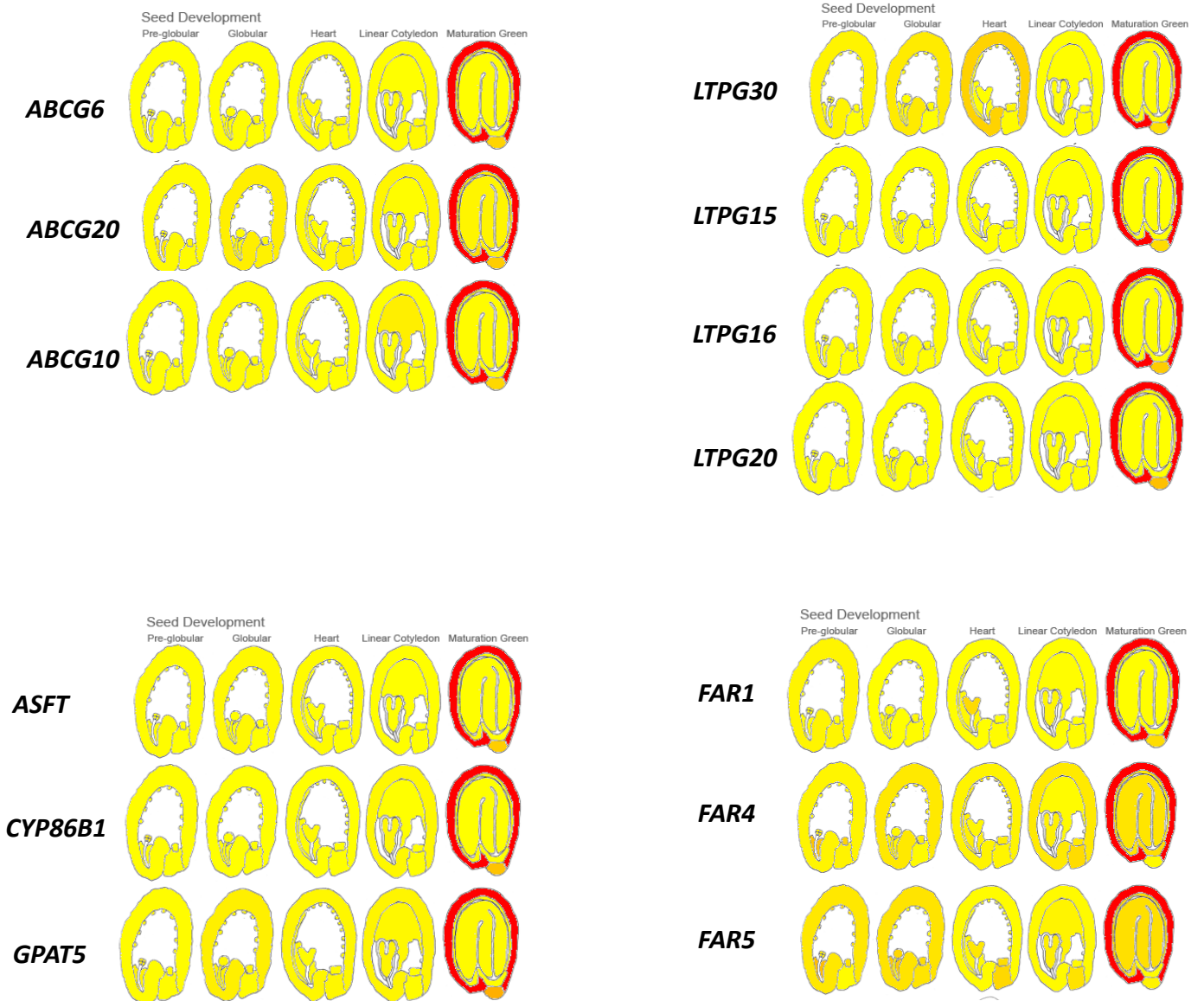
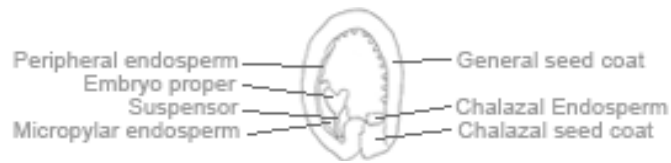


Figure 7 : Profils d'expression des gènes candidats et de gènes de biosynthèse de la subérine dans la graine d'Arabidopsis. Les profils ont été obtenus à partir d'Arabidopsis eFP Browser.

L'expression des gènes « appâts » et des gènes candidats dans les différentes assises cellulaires de la racine a ensuite été étudiée avec Genevestigator. Comme le montre la Figure 5, tous les gènes « appâts » et tous les gènes candidats ont une expression qui est spécifiquement plus élevée dans l'endoderme que dans les autres tissus des racines. L'endoderme et le périderme (qui n'est pas malheureusement présent comme tissu spécifique sur Genevestigator) représentant les deux assises cellulaires subérisées de la racine, ces surexpressions au niveau de l'endoderme représentent un bon critère pour nos gènes candidats. Il est aussi à noter que parmi tous les niveaux d'expression dans l'endoderme, celui de *LTPG20* est le plus fort (Figure 5).

Un des outils proposé par BAR eFP Browser permet entre autres de voir l'expression spatio-temporelle des gènes d'Arabidopsis dans les assises cellulaires de la racine en conditions de stress salin. Comme indiqué dans la Figure 18 de l'introduction de cette thèse, la biosynthèse de la subérine est stimulée par un stress osmotique. Les Figures 6A et B montrent qu'en condition de stress salin, une augmentation du niveau d'expression de tous les gènes « appâts » et d'une forte majorité des gènes candidats est constatée, et ce spécifiquement dans les cellules de l'endoderme. En fait, seule l'expression du gène *LTPG20*, qui est déjà importante dans les cellules de l'endoderme en condition normale, ne varie pas sous l'effet d'un stress salin. Il faut aussi noter que l'activation de l'expression de *FAR1* relevée dans l'endoderme est maximale 3 h après le début du stress salin puis décline, alors que pour tous les autres gènes « appâts » et candidats, l'activation de l'expression semble plus longue. En effet, l'expression est aussi intense 8 h après le début du stress salin que 3 h après.

Un autre outil de l'eFP Browser permet enfin de visualiser l'expression des gènes dans les différents tissus de la graine au cours de son développement. Si aucune expression n'est détectée au niveau de l'embryon ou de l'endoderme, et ce quel que soit le stade de développement, tous les gènes « appâts » et candidats sont exprimés très fortement et spécifiquement dans le manteau de la graine aux stades de développement 6 à 10 (« mature green » ; Figure 7). Tous ces gènes (à l'exception de *FAR4* et *FAR5*) sont aussi exprimés, au même stade de développement, dans la région du chalazal des graines, mais de façon nettement plus faible. Ces domaines d'expression sont en accord avec une subérisation du manteau de la graine dans les stades tardifs de son développement, juste avant sa dessiccation.

L'ensemble des résultats d'expression confirme que nos gènes candidats sont bien exprimés dans les mêmes tissus et aux mêmes stades de développement que les gènes

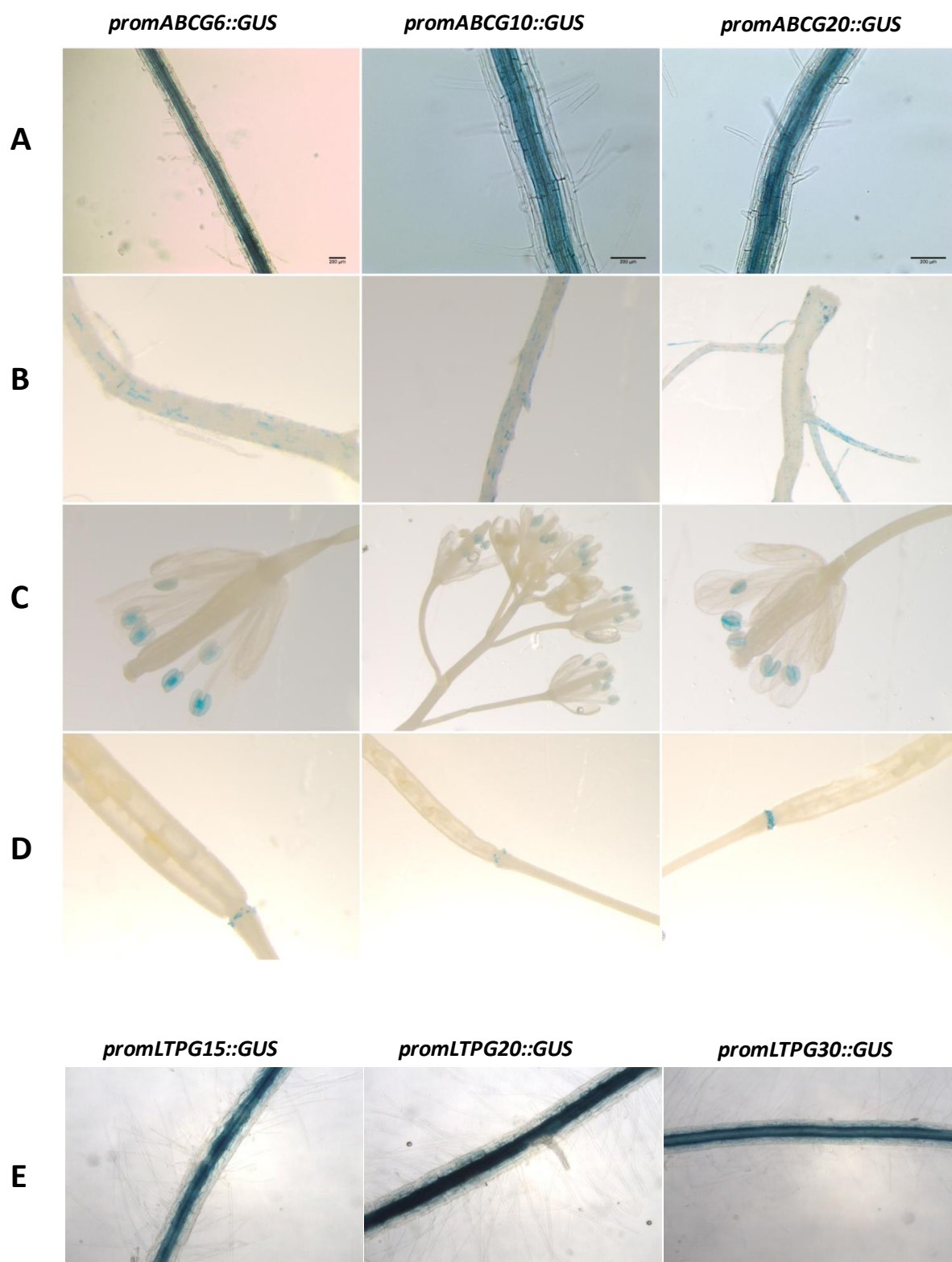


Figure 8 : Localisation de l'activité des promoteurs des gènes candidats dans des lignées transgéniques obtenues avec les constructions *promGENE-CANDIDAT::GUS*. (A, E) Racines de plantes ayant poussé 15 jours *in vitro*. (B) Racines matures de plantes ayant poussé en terre. (C) Fleurs matures. (D) Siliques.

« appâts ». Ces domaines d'expression correspondent parfaitement aux tissus subérisés connus chez *Arabidopsis*, à savoir l'endoderme des racines et le manteau de la graine.

L'expression d'*ABCG6*, *ABGC20*, *GPAT5*, *FAR4* et de *FAR5* au niveau des étamines des fleurs suggère que ces gènes pourraient de plus jouer un rôle dans la biosynthèse de la sporopollénine, le polymère lipidique des grains de pollen. De plus, l'expression plus générale de *FAR1* indique que ce gène n'est probablement pas spécifique de la subérine.

3 - Domaines d'expression et localisation subcellulaire des candidats

3 - 1 - Analyses de l'activité des promoteurs des gènes candidats

L'activité transcriptionnelle des promoteurs des gènes candidats a été examinée en utilisant le système du gène rapporteur *GUS*. La région située en amont du codon start du gène candidat (généralement 2000 paires de bases) a été fusionnée au gène rapporteur *GUS* qui code pour la β -glucuronidase. Cette enzyme est capable d'hydrolyser le X-Gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique), ce qui va produire un précipité bleu dans les tissus où le promoteur étudié est actif. Ce type de construction a été généré pour l'ensemble de nos gènes candidats à l'exception de *LTPG16*.

Des plantes d'*Arabidopsis* ont été transformées avec les constructions contenant les fusions *promGENE-CANDIDAT::GUS* par l'intermédiaire du système d'agroinfiltration avec *Agrobacterium tumefaciens*. Les tests d'activité de la β -glucuronidase ont été réalisés sur des lignées issues de la génération T1 pour les promoteurs des LTPGs et T3 pour les promoteurs des ABCG transporteurs. Pour les lignées *promABCG::GUS*, les tests ont été réalisés sur des plantes ayant poussé *in vitro* et en terre. Pour les lignées *promLTPG::GUS*, seules les racines de plantules ayant poussé quinze jours *in vitro* ont été analysées.

Pour tous les candidats, excepté *LTPG16*, une activité GUS est observée tout le long des racines au niveau de l'endoderme, comme cela est le cas pour la plupart des gènes impliqués dans la synthèse de la subérine (Beisson et al. 2007, Compagnon et al. 2009, Molina et al. 2009, Vishwanath et al. 2013) (Figure 8A et E). Les racines des plantes ayant poussé en terre présentent de plus une expression éparse du gène rapporteur en périphérie (Figure 8B). Ce

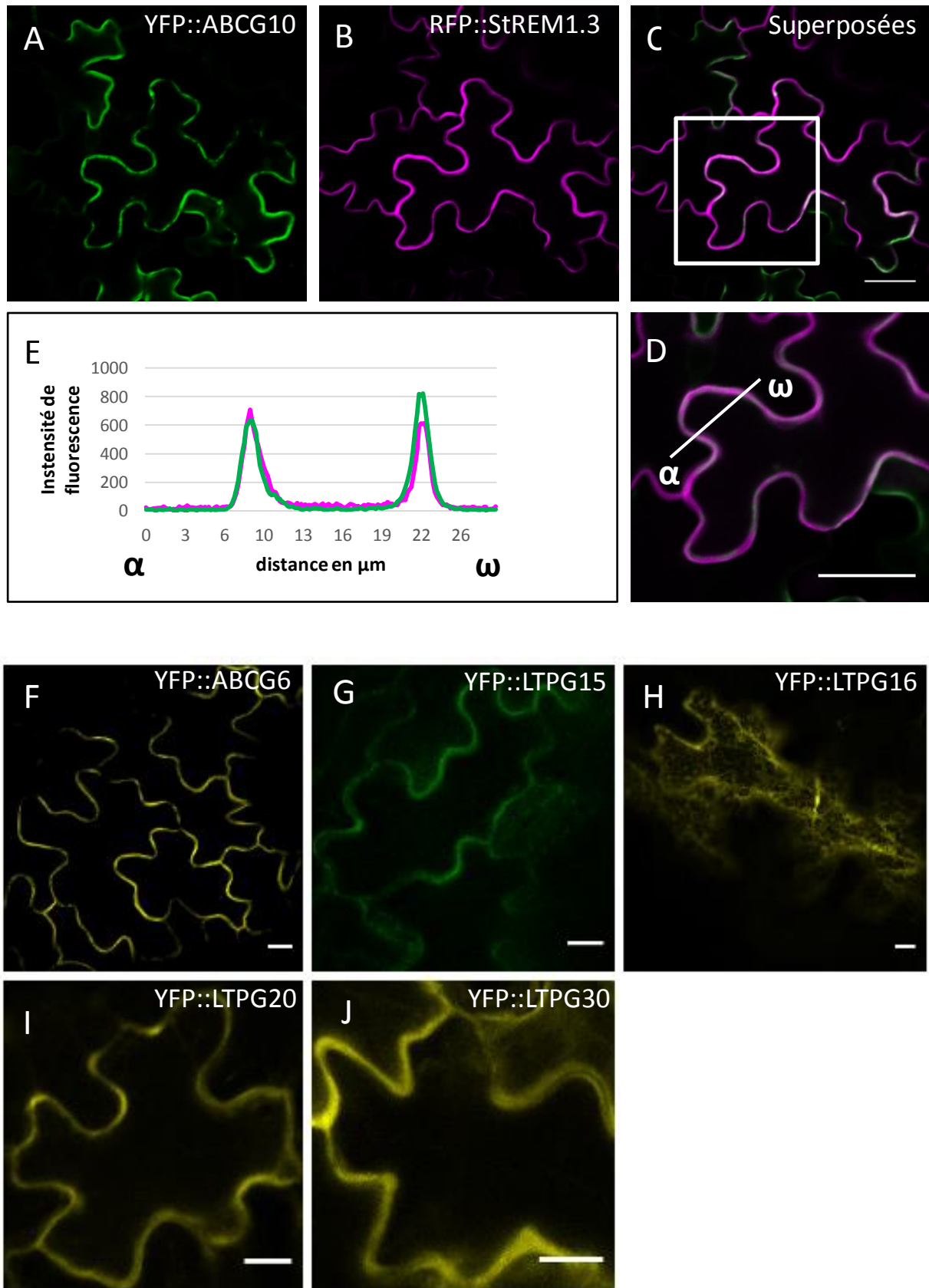


Figure 9 : Localisation subcellulaire des protéines ABCG et LTPG candidates dans des cellules de cotylédons d'Arabidopsis transformés avec les constructions YFP::GENECANDIDAT. L'image en (D) correspond à un agrandissement de la zone encadrée sur l'image en (C). Les intensités de fluorescence mesurées pour la YFP et la RFP le long de l'axe α - ω ont été reportées sur le graphique (E). Echelle = 5 μm .

type de marquage, typique du périclype, a été rapporté pour les gènes « appâts » *GPAT5*, *ASFT* et les 3 *FARs* qui sont impliqués dans la synthèse de la subérine (Beisson et al. 2007, Molina et al. 2009, Vishwanath et al. 2013).

Au niveau des parties aériennes, l'activité GUS est relevée au niveau des anthères et du réceptacle des siliques, où un dépôt de subérine a lieu afin de cicatrifier l'endroit où les pétales se sont décrochés (Figure 8C, D). Des profils d'expression similaires ont été rapportés pour *GPAT5* et *RALPH* (Beisson et al. 2007, Compagnon et al. 2009).

Les domaines d'expression des gènes candidats déterminés grâce à l'analyse de l'activité des promoteurs dans le cadre de ma thèse concordent avec ceux proposés par les bases de données d'expression. Pour les gènes *ABCG6* et *ABGC2*, des résultats similaires ont été obtenus par Yadav et ses collaborateurs (2014). L'analyse de lignées prom*GENE-CANDIDAT::GUS* nous a donc permis de confirmer que nos gènes candidats sont bien exprimés au niveau de sites connus de dépôt de la subérine, tout comme les gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine.

3 - 2 - Localisation subcellulaire des protéines candidates

Afin de déterminer la localisation subcellulaire des protéines candidates, des constructions contenant la partie codante des gènes candidats fusionnée au gène d'une protéine fluorescente (la Yellow Fluorescent Protein ou YFP) sous le contrôle du promoteur fort et constitutif CaMV35S ont été générées. Pour les protéines ABCGs, les fusions ont été réalisées en C-terminale de la YFP. Pour les protéines LTPGs, les fusions ont été faites entre le site de clivage du peptide signal situé en N-terminale et le domaine LTP afin de ne pas gêner l'adressage au RE.

Ces constructions ont été exprimées de façon transitoire dans des cellules d'épiderme de cotylédons d'*Arabidopsis* par agroinfiltration avec *Agrobacterium tumefaciens*. La face inférieure des cotylédons a ensuite été observée en utilisant un microscope confocale à fluorescence afin de déterminer la localisation subcellulaire des protéines candidates dans les cellules transformées.

La construction YFP::*ABCG10* a été co-agroinfiltrée avec une construction contenant une séquence codant pour une protéine de la famille des rémorines, StREM1.3, fusionnée à une séquence codant pour la Red Fluorescent Protein (RFP). StREM1.3 est une protéine

connue pour être localisée à la membrane plasmique (Raffaele et al. 2009; Perraki et al. 2012). Les figures 9A et 9B montrent une même cellule qui a été transformée à la fois avec les constructions YFP::ABCG10 (9A) et StREM1.3::RFP (9B). Comme attendu, StREM1.3 localise à la membrane plasmique. ABCG10 est localisée à la périphérie de la cellule. Afin de déterminer une éventuelle co-localisation entre ABCG10 et StREM1.3, les images obtenues en microscopie confocale ont été superposées (Figure 9C) et l'intensité de fluorescence a été mesurée le long d'un axe coupant à deux reprises la membrane plasmique de la cellule co-transformée (Figures 9D et 9E). Les deux pics d'intensité de fluorescence émise par la RFP correspondent à la localisation de StREM1.3::RFP à la membrane plasmique. Pour la YFP, deux pics de fluorescence situés au mêmes endroits que la RFP ont été détectés. Ces observations suggèrent que, comme StREM1.3, ABCG10 est localisée à la membrane plasmique.

Même si aucun co-marquage n'a été réalisé pour ABCG6, la protéine semble aussi être localisée au niveau de la membrane plasmique (Figure 9F). De plus, Yadav et ses collaborateurs (2014), ont montré que ABCG6 co-localisait avec le marqueur de membrane plasmique FM64. Plusieurs expériences faites avec la construction YFP::ABCG20 ont donné des résultats contradictoires, si bien que la localisation subcellulaire de la protéine ABCG20 n'a pas pu être déterminée. Cependant, dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014), les auteurs ont montré qu'ABCG20 est localisée à la membrane plasmique dans des feuilles de tabac.

Les protéines LTPG15, LTPG20 et LTPG30 fusionnées avec la YFP sont localisées à la périphérie de la cellule (Figure 9G, H, J). Elles pourraient donc être dans la membrane plasmique comme LTPG1 et LTPG2 et/ou dans la paroi cellulaire. En effet, il est possible qu'il y ait un clivage de l'ancre GPI, libérant ainsi la protéine dans l'espace apoplastique. C'est pourquoi des co-marquages avec des marqueurs de ces différents compartiments sont nécessaires pour déterminer la localisation exacte de ces protéines. Des expériences de plasmolyse pourraient aussi permettre de voir si ces protéines sont localisées dans la paroi. Le profil de localisation de YFP::LTPG16 est par contre typique du réticulum endoplasmique (Figure 9I). Cependant il se peut que cela soit dû à un problème d'adressage. Par exemple, il se peut que la fusion avec la YFP ait perturbé l'export de la protéine jusqu'à la membrane plasmique et /ou l'espace apoplastique.

Les analyses de localisation subcellulaire que nous avons réalisées dans les cellules épidermiques de cotylédons transformés transitoirement ont montré que la protéine ABCG10

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des lignées d'insertion d'ADN-T au niveau des gènes candidats criblés. Prom, promoteur; UTR, untranslated region; ORF, open reading frame; HMZ, homozygote; HTZ, hétérozygote.

Gène	Code	Nom lignée	Localisation de l'insertion	Génotype lignées reçues
<i>ABCG6</i>	At5g13580	FLAG_445F05	Prom	HTZ
		FLAG_108H08	Prom	HTZ
		GK-891H019	5'UTR	HTZ
		WiscDsLox461-464D3	3'UTR	HTZ
<i>ABCG10</i>	At1g53270	16-2370-1	ORF	HTZ
		GK-331E02	ORF	HTZ
		SALK_128668	Prom	HMZ
<i>ABCG20</i>	At3g53510	SALK_086914	ORF	HTZ
		SALK_081053	ORF	HMZ
		SAIL_71_G09	ORF	HTZ
<i>LTPG30</i>	At5g13900	FLAG_521E04	ORF	HTZ
		GK-636E02	Prom	HTZ
<i>LTPG15</i>	At2g48130	SALK_110442	Prom	HMZ
		SALK_125619	Prom	HMZ
<i>LTPG16</i>	At2g48140	SALK_125619	Prom	HMZ
		SALK_110442	Prom	HMZ
<i>LTPG20</i>	At3g22620	WiscDsLox374E22	Prom	HTZ
		SAIL_666_H05.v1	Prom	HTZ

était localisée à la membrane plasmique. Si nos analyses ont confirmé qu'ABCG6 avait bien une localisation subcellulaire identique, nous n'avons pas réussi à déterminer la localisation exacte d'ABCG20. De plus, ces analyses suggèrent que 3 des 4 LTPGs que nous avons sélectionnés ont probablement une localisation au niveau de la membrane plasmique et/ou dans l'espace périplasmique.

4 - Identification et caractérisation de mutants d'insertion ADN-T pour les gènes candidats

Afin d'évaluer le rôle potentiel des gènes candidats sélectionnés dans la synthèse de la subérine, nous avons recherché des lignées perturbées pour l'expression de ces gènes afin d'étudier les effets de ces perturbations sur la composition et la quantité de la subérine des racines et des graines.

4 - 1 - Isolement de lignées homozygotes et analyse de l'expression des gènes candidats

Des graines de lignées possédant une insertion ADN-T au niveau des gènes candidats ont été obtenues auprès de différents centres de ressources (NASC, Versailles, Riken). En fonction des lignées, les sites d'insertion sont situés dans les régions promotrices, 5'UTR ou codantes (Tableau 4). Il faut préciser que les gènes codant pour LTPG15 et LTPG16 partagent le même promoteur, les codons ATG de *LTPG15* et *LTPG16* étant séparés de 464 paires de bases et les régions codantes de direction opposée. L'insertion de l'ADN-T des lignées SALK_110442 et SALK_125619 se situant dans cette région promotrice commune, ces deux lignées d'insertion affectent potentiellement *LTPG15* et/ou *LTPG16* (Tableau 4). Sur les 16 lignées commandées, 4 étaient décrites comme homozygotes pour l'insertion. J'ai néanmoins réalisé un criblage par PCR sur ADN génomique sur les 16 lignées afin d'identifier ou de confirmer les plantes homozygotes pour l'insertion au niveau des différents gènes candidats. Au final, j'ai pu isoler 12 lignées homozygotes sur les 16 analysées. Les lignées pour lesquelles des homozygotes ont été isolés sont récapitulées dans le Tableau 5.

Le niveau d'expression des gènes candidats a ensuite été évalué par RT-Q-PCR dans chacune des 12 lignées homozygotes isolées (Figure 10). Deux des cinq lignées d'insertion pour le gène *ABCG6*, *abcg6-4* et *abcg6-5*, ont un niveau de transcrits nul ou quasi-nul. Les lignées *abcg6-1* et *abcg6-3* présentent un niveau de transcrits réduit d'environ 50% et 85%

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des lignées homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T isolées. Col-0, Columbia-0 ; Col-2, Columbia-2 ; Nos, Nossen ; Ws, Wassilewskija.

Allèle	Nom lignée	Gène	Code	Ecotype
<i>abcg6-1</i>	FLAG_445F05	<i>ABCG6</i>	At5g13580	Ws
<i>abcg6-2</i>	FLAG_108H08	<i>ABCG6</i>	At5g13580	Ws
<i>abcg6-3</i>	GK-891H019	<i>ABCG6</i>	At5g13580	Col-0
<i>abcg6-4</i>	WiscDsLox461-464D3	<i>ABCG6</i>	At5g13580	Col-2
<i>abcg6-5</i>	16-2370-1	<i>ABCG6</i>	At5g13580	Nos
<i>abcg10-2</i>	SALK_128668	<i>ABCG10</i>	At1g53270	Col-0
<i>abcg20-1</i>	SALK_086914	<i>ABCG20</i>	At3g53510	Col-0
<i>abcg20-2</i>	SALK_081053	<i>ABCG20</i>	At3g53510	Col-0
<i>ltpg30-1</i>	FLAG_521E04	<i>LTPG30</i>	At5g13900	Ws
<i>ltpg15-1/ltpg16-2</i>	SALK_110442	<i>LTPG15/LTPG16</i>	At2g48130/At2g48140	Col-0
<i>ltpg15-2/ltpg16-1</i>	SALK_125619	<i>LTPG15/LTPG16</i>	At2g48130/At2g48140	Col-0
<i>ltpg20-2</i>	SAIL_666_H05.v1	<i>LTPG20</i>	At3g22620	Col-0

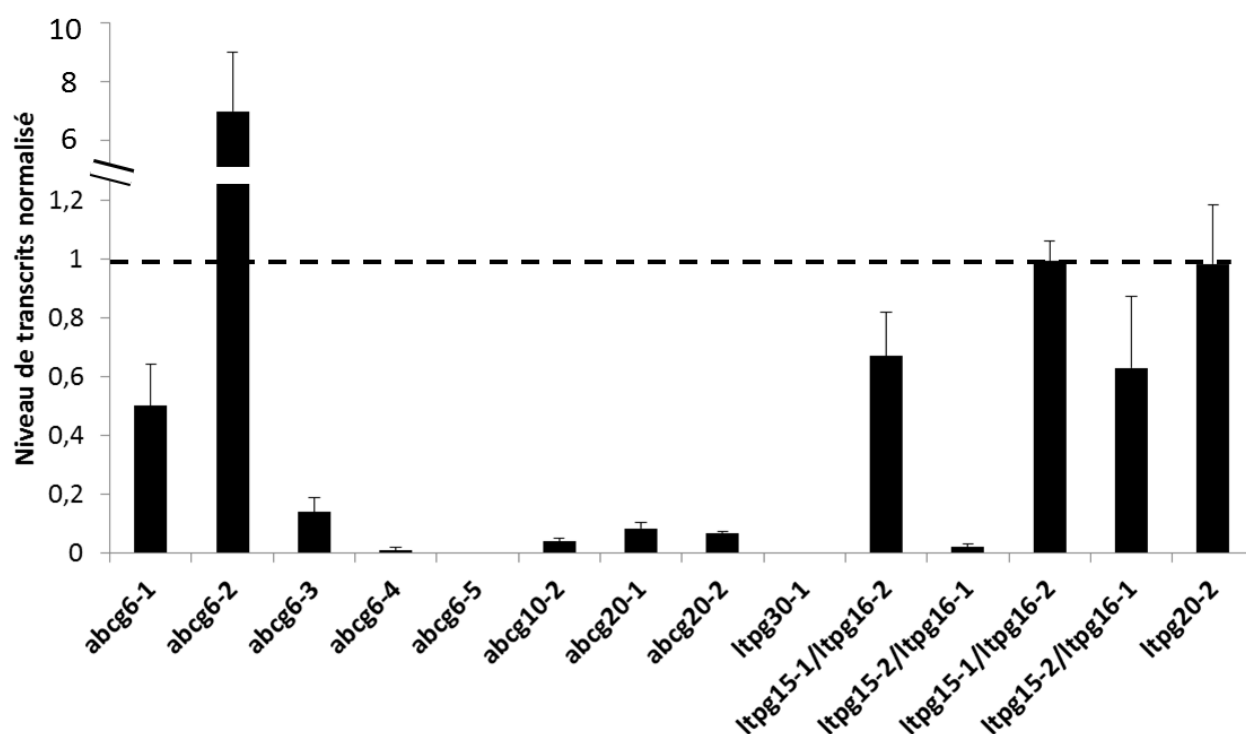


Figure 10 : Abondance relative des transcrits des gènes candidats dans les lignées homozygotes. La valeur de référence est de 1 et correspond au niveau d'expression de chaque gène chez le sauvage. L'expression relative a été normalisée par rapport à l'actine. Pour les lignées *ltpg15-1/ltpg16-2* et *ltpg15-2/ltpg16-1*, les gènes analysés ont été précisés (*LTPG15* ou *LTPG16*). (n=3).

respectivement. Une lignée d'insertion surexprimant *ABCG6*, *abcg6-2*, a aussi été isolée. La seule lignée homozygote pour l'insertion de l'ADN-T au niveau du gène *ABCG10*, *abcg10-2*, a un niveau de transcrits quasi nul. L'expression du gène *ABCG20* est également quasi nulle pour les lignées *abcg20-1* et *abcg20-2*. Un mutant KO, *ltpg30-1*, a été isolé pour le gène *LTPG30*. Alors que dans la lignée *ltpg15-1/ltpg16-2*, le niveau de transcrits de *LTPG15* est réduit de seulement 40 % environ, dans la lignée *ltpg15-2/ltpg16-1*, ce niveau est quasi nul. En revanche, le niveau d'expression de *LTPG16* dans les lignées *ltpg15-1/ltpg16-2* est similaire à celui du sauvage et réduit de 40 % dans la lignée *ltpg15-2/ltpg16-1*. La seule lignée homozygote pour l'insertion de l'ADN-T au niveau du gène *LTPG20* que nous avons isolée ne présente pas de modification de l'expression de ce dernier comparée au sauvage.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser pour la suite de cette étude 9 des 12 lignées homozygotes isolées. La lignée *abcg6-1* n'a pas été étudiée car le niveau de transcrits du gène *ABCG6* y est moins affecté que dans les autres lignées *abcg6*. Nous avons également choisi de ne pas retenir la lignée *ltpg15-1/ltpg16-2* car le niveau de transcrits de *LTPG15* n'y est que faiblement réduit comparé à la lignée *ltpg15-2/ltpg16-1*. Enfin, nous avons éliminé la lignée *ltpg20-2* car elle ne présente pas de réduction ou d'augmentation de la quantité de transcrits pour le gène *LTPG20*.

4 - 2 - Analyses des lignées d'insertion ADN-T

4 - 2 - 1 - Analyse de la subérine des racines

Afin de voir si la perturbation de l'expression des gènes candidats pouvait avoir un effet sur la subérine, j'ai analysé le polymère de subérine de racines de plantes de 3 à 4 semaines poussées *in vitro*. Les racines ont été délipidées (extraction des lipides solubles) grâce à des bains successifs dans des solvants de polarité grandissante. Les racines délipidées ont ensuite été séchées et dépolymérisées par transestérification, puis les monomères de subérine obtenus ont été dérivatisés et analysés par GC-MS. Les lignées d'insertion n'étant pas toutes du même écotype, leur composition en monomères de subérine a été comparée à celles des lignées sauvages de l'écotype correspondant.

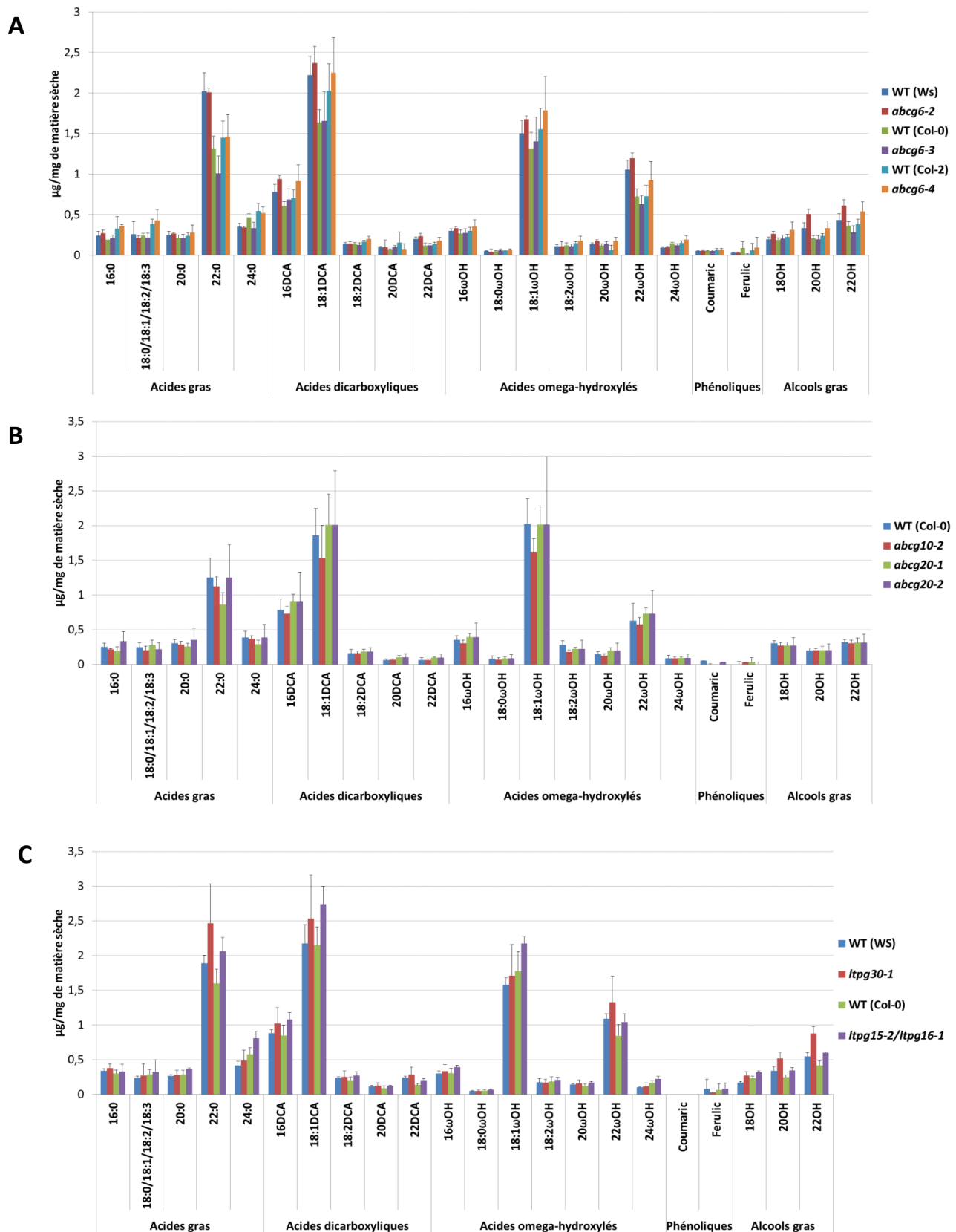


Figure 11 : Analyses par GC-MS de la composition du polymère de subérine des racines des lignées d'insertion pour les gènes candidats. (A) *ABCG6*, (B) *ABCG10* et *ABCG20*, (C) *LTPG30*, *LTPG15* et *LTPG16*. Pour chaque lignée, l'écotype sauvage correspondant a été analysé. Les plantes ont poussé trois à quatre semaines *in vitro*. (n=4).

Pour le gène candidat *ABCG6*, un mutant KO (Knock Out) (*abcg6-4*), un mutant KD (Knock Down) (*abcg6-3*) et un surexprimeur (*abcg6-2*), tous d'écotype différent, ont été analysés. La figure 11A montre que dans ces différents écotypes les composés principaux du polymère de subérine restent les mêmes (acides gras en C22, acides gras α,ω -dicarboxyliques en C16 et C18:1, acides gras ω -hydroxylé C18:1) mais que les quantités relatives varient. Néanmoins, si des variations pour plusieurs composés de la subérine ont été observées entre écotypes, aucune différence significative n'a été observée entre les lignées simples mutantes *abcg6* et les écotypes sauvages correspondants (Figure 11A). Les analyses de chaque lignée ayant été réalisées séparément, il se peut aussi que des variations de conditions de culture soient à l'origine des différences constatées entre écotypes. La composition de la subérine des racines du mutant KO *abcg6-5* a été déterminée par analyse globale et aucune variation de la composition et de la quantité de subérine n'a été relevée (résultats non présentés). Comme le montre la figure 11B, la composition de la subérine des racines des lignées simples mutantes *abcg10-2*, *abcg20-1* et *abcg20-2* n'est pas affectée. Pour les mutants LTPG, seuls le mutant KO *ltpg30-1*, et la lignée *ltpg15-2/ltpg16-1*, qui est KO pour *LTPG15* et KD pour *LTPG16*, ont été étudiés au niveau de la composition de la subérine des racines. Comme pour les lignées simples mutantes *abcg6*, *abcg10* et *abcg20*, aucune différence significative n'a été constatée entre les lignées simples mutantes *ltpg* et leur écotype sauvage correspondant (Figure 11C).

Au final, aucune des 9 lignées simples mutantes que j'avais isolées n'a montré de défaut au niveau de la composition ou de la quantité du polymère de subérine des racines. Dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014), des résultats similaires ont été obtenus par pour les simples mutants *abcg6* et *abcg20*.

4 - 2 - 2 - Analyses des graines

4 - 2 - 2 - i - Perméabilité du manteau des graines

Le manteau de la graine est constitué de plusieurs couches présentant des compositions différentes. La partie externe du tégument et la région du chalaze sont enrichies en subérine (Molina et al., 2008). Il a été montré qu'une modification de la composition en subérine du manteau de la graine pouvait notamment entraîner une augmentation de la perméabilité au

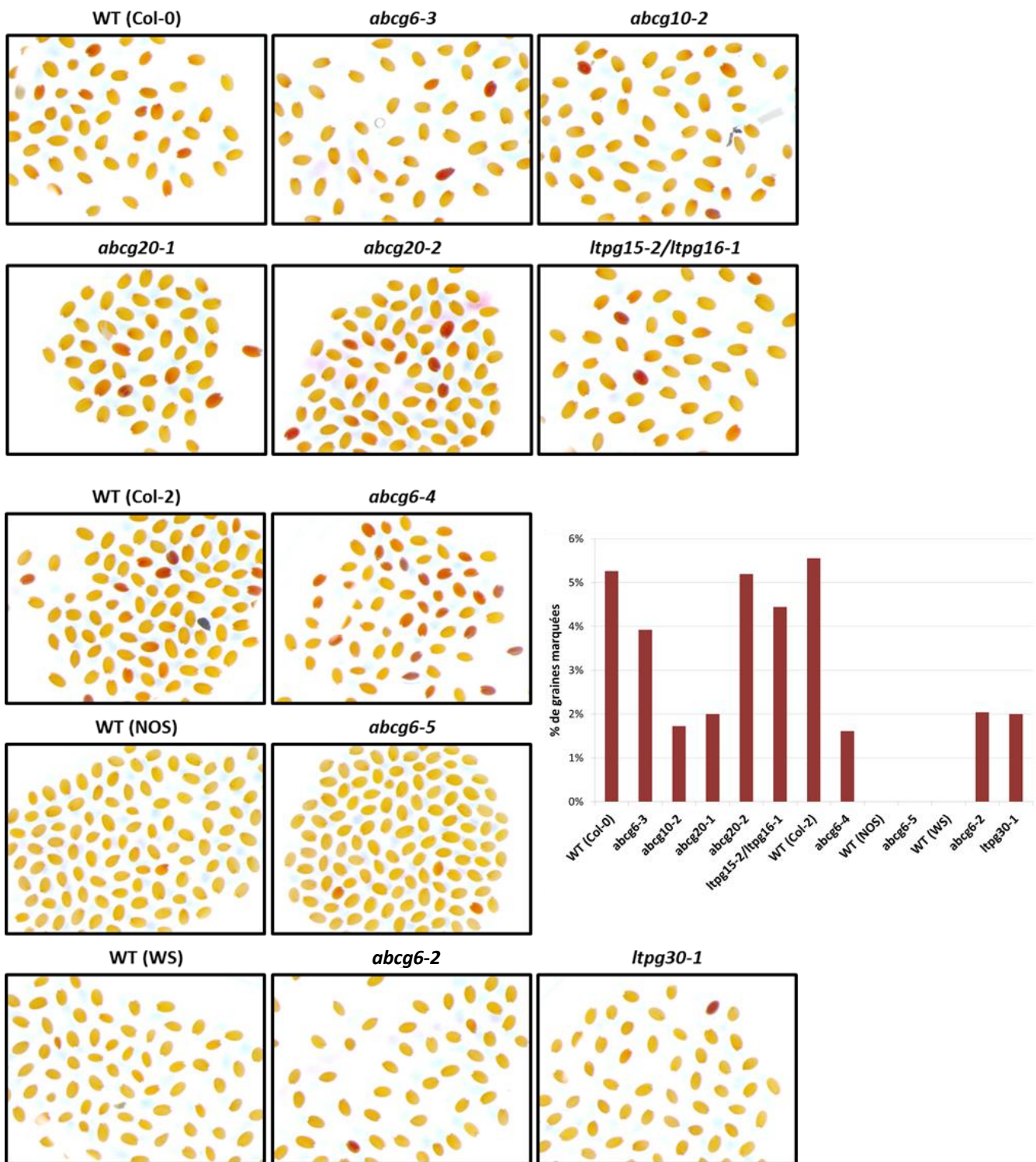


Figure 12 : Marquage au tétrazolium des graines des lignées d'insertion pour les gènes candidats et les écotypes sauvages correspondants. Les graines ont été incubées 24h dans une solution de tétrazolium 1%. (n=1).

tétrazolium et une sensibilité plus importante à l'ABA (Beisson et al. 2007; Vishwanath et al. 2013).

J'ai par conséquent analysé le manteau des graines des lignées d'insertion en effectuant des tests de perméabilité au tétrazolium. Si le tétrazolium pénètre dans la graine, il sera alors réduit en un précipité rouge appelé formazan par des réductases NADPH-dépendantes provenant de l'embryon (Debeaujon et al. 2000; Beisson et al. 2007).

Les résultats des tests de perméabilité (Figure 12) montrent qu'un faible pourcentage de graines (5 % environ) des lignées sauvages d'écotype Col-0 et Col-2 est marqué au tétrazolium. Pour les lignées d'insertion obtenues dans ces deux écotypes (*abcg6-3*, *abcg10-2*, *abcg20-1*, *abcg20-2*, *ltp15-2/ltpg16-1* et *abcg6-4*), le pourcentage de graines marquées reste faible (entre 2% et 5%). Chez la lignée d'insertion *abcg6-5* et la lignée sauvage d'écotype correspondant (NOS) aucune graine ne présente de marquage au tétrazolium. Aucune graine marquée n'a été observée pour la lignée sauvage WS alors que les lignées *abcg6-2* et *ltpg30-1* ont environ 2 % de graines marquées. Cependant, ce pourcentage reste très faible comparé à des graines présentant un défaut de perméabilité du manteau de la graine. Le triple mutant *far1 far4 far5*, par exemple, a 75 % de graines marquées au tétrazolium (Vishwanath et al 2013).

L'ensemble de ces analyses a montré qu'aucune différence importante de perméabilité au tétrazolium n'a été constatée entre les lignées simples mutantes et les lignées sauvages correspondantes après 24 h d'incubation dans une solution de tétrazolium 1%. Des résultats similaires ont été rapportés pour les simples mutants *abgc6* et *abcg20* par Yadav et ses collaborateurs (2014).

4- 2 - 2 - ii Analyses de la subérine des graines

La composition en monomères de subérine des graines a été étudiée même si la perméabilité du manteau des graines des simples mutants ne semble pas être affectée. En effet, il est possible que les graines des simples mutants aient une modification de la quantité et/ou de la composition de la subérine sans que cela impacte les propriétés du manteau. Pour cela 50 mg de graines ont été broyées, délipidées et transméthylées. La composition en monomères de subérine du manteau des graines a été analysée par GC-MS. Les composés

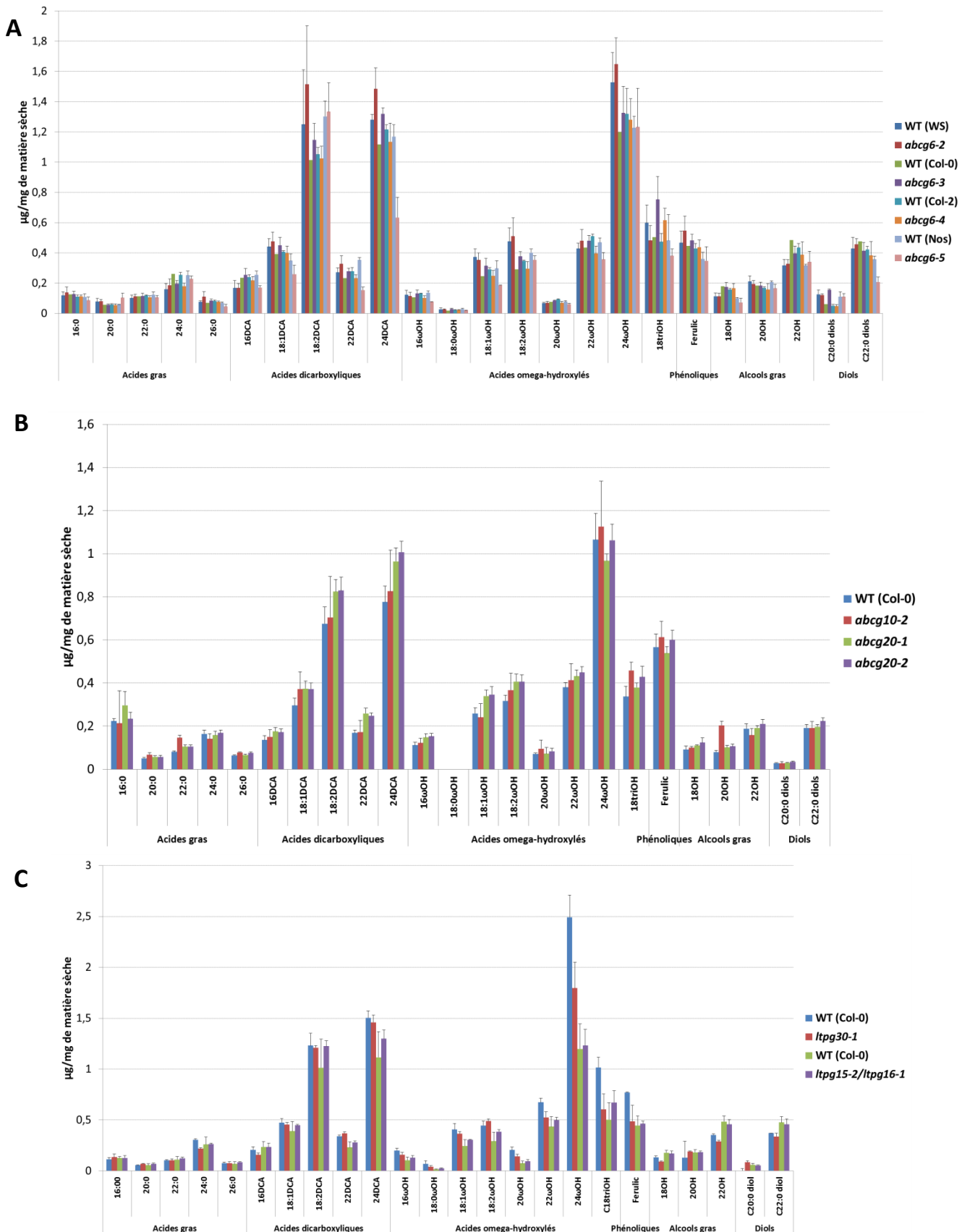


Figure 13 : Analyses par GC-MS de la composition du polymère de subérine des graines des lignées d'insertion pour les gènes candidats. (A) *ABCG6*, (B) *ABCG10* et *ABCG20*, (C) *LTPG30*, *LTPG15* et *LTPG16*. Pour chaque lignée, l'écotype sauvage correspondant a été analysé. Les plantes ont poussé quatre semaines *in vitro*. (n=4).

majoritaires sont différents de la subérine des racines. En effet, les composés prédominants de la subérine des graines sont les acides gras α,ω -dicarboxyliques en C18:2 et C24 ainsi que les acides gras ω -hydroxylés en C24 (Figure 13).

Aucune des lignées mutantes *abcg6* analysées ne présente de variations significatives au niveau de la composition des monomères de subérine du manteau des graines (Figure 13A). De même, les graines des lignées *abcg10-2*, *abcg20-1* et *abcg20-2* ne montrent pas d'altérations de quantité ou de composition de la subérine (Figure 13B). Les mêmes constatations ont été faites par Yadav et ses collaborateurs (2014) pour d'autres lignées mutantes *abcg6* et *abcg20*. Enfin pour les deux lignées mutantes *ltpg*, *ltpg30-1* et *ltpg15-2/ltpg16-1*, aucune différence significative n'a été relevée comparé aux lignées sauvages (Figure 13C).

Les résultats de ces analyses indiquent qu'aucune des lignées simples mutantes KO, KD ou surexpresser ne présente de phénotype indiquant un défaut de subérine dans les racines de plantes de quatre semaines ayant poussé *in vitro* ou dans le manteau des graines sèches. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les résultats que nous avons obtenus pour les lignées simples mutantes des gènes candidats. Il se pourrait tout simplement que les gènes candidats ne soient pas impliqués dans l'export des monomères de subérine. Néanmoins, les résultats des analyses de co-expression et des tests d'activité des promoteurs indiquent clairement que les domaines d'expression des gènes candidats concordent avec les sites de dépôt de subérine. Une autre hypothèse serait que les gènes candidats sont uniquement nécessaires à la formation de la subérine induite en condition de stress. Ainsi, dans des conditions normales de culture, la mutation des gènes n'affecte pas la mise en place constitutive de la subérine. Le fait que tous les gènes candidats excepté *ABCG20* sont surexprimés dans la lignée surexprimant *AtMYB41* est en accord avec leur possible implication dans la formation ou le renforcement de la barrière de subérine en réponse à un stress. Une implication plus précoce des gènes candidats dans le processus de subérisation n'est pas non plus à exclure. En effet, ces gènes sont peut-être nécessaires seulement pour la synthèse de la subérine dans les premiers stades de développement des tissus et chez les simples mutants des mécanismes de compensation se mettraient en place au cours du développement pour assurer la formation de la subérine. Ainsi, aucun phénotype subérine ne serait alors détecté aux stades tardifs auxquels nous avons fait nos analyses (racines de trois à quatre semaines et graines matures). Néanmoins, l'hypothèse la plus probable est celle d'un phénomène de redondance fonctionnelle qui permettrait de compenser la perte de fonction d'une des protéines candidates dans les lignées

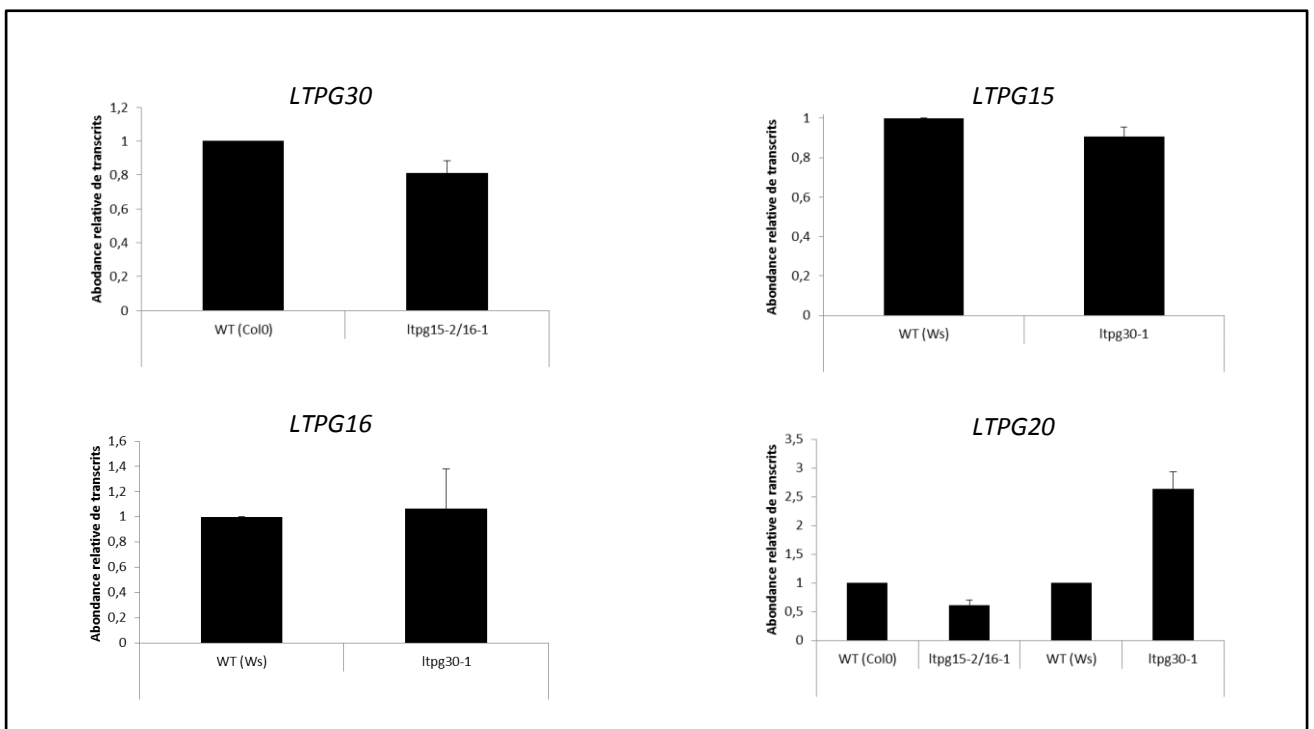
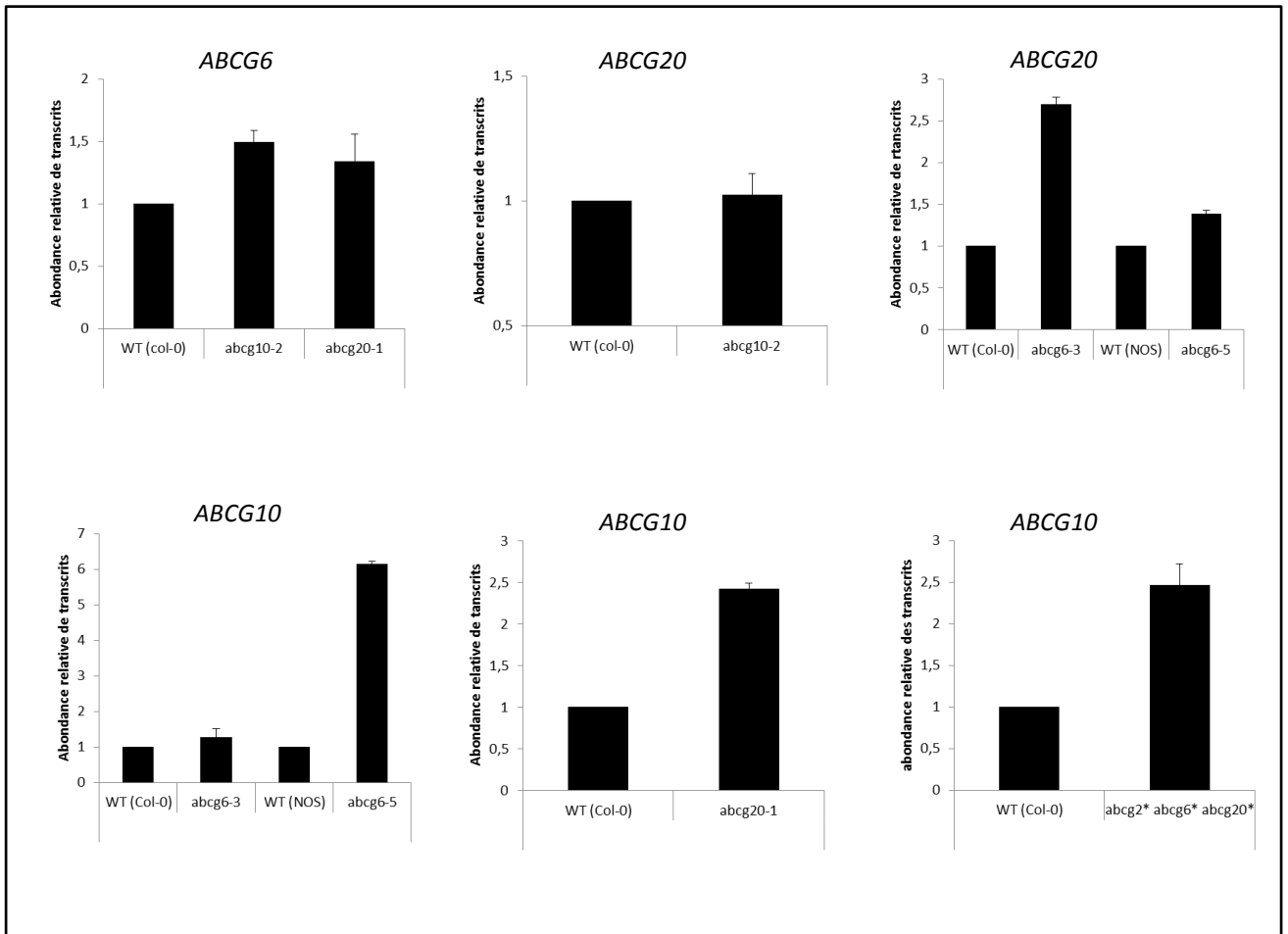


Figure 14 : Abondance relative des transcrits des gènes candidats *ABCG* et *LTPG* dans des racines de différentes lignées d'insertion. Le niveau d'expression des gènes a été déterminé par RT-PCR quantitative. Le niveau de transcrits a été normalisé par rapport à l'actine. (n=3).

mutantes. Il est par exemple possible qu'un ou plusieurs autres gènes candidats compensent la perte d'activité d'un gène dont l'expression est perturbée par l'insertion de l'ADN de transfert. La surexpression chez un simple mutant des autres gènes candidats pourrait en effet se traduire par une absence de modification de la quantité et de la composition de la subérine des racines et des graines.

4 - 2 - 3 - Expression des gènes candidats dans les autres lignées T-DNA

Afin de tester des phénomènes éventuels de compensation, l'expression des gènes candidats a donc été évaluée dans les racines des différentes lignées d'insertion par RT-Q-PCR (Figure 14).

Pour le gène *ABCG6*, une légère surexpression dans les lignées *abcg10-2* et *abcg20-1* a pu être constatée. Le gène *ABCG10* semble quant à lui surexprimé dans la lignée KO *abcg6-5* alors que son niveau de transcrite n'est pas modifié dans la lignée KD *abcg6-3*. *ABCG10* semble également surexprimé dans la lignée KD *abcg20-1*. Le niveau de transcrits du gène *ABCG20* est plus élevé dans la lignée KD *abcg6-3* comparé au sauvage alors qu'il n'est pas modifié dans la lignée KO *abcg6-5*. Alors que *ABCG10* semble surexprimé dans la lignée *abg20-1*, le niveau de transcrits du gène *ABCG20* n'est pas modifié dans la lignée *abcg10-2*.

Pour *LTPG30*, *LTPG15* et *LTPG16*, aucune variation importante n'a été notée dans les autres lignées d'insertion. Le niveau d'expression de *LTPG20* semble être diminué chez le mutant *ltpg16-2/ltpg15-1* et augmenté chez le mutant *ltpg30-1*.

Ces analyses ont été faites peu de temps avant la publication de l'article de Yadav et ses collaborateurs (2014) dans lequel les auteurs ont mis en évidence le rôle de *ABCG2*, *ABCG6* et *ABCG20* dans le transport des précurseurs de subérine. Nous avons pu nous procurer les graines des mutants générés par Yadav et ses collaborateurs et étudier l'expression du gène *ABCG10* chez le triple mutant *abcg2-1*abcg6-1*abcg20**. L'abondance des transcrits *ABCG10* est plus importante chez le triple mutant comparée au sauvage.

Même si certaines des analyses n'ont pas été reproduites, ces résultats suggèrent qu'il existe des régulations entre les différents candidats ce qui pourrait indiquer que ces gènes sont impliqués dans des voies de biosynthèse similaires et être donc capables d'assurer une compensation fonctionnelle dans le cas où un des gènes candidats est muté. Ces résultats nous

Tableau 6 : Lignées *abcg* utilisées pour les croisements. Les lignées avec une * correspondent aux lignées utilisées dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014).

<i>Allèle</i>	Type de lignée
<i>abcg2*</i>	GK_036_B02
<i>abcg6-3</i>	GK-891H019
<i>abcg6*</i>	SALK_050113
<i>abcg10-2</i>	SALK_128668
<i>abcg20-1</i>	SALK_086914
<i>abcg20-2</i>	SALK_081053
<i>abcg20*</i>	SALK_011548C

Tableau 7 : Récapitulatif des croisements réalisés. Les croisements pour lesquels des lignées homozygotes ont été obtenues sont indiquées en vert. Les lignées pour lesquelles les analyses de subérine et de graines ont été faites sont indiquées en vert.

	Homozygotes	Analyses subérine racines	Test de perméabilité au tétrazolium	Analyses subérine graines
Doubles mutants				
<i>abcg2* abcg10-2</i>				
<i>abcg6* abcg10-2</i>				
<i>abcg6-3 abcg10-2</i>				
<i>abcg20-1 abcg10-2</i>				
<i>abcg20-2 abcg10-2</i>				
<i>abcg20* abcg10-2</i>				
Triples mutants				
<i>abcg2* abcg6* abcg10-2</i>				
<i>abcg2* abcg20* abcg10-2</i>				
<i>abcg6* abcg20* abcg10-2</i>				
Quadruple mutant				
<i>abcg2* abcg6* abcg20* abcg10-2</i>				

ont permis de conforter le choix de la génération des mutants pour plusieurs gènes candidats à la fois.

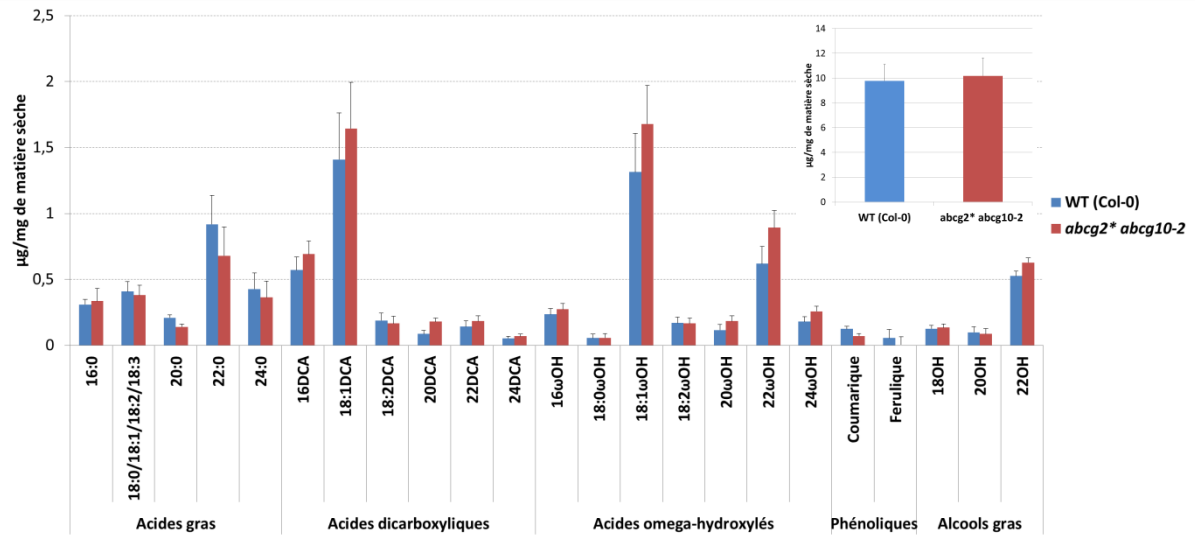
5 - Génération et caractérisation des doubles, triples et quadruple mutants

5 - 1 - Croisements entre les lignées d'insertion pour les ABCG transporteurs

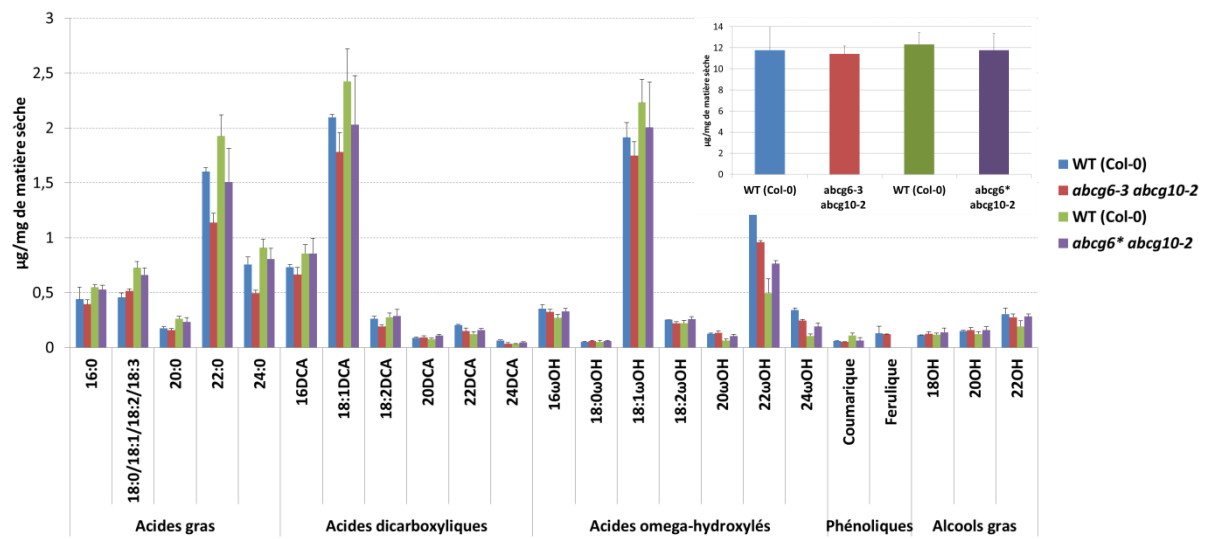
Une redondance fonctionnelle entre les candidats pouvant expliquer l'absence de modification au niveau de la composition et de la quantité en monomères de subérine chez les simples mutants, nous avons décidé de générer les doubles et triples mutants. Pour les gènes candidats *ABCG*, nous avons choisi de réaliser des croisements entre les lignées *abcg* d'écotype Col-0. Alors que j'effectuais ces croisements pour obtenir les doubles mutants, Yadav et ses collaborateurs (2014) ont montré que la composition en subérine des racines (polymère et cires) et des graines était affectée de façon importante chez le triple mutant *abcg2* abcg6* abcg20**. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur le gène *ABCG10*, le seul de nos candidats *ABCG* qui n'avait pas été étudié dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014). En plus des croisements entre la lignée *abcg10-2* et les lignées *abcg6-3*, *abcg20-1* et *abcg20-2*, nous avons décidé de faire les croisements entre la lignée *abcg10-2* et les lignées simples, doubles et triple mutantes de Yadav et ses collaborateurs (2014). Il faut noter que les allèles pour *ABCG6* et *ABCG20* utilisés dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014) sont différents de ceux que nous avons isolés. Un récapitulatif des lignées utilisées ainsi que des croisements réalisés est donné dans les Tableaux 6 et 7.

Les deux lignées d'insertion *ltpg* isolées qui ont été retenues pour les analyses de subérine, *ltpg30-1* et *ltpg15-2/16-1* sont d'écotypes différents (Ws et Col-0 respectivement). La technique des micro ARN artificiels a donc été choisie dans le but de générer des mutants silencés pour les gènes *LTPG16*, *LTPG20* et *LTPG30* dans l'écotype Col-0 qui peuvent ensuite être croisés avec la lignée *ltpg15-2/ltpg16-1* qui est aussi dans l'écotype Col-0 et qui présente un niveau quasi nul de transcrits *LTPG15*. Seules les constructions amiRNA ont été générées au cours de la thèse. Les analyses de subérine ont donc été faites sur les doubles, triples et quadruple mutants *abcg* uniquement.

A



B



C

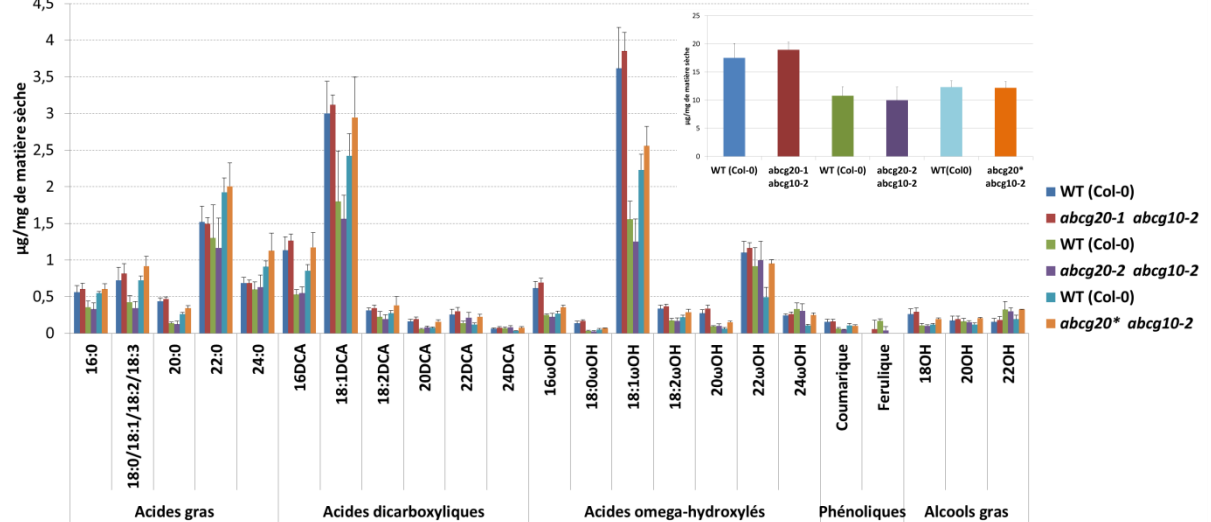


Figure 15 : Analyses par GC-MS de la composition du polymère de subérine des racines des lignées doubles mutantes. La quantité totale de subérine est indiquée dans les inserts. (n=4).

5 - 2 - Analyses de la subérine des lignées doubles et triples mutantes

5 - 2 - 1 - Analyses de la subérine des racines

Comme pour les lignées simples mutantes, le polymère de subérine des lignées issues des croisements a été analysé par GC-MS après que les racines aient été délipidées et transméthylées. Aucune différence significative de composition et de quantité de subérine n'a été observée dans les racines du double mutant *abcg2* abg10-2* comparé au sauvage (Figure 15A). Pour les différentes lignées doubles mutantes *abcg6 abcg10* et *abcg20 abgc10* les analyses de subérine ont été faites séparément. C'est pourquoi les analyses des sauvages correspondants ont été rapportées pour chaque lignée (Figures 15B et 15C). Les deux lignées doubles mutantes *abcg6 abcg10* (*abcg6-3 abcg10-2* et *abcg6* abcg10-2*) ne présentent pas de différence significative de composition et de quantité de monomères de subérine comparé au sauvage (Figure 15B). Pour les trois lignées *abcg20 abcg10* (*abcg20-1 abcg10-2*, *abcg20-2 abcg10-2*, *abcg20* abcg10-2*), des différences importantes probablement dues aux variations de conditions de culture, ont été relevées entre écotypes. Néanmoins, si chaque lignée est comparée à l'écotype sauvage correspondant, aucune variation significative pour la composition et la quantité de subérine des racines n'est constatée chez ces mutants (Figure 15C).

La composition en monomères de subérine des triples mutants *abcg2* abcg6* abcg10-2* et *abcg2* abcg20* abcg10-2* a été comparée avec les doubles mutants *abcg2* abcg6** et *abcg2* abcg20** générés dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014) (Figure 16). Les analyses de chaque mutant ont été faites séparément. Ainsi, pour chaque mutant, la composition des racines des plantes sauvages utilisées pour chaque analyse a été reportée. Les résultats ont été présentés en pourcentage molaire car des variations très importantes ont été constatées entre les différentes plantes sauvages. Dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014), les auteurs ont constaté d'importantes modifications de la composition en monomères de subérine des racines du triple mutant *abcg2* abcg6* abcg20** avec notamment une diminution de la quantité des acides gras et des acides gras ω -hydroxylés, et une augmentation des acides gras α,ω -dicarboxyliques. Cependant, des variations moins importantes du contenu de la subérine des racines ont également été constatées chez les doubles mutants *abcg2* abcg6** et *abcg2* abcg20**. Le double mutant *abcg6* abcg20** est quant à lui similaire au

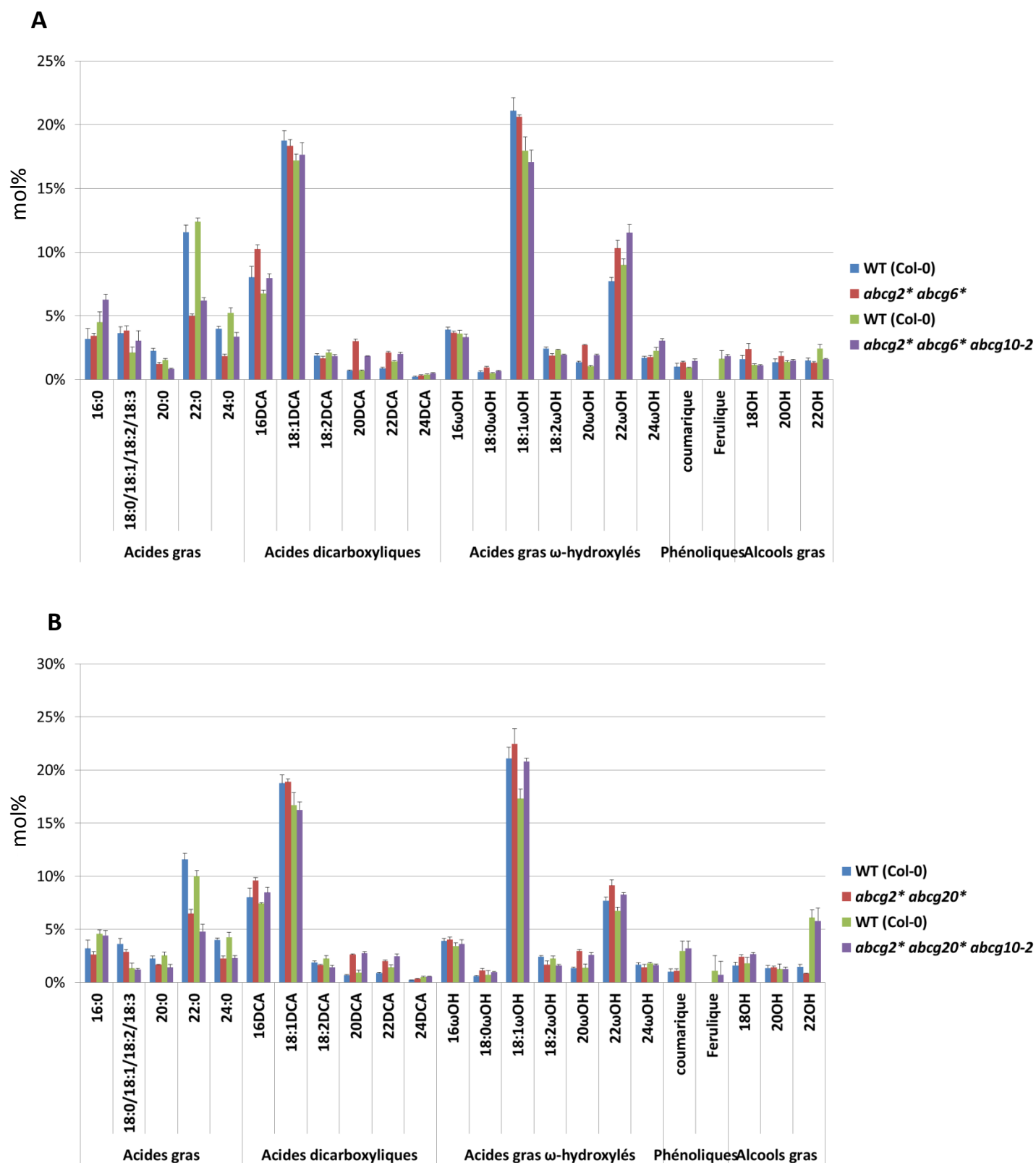


Figure 16 : Analyses par GC-MS de la composition du polymère de subérine des racines des lignées doubles et triples mutantes. Les pourcentages de chaque monomère ont été calculés à partir de la totalité des monomères ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de matière sèche). Les plantes ont poussé quatre semaines *in vitro* ($n=4$).

sauvage d'après Yadav et ses collaborateurs (2014). Nos analyses du double mutant *abcg2* abcg6** montrent que la quantité d'acides gras en C20, C22 et C24 est diminuée alors que la quantité d'acides gras α,ω -dicarboxyliques et d'acides gras ω -hydrolylés en C20 et C22 est augmentée chez ce mutant comparée au sauvage (Figure 16A). Ces mêmes altérations ont été observés chez les triple mutants *abcg2* abcg6* abcg10-2* (Figure 16A). Aucune modification significative supplémentaire n'a été relevé chez le triple mutant *abcg2* abcg6* abcg10* par rapport au double mutant *abcg2* abcg6**.

Des altérations similaires au mutant *abcg2* abcg6** sont observées chez le mutant *abcg2* abcg20**, à savoir une diminution de la quantité d'acides gras en C20, C22 et C24 et une augmentation de la quantité d'acides gras α,ω -dicarboxylique et d'acides gras ω -hydrolylés en C20 et C22 (Figure 16B). Les mêmes altérations sont retrouvées chez le mutant *abcg2* abcg20* abcg10-2* que nous avons généré. En revanche, aucune altération significative supplémentaire n'a été constatée pour le triple mutant *abcg2* abcg20* abcg10-2* par rapport au double mutant *abcg2* abcg20**.

Nos résultats indiquent donc que l'introgession de l'allèle *abcg10-2* dans les lignées *abcg2* abcg6** et *abcg2* abcg20** n'aggrave pas le phénotype des double mutants. Le croisement entre la lignée *abcg6* abcg20** et la lignée *abcg10-2* a été fait et la recherche d'homozygotes est en cours. Le quadruple mutant *abcg2* abcg6* abcg20* abcg10-2* a été généré et une lignée homozygote a été isolée et les analyses de subérine sont en cours.

5 - 2 - 2 - Analyses des graines

5 - 2 - 2 - i - Perméabilité du manteau des graines

Comme pour les lignées simples mutantes, des tests de perméabilité au tétrazolium ont été réalisés afin de détecter un éventuel défaut de perméabilité du manteau des graines des lignées doubles, triples et quadruple mutantes que nous avons générées (Figure 17). Après 48h d'incubation dans une solution de tétrazolium, le nombre de graines présentant une coloration rouge intense ne diffère pas pour les lignées doubles mutantes *abcg6-3 abcg10-2* et *abcg2* abcg10-2* comparé au sauvage (Figure 17 A et C). En revanche, les lignées mutées à la fois pour *ABCG10* et *ABCG20*, à savoir *abcg20-1 abcg10-2*, *abcg20-2 abcg10-2* et

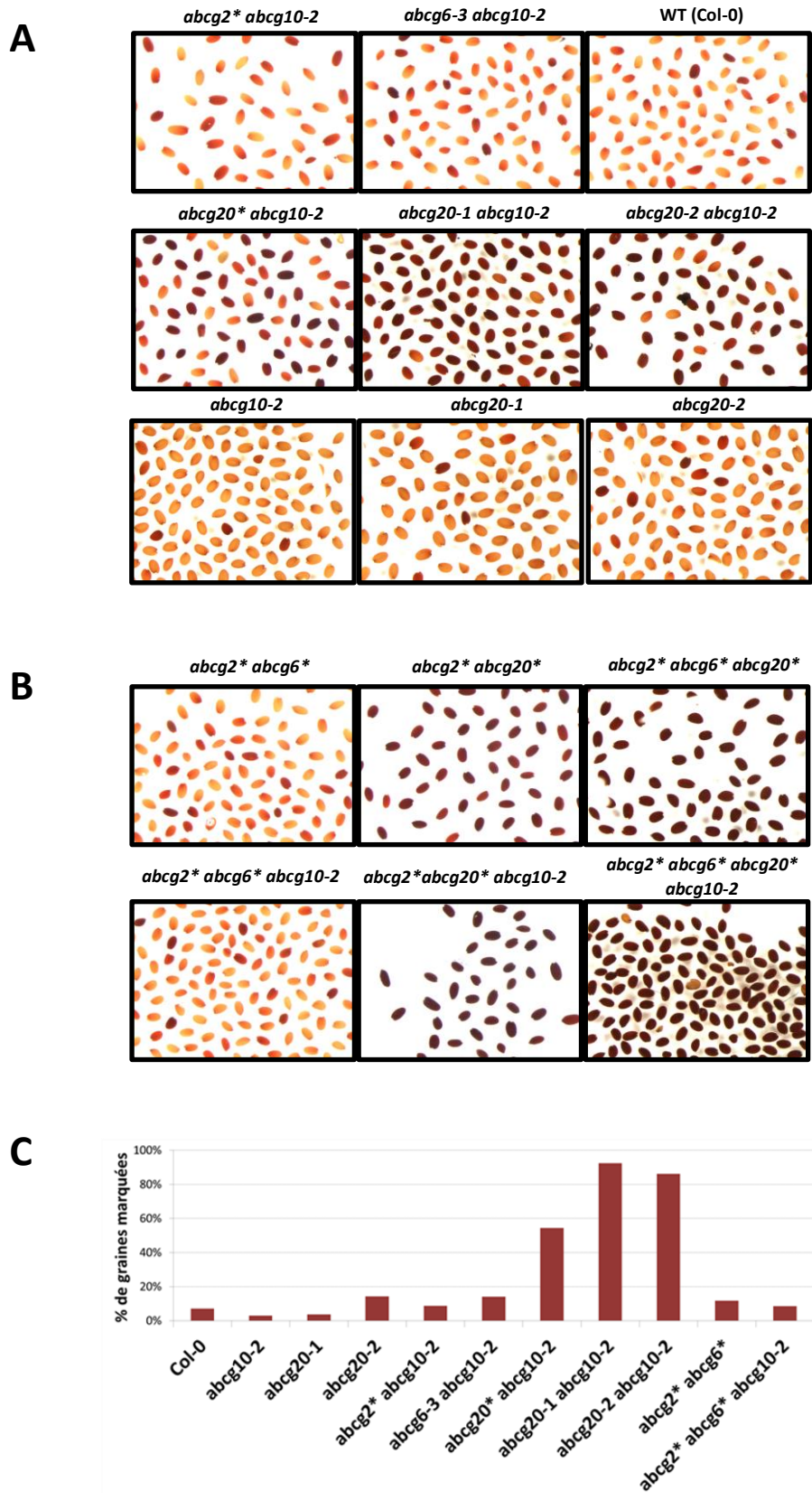


Figure 17 : Marquage au tétrazolium des graines des lignées doubles, triple et quadruple mutantes. Les graines ont été incubées 48h dans une solution de tétrazolium 1%. (n=1).

abcg20 abcg10-2*, présentent toutes un pourcentage de graines colorées plus important que les simples mutants et le sauvage (Figure 17 A et C). Environ 50 % des graines sont marquées pour le mutant *abcg20* abcg10-2* alors que les mutants *abcg20-1 abcg10-2* et *abcg20-2 abcg10-2* présentent 90 % et 85 %, respectivement, de graines marquées. Ces résultats indiquent une perméabilité plus importante du manteau des graines qui pourrait être due à un défaut de subérine chez ces doubles mutants.

Les tests de perméabilité au tétrazolium réalisés dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014) ont montré que 100% des graines du double mutant *abcg2* abcg20** et du triple mutant *abcg2* abcg6* abcg20** sont perméables au tétrazolium alors que le mutant *abcg2* abcg6** ne semble pas affecté. Les résultats des tests de perméabilité au tétrazolium que nous avons effectués sur ces lignées ont confirmé ces phénotypes (Figure 17 B). Nos analyses ont de plus montré que la perméabilité du triple mutant *abcg2* abcg6* abcg10-2* n'est pas augmentée comparée à celle du double mutant *abcg2* abcg6** (Figure 17 B et C). En effet, le pourcentage de graines marquées chez ces doubles et triple mutants est similaire à celui du sauvage (5-10%). De même, nos analyses ont montré que l'introgression de l'allèle *abcg10-2* dans les mutants *abcg2* abcg20** et *abcg2* abcg6* abcg20** ne modifiait pas la perméabilité des graines (Figure 17 B). Néanmoins, 100% des graines *abcg2* abcg20** et *abcg2* abcg6* abcg20** étant déjà perméables au tétrazolium, il est impossible de savoir si le triple mutant *abcg2* abcg20* abcg10-2* et le quadruple mutant *abcg2* abcg6* abcg20* abcg10-2* sont davantage affectés au niveau de la perméabilité avec ce type de test. Afin d'évaluer un éventuel effet, un test qualitatif plus précis reposant sur dosage du formazan (le précipité formé) à différents temps d'incubation est nécessaire. Néanmoins, ce type de test requiert un nombre important de graines, qui sont en cours d'obtention. Enfin, le croisement entre la lignée *abcg6* abcg20** et la lignée *abcg10-2* a été fait et la recherche d'homozygotes est en cours.

L'ensemble de ces résultats indique que si la perméabilité des graines des simples mutants *abcg10* et *abcg20* n'est pas affectée, celle des doubles mutants correspondants est fortement augmentée. Ces résultats sont à l'image de ceux obtenus par Yadav et ses collaborateurs (2014) avec les lignées *abcg2** et *abcg20**.

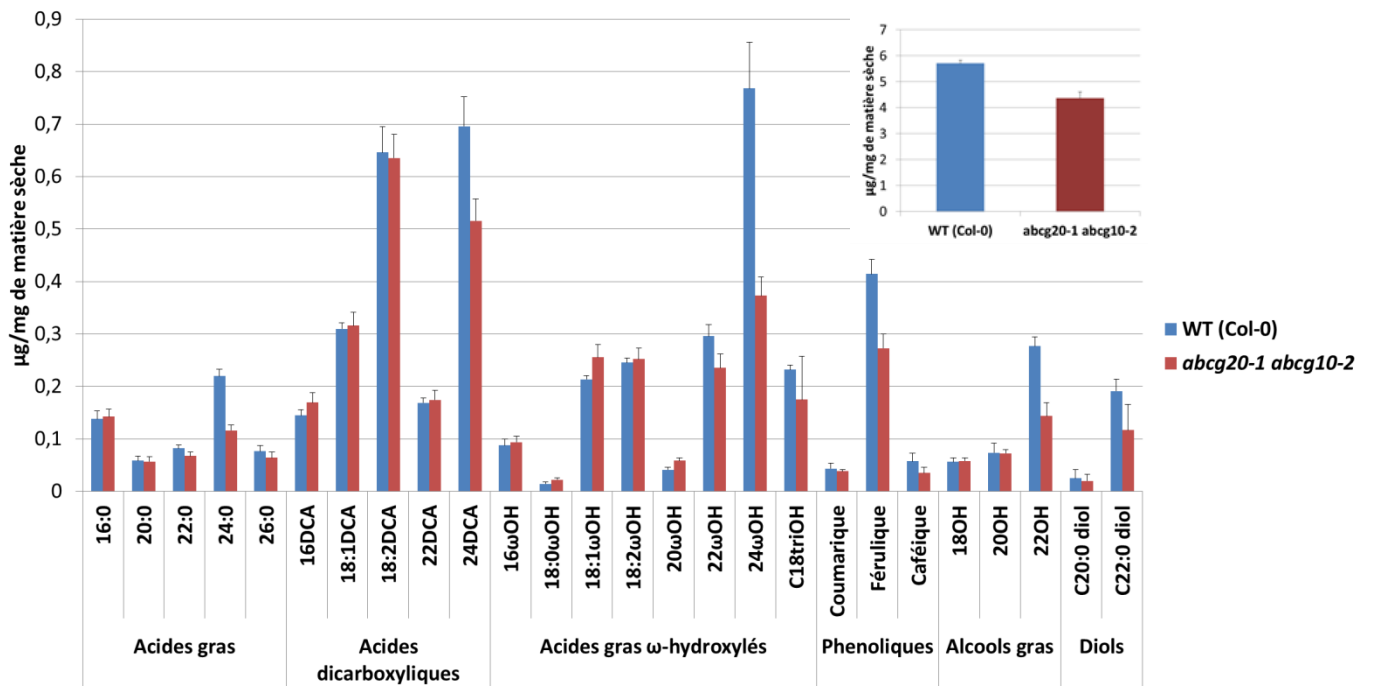


Figure 18 : Analyses par GC-MS de la composition du polymère de subérine des graines de la lignée double mutante *abcg20-1 abcg10-2*. (n=4).

D'après les résultats des tests au tétrazolium, la perméabilité du manteau des graines des lignées doubles mutantes *abcg20 abcg10* est augmentée. La composition en monomères de subérine du manteau des graines de la lignée *abcg20-1 abcg10-2* a donc été analysée par GC-MS afin de voir si l'augmentation de la perméabilité des graines de cette lignée pouvait être la conséquence d'un défaut de subérine (Figure 18). Les quantités des acides gras ω -hydroxylés et des acides gras α,ω -dicarboxyliques à 24 atomes de carbone, qui sont les composés majeurs de la subérine des graines, sont réduites d'environ 50% et 25% respectivement chez le double mutant par rapport au sauvage. De même, une diminution d'environ 50% de la quantité totale d'acides gras en C24, qui sont les acides gras majoritaires dans la subérine des graines, est observée chez ce mutant. Enfin, les alcools gras en C22, qui sont les alcools gras les plus abondants dans la subérine des graines, voient aussi leur quantité réduite de 50% environ dans le mutant *abcg20-1 abcg10-2* alors qu'aucun des composés à 18 atomes de carbones n'est pas affecté. Une réduction de 35% du composé aromatique principal de la subérine des graines, l'acide férulique, est également observée. Au final, la quantité totale des monomères de subérine est diminuée d'environ 20% chez le mutant *abcg20-1 abcg10-2* (Figure 18, insert).

Chapitre 2 - Partie 4 : Discussion et Perspectives

La quatrième partie de ce chapitre est une discussion générale, incluant diverses perspectives, de l'ensemble des résultats présentés dans les trois parties précédentes. Je discuterai d'abord de l'importance des alcools gras dans la subérine et de la subérine dans le métabolisme lipidique des racines chez *Arabidopsis* en me basant principalement sur les résultats des deux premières parties. Je discuterai ensuite les résultats obtenus sur les candidats putatifs impliqués dans le transport des monomères de subérine caractérisés dans la troisième partie de ce chapitre. Enfin, à la fin de ces discussions, une conclusion générale et les perspectives prioritaires à donner à ce travail seront proposées.

Importance des alcools gras dans la composition de la subérine

Nos analyses LC-MS/MS ont permis de montrer que les alcools gras de la fraction soluble sont principalement sous forme d'alkyl hydroxycinnamates. A l'inverse des cires du périoderme de pomme de terre qui sont fortement enrichies en alkyl férulates, les racines d'*Arabidopsis* contiennent principalement des alkyl caféates, le C22 alkyl caféate représentant généralement à lui seul plus de 50 % du total, et des alkyl coumarates. Chez *Arabidopsis*, des alkyl férulates sont aussi détectés mais ils ne représentent qu'une proportion extrêmement faible du total. La comparaison des quantités en alcools gras de la fraction soluble mesurées par LC-MS/MS et par GC-MS a de plus montré qu'environ 90 % de ces derniers étaient sous forme d'alkyl hydroxycinnamates, ce qui indique que la proportion des alcools gras de la fraction soluble sous forme libre est relativement faible. Cette composition en alkyl hydroxycinnamates et en alcools gras de la fraction soluble est fortement similaire à celles des cires de racines matures âgées de 6 à 7 semaines obtenues par immersion rapide dans du chloroforme (Kosma et al. 2015). Ces résultats suggèrent donc que les alcools gras de la fraction soluble représentent aussi des cires associées au polymère de subérine. Une localisation plus interne au niveau du périoderme de ces cires pourrait expliquer qu'elles ne soient pas extraites par immersion rapide dans le chloroforme. De plus, ces cires ne semblent pas être présentes uniquement au niveau du périoderme. En effet, les analyses des fractions soluble et polymérique des racines d'*Arabidopsis* ont montré que 80 % des alcools gras étaient systématiquement présents dans la fraction soluble. La détection d'une quantité importante d'alcools gras solubles dans des racines d'une semaine, qui ne présentent pas de périoderme à ce stade précoce de développement, suggère la présence de cires au niveau de

l'endoderme. Le fait que le gène *FACT*, qui est responsable de la biosynthèse des alkyl-caféates, soit exprimé dans le périoderme mais aussi dans l'endoderme supporte cette hypothèse (Kosma et al. 2012). Tous ces résultats indiquent donc que les des alcools gras de la fraction soluble détectés dès les premiers stades de développement sont sous forme d'alkyl hydroxycinnamates et qu'il existe des cires associées au polymère de subérine au niveau des cellules de l'endoderme. La présence de composés typiques des cires (alcools gras et alcanes) a d'ailleurs été mise en évidence dans l'endoderme de racines de soja qui est facilement séparé de l'épiderme (Thomas et al. 2007). Des analyses LC-MS/MS de la fraction soluble de racines d'une semaine sont prévues afin de confirmer qu'à ce stade précoce du développement de la racine les alcools gras solubles sont déjà sous forme d'alkyl hydroxycinnamates.

L'ensemble de nos résultats supporte l'idée que tous les alcools gras de la fraction soluble sont en fait des cires associées au polymère de subérine et font donc partie intégrante de cette barrière lipidique. Ces résultats suggèrent donc que si les alcools gras sont des composés mineurs du polymère de subérine où ils ne représentent que 5% de la totalité des monomères, ils représentent les principaux composés aliphatiques des cires associées au polymère. Ainsi en considérant la subérine dans sa globalité, c'est-à-dire en considérant que la subérine est composée du polymère et des cires associées, les alcools gras représentent alors jusqu'à 20% de la totalité des chaînes acyles formant la subérine. L'ensemble des analyses de la composition de la subérine de racine d'*Arabidopsis* présentées dans ce manuscrit indiquent que les acides gras, les alcools gras et les acides α,ω -dicarboxyliques représentent chacun entre 20 et 25% de la totalité des chaînes acyles formant la subérine, alors que la proportion des acides ω -hydroxylés est légèrement supérieure (30-35% du total). Ainsi, alors que jusqu'à présent les alcools gras étaient considérés comme des composés minoritaires de la subérine, nos résultats indiquent que chez *Arabidopsis*, les alcools gras, principalement sous forme de cires solubles associées au polymère, représentent une des composantes majeures de la subérine. Néanmoins, les acides gras ω -hydroxylés sont souvent légèrement plus abondants et ils s'accumulent au cours du développement en condition *in vitro*. Cette augmentation de la quantité d'acides ω -hydroxylés a par ailleurs aussi été observée dans les racines matures de maïs et d'*Arabidopsis* comparées à des racines en croissance primaire (Zeier et al. 1999, Höfer et al. 2008). Nos résultats confirment ainsi que l'augmentation du processus d' ω -hydroxylation est importante au cours du développement des racines. De plus, la proportion d'acides gras ω -hydroxylés est plus importante dans les racines ayant poussé en terre comparées aux conditions *in vitro*, ce qui suggère que le processus d' ω -hydroxylation doit

aussi être important pour l'ajustement de la barrière de subérine aux conditions environnementales.

A l'exception de la proportion des acides gras ω -hydroxylés qui semble augmenter légèrement au cours du développement *in vitro*, nos résultats indiquent que les proportions des différentes classes de chaînes acyles formant la subérine (acides gras, alcools gras, acides gras ω -hydroxylés et acides gras α,ω -dicarboxyliques) varient peu au cours du développement de la racine. De même, les analyses de partition des chaînes acyles entre fraction soluble et polymérisée montrent que la distribution des composés de la subérine, notamment des alcools gras, entre ces deux fractions est assez similaire au cours du développement. Ces résultats suggèrent que la synthèse des cires et du polymère de subérine serait donc coordonnée. Cette hypothèse est supportée par le fait que certaines enzymes interviennent à la fois dans la biosynthèse des composés du polymère et des cires associées à ce dernier. C'est le cas des enzymes de condensation KCS2 et KCS20 qui sont nécessaires pour la formation des composés à très longue chaîne présents au niveau du polymère de subérine et des cires (Lee et al. 2009; Franke et al. 2009). De même, FAR1, FAR4 et FAR5 sont collectivement responsables de la biosynthèse des alcools gras que l'on retrouve dans les cires sous forme d'alkyl hydroxycinnamates ainsi que dans le polymère de subérine (Vishwanath et al. 2013). Enfin, d'après les résultats présentés dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014), les trois transporteurs ABCG2, ABCG6 et ABGC20 sont impliqués dans l'export des monomères du polymère mais aussi des cires. Tous ces résultats suggèrent donc que le polymère et les cires formant la barrière de subérine sont synthétisés ensembles au cours du développement de la racine.

Nos résultats suggèrent enfin que la composition de la subérine de l'endoderme et du périoderme serait relativement similaire. En effet, dans les premiers stades de développement, les composés de la subérine proviennent exclusivement de l'endoderme alors que pour les stades plus tardifs, le périoderme doit représenter une part importante de la subérine des racines. Néanmoins les compositions globales de la subérine reportées tout au long de cette étude sont relativement semblables. Afin de comparer plus finement la composition de ces deux assises cellulaires, il faudrait étudier séparément la composition de la subérine de l'endoderme et du périoderme. Cependant, les racines d'*Arabidopsis* sont très fines et la séparation du périoderme du reste de la racine (et donc de l'endoderme) est difficilement réalisable sur ce matériel. Une alternative consisterait à utiliser une autre espèce ayant des

racines plus épaisses, comme par exemple le colza (*Brassica napus*) ou la cameline (*Camelina sativa*) qui comme *Arabidopsis* appartiennent à la famille des Brassicacées.

Importance de la subérine dans le métabolisme lipidique de la racine

Le principal rôle des chaînes acyles est de constituer les glycérolipides formant l'ensemble des membranes d'une cellule. Alors que les chaînes acyles des endomembranes comme celles du RE, de l'appareil de Golgi, du tonoplaste entourant la vacuole ou de la membrane nucléaire sont principalement retrouvées au niveau de glycérolipides, celles de la membrane plasmique sont aussi présentes en forte quantité au niveau des sphingolipides (Cacas et al. 2015). Dans certaines cellules spécialisées comme l'épiderme des parties aériennes, les chaînes acyles sont aussi les constituants principaux de la cuticule puisqu'elles servent de précurseurs à la biosynthèse de tous les composés aliphatiques formant le polymère de cutine et les cires cuticulaires (Bernard et Joubès, 2012). Au niveau des racines, le polymère de subérine et les cires associées sont de la même façon principalement constitués de chaînes acyles (Vishwanath et al. 2013). Dans les racines d'*Arabidopsis*, les seules assises cellulaires subérisées sont l'endoderme et le périderme. Une part des chaînes acyles de la racine est donc dédiée à la formation de la subérine retrouvée dans ces deux tissus. Si la composition de la subérine des racines d'*Arabidopsis* a été relativement bien décrite dans la littérature, aucune étude ne s'est à ce jour intéressée à la part occupée par la subérine dans le métabolisme global lipidique de la racine.

Les analyses globales des chaînes acyles que nous avons réalisées sur des racines de quatre semaines ayant poussé *in vitro* ont révélé que les composés majoritaires de la subérine comme les acides gras ω -hydroxylés et α,ω -dicarboxyliques en C16:0 et C18:1, mais aussi les alcools gras en C18, C20 et C22, représentent une forte proportion de la totalité des chaînes acyles de la racine. Ainsi, l'ensemble des acides gras ω -hydroxylés, l'ensemble des acides α,ω -dicarboxyliques et l'ensemble des alcools gras représentent chacun environ 10% de la totalité des chaînes acyles de la racine. Ces composées, bien que présents uniquement au niveau de la subérine de l'endoderme et du périderme, sont ainsi aussi abondants que les acides 2-hydroxylés des sphingolipides, qui eux sont présents dans toutes les cellules de la racine.

Les analyses de la composition en chaînes acyles des fractions solubles et polymérisées des racines nous ont ensuite permis d'avoir une idée précise de leur répartition. Nous avons d'abord montré que les acides 2-hydroxylés retrouvés dans la fraction polymérique pouvaient

être éliminés grâce à des lavages aqueux et salins, suggérant que ces composés ne participent pas à la formation du polymère de subérine. L'hypothèse la plus probable est que les acides 2-hydroxylés sont issus des GIPCs, les sphingolipides majoritaires chez les plantes (Cacas et al. 2015). Les GIPCs peuvent en effet avoir une tête fortement glycosylée et dont hautement polaire, ce qui les rend difficilement extractibles avec des solvants organiques « classiques » comme le chloroforme et le méthanol. Ces GIPCs qui ne sont pas éliminés lors de la délipidation des racines se retrouvent alors avec le résidu pecto-cellulosique contenant le polymère de subérine. Ainsi quand ce dernier est transméthylé puis silylé afin de dépolymériser et d'analyser la composition du polymère de subérine, des acides gras 2-hydroxylés sont détectés bien qu'ils n'appartiennent pas à la fraction polymérique de la subérine. Lors de calculs visant à étudier la répartition de l'ensemble des chaînes acyles dans la racine, nous avons donc considéré que les acides 2-hydroxylés solubles et ceux retrouvés dans la fraction polymérique représentaient l'ensemble des sphingolipides. Ayant montré que l'ensemble des alcools gras de la fraction soluble, dont la majorité est sous forme d'alkyl hydroxycinnamates, représentait les cires associées au polymère de subérine, nous avons ensuite considéré que la subérine comprenait tous les alcools gras et tous les acides gras ω -hydroxylés et α,ω -dicarboxyliques (solubles et polymérisés) ainsi que l'ensemble des acides gras non substitués de la fraction polymérique. Enfin, nous avons considéré que le reste des chaînes acyles, c'est-à-dire les acides gras non substitués de la fraction soluble, représentait les chaînes acyles de l'ensemble des glycérolipides formant les membranes cellulaires. Ces considérations nous ont permis de montrer que la subérine représentait environ 40 % de l'ensemble des chaînes acyles de racines de plantes d'*Arabidopsis* ayant poussé 4 semaines *in vitro*. Dans le cas de racine de plantes ayant poussé en terre pendant 8 semaines, la part des chaînes acyles retrouvées dans la subérine atteint même 60 % de la totalité des chaînes acyles. Ces résultats indiquent qu'une part très importante (40 à 60 %) du métabolisme des chaînes acyles de la racine est donc dédiée à la synthèse de la subérine alors que cette dernière est déposée uniquement dans deux assises cellulaires, le périoderme et l'endoderme.

Le glycérol est un des constituants de tous les glycérolipides mais il est aussi retrouvé en quantité non négligeable dans le polymère de subérine. Chez la pomme de terre, des expériences de dépolymérisation partielle ont par exemple montré que 88 % des oligomères de subérine étaient sous forme d'acyl-glycérol (Graça et al. 2015). Il serait donc intéressant d'évaluer la répartition du glycérol entre les glycérolipides des membranes et la subérine, comme nous l'avons fait pour les chaînes acyles. Cependant, les différents protocoles de

dosage du glycérol sont difficilement applicables pour le polymère de subérine des racines d'*Arabidopsis* car les quantités présentes y sont trop faibles. Néanmoins, une alternative envisageable serait de comparer la quantité de glycérol totale obtenue suite à une analyse globale des lipides des racines et de la comparer avec celle trouvée dans la fraction soluble contenant tous les glycérolipides. Par simple soustraction, il serait alors possible de calculer la quantité de glycérol présent au niveau du polymère de subérine.

Vers une meilleure connaissance de la subérine chez *Arabidopsis*

Les études que j'ai menées ont souligné l'importance des alcools gras dans la subérine et de la subérine dans le métabolisme lipidique des racines d'*Arabidopsis*. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche.

Nos analyses ont montré que la proportion de chaînes acyles allouées à la subérine est conséquente dès les premiers stades de développement de la racine. De plus, celle-ci augmente au cours de la croissance de la plante. Cette augmentation peut être due au nombre croissant de cellules subérisées qui apparaissent au cours du développement de la racine. Les analyses de subérine le long de racines d'*Arabidopsis* de 5 semaines réalisées par Höfer et ses collaborateurs (2008) ont montré que la zone III, correspondant à la zone la plus mature avec un périoderme développé, contient le plus de subérine. Au début du développement des racines, les seules cellules subérisées sont celles de l'endoderme, ce qui correspond à un nombre assez réduits de cellules. Le périoderme commence ensuite à se développer à la surface des racines. Contrairement à l'endoderme, le périoderme contient plusieurs couches de cellules subérisées et va donc contribuer à l'augmentation de la quantité de subérine des racines au cours de la croissance. D'après nos analyses de l'activité des promoteurs de gènes impliqués dans la subérine, il semble qu'*in vitro* le développement du périoderme débute entre la deuxième et la troisième semaine. Afin d'évaluer de manière plus précise la transition entre endoderme et périoderme, il serait intéressant d'analyser en microscopie des racines à différents stades de croissance. L'étude de racines colorées au rouge soudan combinée à des observations sous UV pourrait être réalisée afin de mieux décrire l'apparition du périoderme au cours du développement de la racine chez *Arabidopsis*.

Une autre perspective à ce travail serait de déterminer l'implication des alcools gras solubles dans la mise en place et l'efficacité de la barrière de subérine. En effet, si nous avons montré que les alcools gras représentent en fait des composés importants de la subérine, leur rôle demeure méconnu. Les analyses d'ultrastructure de la subérine chez les mutants *far1 far4*

far5 et *fact1* n'ayant pas révélé de modification, ces résultats suggèrent que les alcools gras ne sont pas essentiels pour la mise en place correcte de la subérine dans les racines. L'utilisation de sondes permettant de mesurer les flux d'eau et de solutés dans les racines du mutant *far1 far4 far5* pourrait permettre d'étudier l'implication des alcools gras dans les propriétés de barrière de la subérine. Il serait également intéressant d'utiliser ces sondes pour les racines du mutant *fact1*. En effet, ce mutant étant seulement affecté au niveau des cires associées au polymère de subérine, cela pourrait permettre de déterminer le rôle des alcools gras sous forme d'alkyl hydroxycinnamates dans les propriétés de barrière de la subérine. Les alcools gras et les alkyl hydroxycinnamates présents dans la subérine pourraient être aussi nécessaires pour la défense contre les pathogènes. En effet, des études ont rapporté un rôle antibactérien de ces composés (Masao et al. 1987 ; Togashi et al. 2007; Baranowski and Nagel 1982). Des tests de résistances aux pathogènes sur les mutants affectés au niveau de leur composition en alcools gras et en alkyl hydroxycinnamates seraient un moyen de tester cette hypothèse.

Enfin même si cela n'a jamais été démontré, il est possible que comme dans les racines, la subérine du manteau des graines contienne aussi des cires associées au polymère. Chez le mutant *far1 far4 far5*, une augmentation de la perméabilité du manteau de la graine a été observée. Le fait que la quantité d'alcools gras et de diols soit réduite de 75 % dans les graines du mutant peut expliquer ce défaut de perméabilité. Cependant, l'ensemble des alcools gras et des diols ne représentent que 10 % des composés du polymère de subérine des graines. Il est possible que ces défauts de perméabilité soient en fait dus non pas aux alcools gras polymérisés mais plutôt à ceux associés au polymère de subérine sous forme de cires. Il paraît donc judicieux d'essayer de déterminer si le manteau des graines d'*Arabidopsis* contiendrait des alkyl hydroxycinnamates en utilisant la méthode LC-MS/MS que nous avons développée.

Etude des mécanismes impliqués dans l'export des monomères de subérine

Une partie importante des travaux de ma thèse a consisté à essayer de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'export des précurseurs de la subérine en recherchant chez *Arabidopsis* des gènes impliqués dans ce processus. En utilisant les bases de données qui comparent les domaines d'expression des gènes à partir de données de transcriptomique, nous avons sélectionné comme candidats 3 gènes codant pour des ABCG transporteurs (ABCG6, 10 et 20) et 4 gènes codant pour des LTPGs (LTPG 15, 16, 20 et 30). Tous ces gènes sont co-exprimés avec plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de la

subérine et l'implication de ce type de protéine dans l'export des monomères de la cuticule a été démontrée. En étudiant plus en détails les données de transcriptomique disponibles, j'ai constaté que tous les gènes candidats étaient exprimés spécifiquement au niveau des sites de déposition connus de la subérine, à savoir l'endoderme des racines et le manteau des graines. De plus, des études de transcriptomique réalisées sur l'expression des gènes candidats au niveau des racines d'*Arabidopsis* ont montré que celle-ci était induite par un stress salin uniquement dans les cellules de l'endoderme. Ces résultats coïncident avec le fait qu'un stress salin augmente la quantité de subérine dans les racines d'*Arabidopsis* (Franke et al. 2005). Une étude ayant montré que le facteur de transcription *AtMYB41* était capable d'activer la transcription des gènes impliqués dans la synthèse et le dépôt de la subérine (Kosma et al. 2014), j'ai utilisé des plantes d'*Arabidopsis* surexprimant ce facteur de transcription afin de voir si l'expression de nos gènes candidats y était modifiée. Les analyses par PCR quantitative que j'ai réalisées ont montré que tous nos gènes candidats, excepté *ABCG20*, étaient régulés positivement par *AtMYB41*.

Afin de confirmer ces études de transcriptomique, j'ai dans un premier temps analysé les domaines d'expression de nos gènes candidats à l'aide de la technique du gène rapporteur GUS. Ces analyses ont confirmé que tous les gènes candidats sélectionnés étaient bien exprimés au niveau de l'endoderme des racines. De plus, l'analyse de l'activité des promoteurs des trois candidats de type *ABCG* chez des plantes ayant poussé en terre a révélé une expression dans le périderme des racines, dans les étamines ainsi que dans la zone d'abscission des pétales. Tous ces domaines d'expression représentant des sites connus de subérisation, ces expériences nous ont confortés dans le choix de nos gènes candidats.

J'ai ensuite cherché à isoler des lignées perturbées pour l'expression de nos gènes candidats afin ensuite d'étudier les effets de ces perturbations sur la composition et la quantité de subérine des racines et des graines. A l'exception de *LTPG20*, j'ai réussi à isoler pour chaque gène candidat une ou plusieurs lignées homozygotes où l'expression du gène candidat était soit complètement éteinte (knock-out), soit diminuée (knock-down). Néanmoins, l'analyse du polymère de subérine des racines et des graines par GC-MS n'a révélé aucune modification de la composition ou de la quantité de subérine chez les lignées simples mutantes *abcg6*, *abcg10*, *abcg20*, *ltpg15*, *ltpg16* et *ltpg30*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer qu'aucun phénotype subérine n'ait pu être mis en évidence. Pour certaines lignées, le niveau de transcrits n'est pas nul et il est possible que les quantités de transcrits restantes soient suffisantes pour assurer la fonction du gène muté. Une autre hypothèse est l'existence

de phénomène de redondance fonctionnelle. En effet, les gènes candidats appartiennent à des familles multigéniques et il se peut qu'un ou plusieurs gènes de la même famille puissent pallier à la fonction défaillante du gène muté. L'étude de Yadav et collaborateurs (2014) a montré que tel est le cas pour deux des gènes candidats que j'avais sélectionnés, *ABCG6* et *ABCG20*. En effet, cette étude a confirmé l'implication de trois ABCG transporteurs, *ABCG2*, *ABCG6* et *ABCG20*, dans l'export des monomères de subérine chez *Arabidopsis*. Néanmoins, aucune des lignées simples mutantes ne présentait de défaut au niveau de la subérine des racines et des graines et seul le triple mutant *abcg2 abcg6 abcg20* présentait des modifications importantes de la subérine impactant ses propriétés de barrière au niveau des racines et des graines. Ces résultats ont donc confirmé qu'il y avait bien des phénomènes de redondance fonctionnelle qui pouvaient expliquer l'absence de phénotype chez les lignées simples mutantes.

L'étude de Yadav et collaborateurs (2014) a été publiée au moment où je générerais mes propres lignées doubles mutantes. Cette étude ayant confirmé l'implication chez *Arabidopsis* de deux de mes gènes candidats, *ABCG6* et *ABCG20*, dans l'export des monomères de subérine, nous avons alors décidé de nous focaliser en priorité sur le rôle potentiel joué par le troisième candidat de type ABCG transporteur, *ABCG10*.

Implication du transporteur ABCG10 dans l'export des monomères de subérine

La génération de plusieurs combinaisons de doubles mutants avec la lignée *abcg10-2* et les autres lignées *abcg* nous a permis de montrer que les doubles mutants *abcg20 abcg10* présentaient une augmentation de la perméabilité au tétrazolium au niveau des graines. Chez la lignée *abcg20-1 abcg10-2*, une diminution des monomères de subérine en C24 ainsi que des alcools gras en C22 a été constatée dans la graine. La quantité d'acide férulique est également diminuée chez ces lignées. Des expériences de dépolymérisation partielle ont montré que, dans le polymère de subérine, l'acide férulique était principalement sous forme estérifiée avec des acides gras ω -hydroxylés (Graça and Pereira, 2000). Chez le mutant *cyb86b1*, une réduction des acides gras ω -hydroxylés en C22 et C24 entraîne une diminution de l'acide férulique, et chez le mutant *asft*, la réduction de l'acide férulique a pour conséquence une réduction de la quantité des acides gras ω -hydroxylés (Molina et al. 2009). Il se pourrait donc que les gènes *ABCG10* et *ABCG20* soient requis pour l'export des monomères en C24, et que la réduction des acides gras ω -hydroxylés en C24 chez les mutants *abcg20 abcg10* soit à l'origine de la diminution en acide férulique. Il se peut aussi que ces

deux gènes interviennent dans l'export de l'acide férulique et que la diminution en acides gras ω -hydroxylés en C24 chez ce mutant soit due à une réduction de la quantité en acide férulique. Cette hypothèse est néanmoins peu probable car aucune diminution des autres acides gras ω -hydroxylés n'a été relevée chez le mutant *abcg20-1 abcg10-2*. En ce qui concerne la diminution en alcool gras en C22, il est possible que ce phénotype soit indirect. En effet, il a été montré chez le triple mutant *abcg2 abcg6 abcg20* que la forte diminution de la quantité d'alcool gras C22 au niveau du polymère de subérine et des cires associées était due à une diminution de l'expression de *FAR1*, qui code pour l'enzyme principalement responsable de la synthèse de ce composé. L'expression de *FAR1* dans les différentes lignées *abcg20 abcg10-2* devra donc être étudiée.

Les tests de perméabilité au tétrazolium sur le simple mutant *abcg10-2*, les doubles mutants *abcg2 abcg10* et *abcg6 abcg10*, et le triple mutant *abcg2* abcg6* abcg10-2* n'ont pas révélé de modification de la perméabilité du manteau des graines. Il est possible que dans ces mutants, le gène *ABCG20* puisse compenser la perte de fonction de ces gènes. Dans l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014), le double mutant *abcg2* abcg20* et le triple mutant *abcg2* abcg6* abcg20** présentent un défaut de perméabilité des graines. Il semble donc que, dans ce cas, le gène *ABCG10* ne permette pas ou du moins pas totalement de compenser la perte de fonction de ces gènes, même s'il semble être surexprimé chez le triple mutant *abcg2* abcg6* abcg20**. Néanmoins il serait intéressant de comparer la composition de la subérine des graines de ces mutants avec les lignées triple mutant *abcg2* abcg20* abcg10-2* et quadruple mutant *abcg2* abcg6* abcg20* abcg10-2*. En effet, il se pourrait que la mutation d'*ABCG10* dans ces lignées entraîne des altérations supplémentaires de la composition et/ou de la quantité de subérine au niveau du manteau des graines. Il se pourrait aussi que le défaut de perméabilité du mutant *abcg20-1 abcg10-2* soit lié à une altération de la composition des cires associées au polymère de subérine du manteau des graines si celles-ci existent. La forte diminution en alcool gras en C22 observée au niveau du polymère de subérine des graines suggère que si le même type de cires existe au niveau de la subérine des graines qu'au niveau des racines, celles-ci seraient alors fortement perturbées chez le mutant *abcg20-1 abcg10-2*, ce qui pourrait impacter la perméabilité du manteau des graines.

Implication de multiples acteurs dans l'export des monomères de subérine

Alors qu'une altération de la composition de la subérine a été constatée dans les graines du double mutant *abcg20 abcg10*, aucune différence de composition n'a été relevée pour ce

mutant au niveau de la subérine des racines. Cela suggère que les acteurs impliqués dans le transport des précurseurs de subérine sont différents en fonction des tissus de la plante. Il a ainsi été montré que le transporteur ABCG13 était spécifiquement requis pour la synthèse de la cuticule des fleurs (Panishkavili et al. 2011) alors qu'ABCG11 est entre autres nécessaire au transport des précurseurs de la cuticule des tiges (Bird et al. 2007; Panikashvili et al. 2007). De même, l'étude de Yadav et ses collaborateurs (2014) a montré que si *abcg2 abcg20* et *abcg6 abcg20* présentaient tous les deux des altérations de la composition du polymère de subérine des racines, seul *abcg2 abcg20* présentait un phénotype au niveau de la subérine du manteau des graines. Mes analyses ont montré que comme *abcg20 abcg10*, les doubles mutants *abcg6 abcg10* et *abcg2 abcg10* ne présentaient pas de modification des monomères de la subérine des racines. De même, aucune modification supplémentaire n'a été notée chez le triple mutant *abcg2 abcg6 abcg10* comparé au double mutant *abcg2 abcg6*. Même si ces résultats laissent supposer que ABCG10 n'est pas impliqué dans le transport des précurseurs de subérine au niveau des racines, il serait intéressant d'étudier le triple mutant *abcg6 abcg10 abcg20* et surtout le quadruple mutant *abcg2 abcg6 abcg10 abcg20* pour voir si ABCG10 y joue éventuellement un rôle, d'autant plus qu'ABCG10 est surexprimé dans les racines du triple mutant *abcg2 abcg6 abcg20*. Une autre hypothèse serait que le transporteur ABCG10 pourrait être requis pour augmenter la synthèse de la subérine dans les racines en condition de stress uniquement. L'augmentation du niveau des transcrits d'ABCG10 dans les cellules de l'endoderme rapportée par les analyses de transcriptomique supporte cette hypothèse. De plus, il a été montré que le facteur de transcription *AtMYB41* était exprimé dans les racines seulement après ajout d'ABA et lors d'un stress salin (Kosma et al. 2014). Ces résultats suggèrent qu'en condition de stress il y a un remaniement au niveau de l'expression de certains gènes de la biosynthèse de la subérine avec la possibilité qu'interviennent alors des gènes qui ne participent pas ou peu en condition non stressée.

Contrairement à ce qui est proposé par les bases de données de transcriptomique, nous avons montré que le promoteur du gène *ABCG10* a aussi une activité dans les étamines comme *ABCG2*, *6* et *20*. Yadav et ses collaborateurs (2014) ont montré qu'ABCG 1, 16 et 20 sont nécessaires à la formation de différentes couches de la paroi des grains de pollen, dont une, l'exine, est constituée du polymère de sporopollénine. ABCG10 pourrait donc aussi être impliqué dans la formation de la paroi des grains de pollen. Néanmoins, pour déterminer ce rôle, il sera nécessaire de générer des lignées multiples mutantes car seules les lignées *abcg1 abcg16* et *abcg1 abcg16 abcg20* sont caractérisées par des grains de pollen défectueux.

Tous les ABCG transporteurs identifiés comme participant à la synthèse de la subérine doivent se dimériser pour être fonctionnels. Il est donc possible que différentes combinaisons de transporteurs interviennent dans le processus d'export. Cela a été montré pour la cuticule, où l'hétérodimère ABGC11/ABCG12 intervient dans l'export des précurseurs des cires cuticulaires alors que l'homodimère ABCG11/ABCG11 est nécessaire pour la formation de la cutine (Bird et al. 2007; McFarlane et al. 2010). De même, par des expériences de BiFC, il a été montré qu'ABCG9, ABCG11 et ABCG14, qui sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie lipides/stérols, étaient capables de former différentes combinaisons de dimères (Le Hir et al. 2013). Il serait donc intéressant de tester par BiFC les différentes associations qui peuvent exister entre les quatre transporteurs ABCG2, ABCG6, ABCG10 et ABCG20. Plusieurs constructions BiFC pour *ABCG6*, *10* et *20* ont ainsi été réalisées au cours de ma thèse, mais elles n'ont pas encore été exploitées.

Enfin, il ne faut pas oublier qu'ABCG10 n'appartient pas au même clade que les trois autres transporteurs ABCG2, ABCG6 et ABCG20, ce qui pourrait expliquer qu'ils n'aient pas exactement le même rôle. Un autre ABCG transporteur, ABCG23, qui est dans le même clade qu'ABCG10, présente aussi un profil typique des gènes impliqués dans la synthèse de la subérine. L'analyse du double mutant *abcg10 abcg23* pourrait permettre d'en savoir davantage quant au rôle d'ABCG10 dans l'export des précurseurs de subérine.

Le rôle des transporteurs de type ABCG est de permettre le passage à travers la membrane de composés divers. Il est évident que d'autres types de protéines sont requises pour le transport des précurseurs de subérine depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à l'espace apoplastique. Même si j'ai sélectionné plusieurs LTPGs qui étaient co-exprimés avec des gènes impliqués dans la biosynthèse de la subérine, je n'ai pas pu mettre en évidence leur rôle dans l'export des monomères de subérine. Comme pour les ABCG transporteurs, il est fort probable qu'il y ait des phénomènes de redondance fonctionnelle et qu'il soit donc nécessaire de générer des plantes mutées pour plusieurs LTPGs à la fois. Comme mes différentes lignées simples mutantes étaient dans des fonds génétiques différents, j'ai entrepris de générer des plantes amiRNA afin de confirmer l'implication des LTPGs candidats dans l'export des précurseurs de la subérine.

Conclusion générale

En conclusion, nos résultats ont montré que les alcools gras des racines qui ne sont ni polymérisés et ni extraits par immersion rapide dans du chloroforme sont principalement sous forme d'alkyl hydroxycinnamates, et constitueraient ainsi des cires associées au polymère de subérine. Les alcools gras doivent donc être considérés comme des composés majeurs de la subérine, au même titre que les acides gras α,ω -dicarboxyliques et les acides gras non substitués. D'après les résultats des analyses faites au cours de la croissance racinaire, les cires associées au polymère de subérine sont synthétisées dès les premiers stades de développement, ce qui suggère que ces composés jouent un rôle majeur dans les fonctions de barrière de la subérine. Nous avons aussi montré que le polymère de subérine et les cires qui lui sont associées représentent une part considérable du métabolisme des chaînes acyles des racines. La subérine est un hétéropolymère composé de molécules aliphatiques et aromatiques et cette complexité semble être reflétée par la multiplicité des mécanismes de transport impliqués dans l'export des monomères de subérine. En effet, mes résultats suggèrent qu'en plus des trois ABCG transporteurs impliqués dans l'export des monomères de subérine décrit par Yadav et collaborateurs (2014), un autre membre de cette famille de protéine, ABCG10, serait également impliqué dans l'export des précurseurs du polymère de subérine de la graine. La perspective principale de ce travail de thèse sera donc de confirmer qu'ABCG10 est bien un des acteurs des mécanismes d'export des monomères de subérine au niveau du manteau de la graine d'*Arabidopsis*.

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES

1 - Matériel biologique

1 - 1 - Matériel végétal et conditions de culture

1 - 1 - 1 - Matériel végétal

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* utilisées dans les parties 1 et 2 du chapitre II ainsi que pour les transformations transitoires sont d'écotype Columbia-0 (Col-0).

Les lignées d'insertion utilisées pour la partie 3 du chapitre II sont d'écotypes différents et sont listées dans le tableau 4 de la troisième partie du chapitre II. Elles ont été obtenues auprès du NASC ainsi que du centre de ressources d'*Arabidopsis thaliana* de Versailles. Pour le génotypage des lignées d'insertion, les amorces de PCR ont été choisies avec l'outil « T-DNA Primer Design » du SIGnAL (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Les amorces sont listées en annexe I. Deux PCRs ont été réalisées sur chaque lignée à tester : une avec les amorces sens et antisens spécifiques du gène, une avec l'amorce sens ou antisens spécifique du gène et l'amorce spécifique de l'ADN-T. Des lignées d'insertion pour les ABCG transporteurs nous ont été données par Jason Reed. Ces lignées sont listées dans le tableau 6 de la troisième partie du chapitre II. Des lignées doubles, triples et quadruple mutantes pour les ABCG transporteurs candidats ont été obtenues par croisement des lignées parents homozygotes et ont été génotypées avec les amorces utilisées pour les simples mutants. Ces lignées sont listées dans le tableau 7 de la troisième partie du chapitre II.

Pour déterminer la localisation tissulaire de l'activité des gènes candidats au transport des précurseurs de subérine, des lignées prom*GENE-CANDIDAT::GUS* ont été générées (promoteur du gène candidat fusionné à la séquence codante de la β -glucuronidase dans le vecteur pKGWFS7).

1 - 1 - 2 - Stérilisation des graines

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont stérilisées en surface par immersion dans une solution d'éthanol 70% (v/v) pendant 1 minute puis dans une solution à 3,2% (v/v) de chlore

actif pendant 10 minutes. Elles sont finalement rincées six fois dans de l'eau stérile. Les graines ont aussi été stérilisées au gaz pendant 3h dans une cloche contenant 100mL de chlore actif 12% et 3mL d'acide chlorhydrique 12N. Les graines du triple mutant *abcg2* abcg6* abcg20** et du quadruple mutant *abcg2* abcg6* abcg20* abcg10-2* ont été stérilisées seulement 10 minutes dans l'éthanol car elles présentent un défaut de perméabilité du manteau rendant impossible une stérilisation au chlore actif.

1 - 1 - 3 - Milieux et conditions de culture

Les graines stérilisées sont semées sur boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé composé de 4,4g/L de milieu MS (Murashige and Skoog) ; 0,5g/L de MES et 7 g/L d'agar. Le milieu est à pH 5,7 (pH ajusté à l'hydroxyde de potassium, KOH). Pour la sélection des lignées transgéniques *promGENE-CANDIDAT::GUS*, de la kanamycine (35µg/mL) a été ajoutée au milieu gélosé.

Les boîtes sont ensuite placées 48h à 4°C afin de synchroniser la germination et lever la dormance des graines. Les plantules sont ensuite disposées en chambre de culture *in vitro* avec une alternance jour/nuit 16h/8h, à une température de 20-22°C et une hygrométrie de 40-60%.

Pour la culture en terre, des plantules âgées de 3 semaines environ sont transférées sur un support terreau:perlite:vermiculite (2:1:1, v/v/v). Un dôme en plastique est déposé quelques jours afin de maintenir une humidité élevée. Les plantes sont installées dans une chambre de culture avec une alternance jour/nuit 16h/8h, à une température de 20-22°C et une hygrométrie de 40-60%.

Lorsque les siliques sont complètement sèches, les graines sont récoltées.

1 - 2 - Souches bactériennes et milieux de culture

Tous les clonages ont été réalisés dans la souche *Escherichia coli* DH5α.

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 a été utilisée pour les transformations stables et transitoires des plantes d'*Arabidopsis*. Elle possède le plasmide pMP90 qui contient

les gènes de virulence Vir permettant le transfert de l'ADN de Transfert (ADN-T) dans le noyau des cellules végétales.

Les bactéries sont cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) (Bactotryptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v)) en présence ou non d'antibiotique et à la température appropriée (37°C pour *E.coli* et 30°C pour *A. tumefaciens*). Les concentrations des antibiotiques utilisés sont présentées dans le tableau 1. Pour les milieux solides 1,5% (p/v) d'agar bactériologique sont ajoutés au LB. Les milieux sont stérilisés à 120°C pendant 20 minutes.

Tableau 1 : Concentrations des antibiotiques utilisés

Antibiotiques	Bactéries	Agro-bactéries
Ampicilline	100µg/mL	
Gentamycine		20µg/mL
Kanamycine	50µg/mL	
Spectinomycine	50µg/mL	100µg/mL

2 - Méthodes de biologie moléculaire

2 - 1 - Extraction des acides nucléiques

2 - 1 - 1 - Extraction d'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana*

L'ADN génomique d'*Arabidopsis* a été extrait en utilisant le « GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit » (Sigma®). Une feuille d'*Arabidopsis* est placée dans un tube eppendorf stérile contenant une bille en acier inoxydable et 350µL de tampon de lyse contenu dans le kit. La feuille est broyée trois fois 30 secondes par un appareil Tissuelyser II (Qiagen®). Pour la suite des étapes d'extraction, le protocole indiqué par le fabricant a été suivi.

Pour un nombre conséquent d'échantillons, l'ADN génomique a été extrait selon la méthode d'Edwards et ses collaborateurs (1991). Une feuille d'*Arabidopsis* est placée dans un

tube eppendorf stérile contenant une bille en acier inoxydable et 400µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 200mM pH7.5 ; NaCl 250mM ; EDTA 25mM et SDS 0.5% (p/v)). La feuille est broyée trois fois 30 secondes par un appareil TissueLyser II (Qiagen®). L'échantillon est centrifugé à 17900 g pendant 1 minute. Trois cent µL de surnageant sont récupérés dans un tube stérile dans lequel est ajouté 300µL d'isopropanol. Après 2 minutes à température ambiante, l'échantillon est centrifugé à 17900 g pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé, le culot est lavé avec 1mL d'éthanol à 70° et centrifugé 3 minutes à 17900 g pendant 3 minutes. L'éthanol est ensuite éliminé, le culot est séché à 37°C puis repris dans 100µL d'eau stérile.

2 - 1 - 2 - Extraction des ARN totaux d'*Arabidopsis thaliana*

Les tissus d'*Arabidopsis* sont congelés dans l'azote liquide et peuvent être conservés à -80°C avant l'extraction. Les tissus ont été broyés avec une bille en acier inoxydable à l'aide d'un Tissuelyser II (Qiagen®). Les ARNs totaux sont extraits des tissus à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen®). Afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique, les ARN totaux ont été traités à la DNase I en utilisant le kit « DNA-free » (Ambion) selon les recommandations du fabricant. La quantité et la qualité des ARN totaux extraits sont déterminées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm à l'aide d'un NanoDrop (Thermo).

2 - 1 - 3 - Extraction d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli*

Cinq mL de culture bactérienne contenant le plasmide d'intérêt et ayant poussé sur la nuit sont centrifugés. L'ADN plasmidique des bactéries contenu dans le culot est extrait à l'aide du kit « GenElute™ Plasmid Miniprep Kit » (Sigma®). L'élution est faite dans 80µL d'eau stérile.

2 - 2 - Amplification d'acides nucléiques

2 - 2 - 1 - Synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARN totaux par transcription inverse

La synthèse d'ADNc se fait avec le kit « SuperScript™ II Reverse Transcriptase » (Invitrogen®) à partir de 1µg d'ARN totaux et avec des amorces oligo (dT).

2 - 2 - 2 - Amplification d'acides nucléiques par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Pour l'amplification des séquences destinées à être clonées, la polymérase Q5®High-Fidelity Polymerase (BioLabs) a été utilisée. La polymérase GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega) a été utilisée pour le génotypage des lignées d'insertion d'ADN-T ainsi que pour vérifier les transformations bactériennes. Les conditions d'amplification préconisées par les fabricants ont été suivies. Les températures d'hybridation des amorces et le temps d'élongation ont été ajustés en fonction des couples d'amorces utilisés et des séquences à amplifier.

2 - 3 - Electrophorèse des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel est composé de 1% (p/v) d'agarose dissous dans du tampon TAE 0,5X (20mM Tris ; 10mM acétate de sodium pH 8,3 ; 0,5mM EDTA) et aussi du bromure d'éthidium (BET) à 3% (v/v) afin de visualiser les acides nucléiques sous UV.

2 - 4 - Purification des fragments PCR

Les produits de PCR destinés à être clonés ont été purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit « Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega) selon le protocole indiqué par le fabricant.

2 - 5 - PCR quantitative

La technique de PCR quantitative permet la quantification relative du taux d'expression d'un gène cible par rapport à celui d'un gène de référence. Cette technique utilise un reporter fluorescent qui va permettre la quantification en temps réel du produit d'amplification après chaque cycle de PCR. Pour chaque réaction, un "cycle seuil" (Ct) est déterminé qui correspond au cycle pour lequel l'intensité de fluorescence mesurée est significativement plus élevée que la fluorescence de base. Ce Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc cible présent dans l'échantillon avant l'amplification. Les amorces utilisées pour amplifier les ADNc (annexe I) ont été déterminées en utilisant le programme Primer 3 Input (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) de façon à générer des produits d'amplification d'une taille de 100 à 150 paires de base. Les produits d'amplification proposés sont contrôlés *in silico* avec le programme mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) afin de vérifier l'absence de motifs susceptibles de se replier lors de la PCR quantitative. Les réactions sont effectuées dans un volume final de 25µL. Le détail est le suivant : 12,5µL de mélange « GoTaq®qPCR Master Mix » (promega), 0,25mM de chaque amorce et 2µL d'ADNc obtenus par transcription inverse dilués au quart. Le « GoTaq®qPCR Master Mix » contient une sonde qui, lorsqu'elle est liée à l'ADN double brin, a la propriété d'émettre de la fluorescence. L'appareil utilisé est le CFX96™ Real Time System (Biorad) et les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation et activation de la TAQ polymérase à 95°C pendant 3 minutes, 40 cycles d'amplification de 15 secondes à 95°C suivies de 25 secondes à 58°C. À la fin des cycles d'amplification, une courbe de fusion est réalisée : la température du milieu réactionnel est augmentée progressivement de 68°C à 95°C par palier de 0,5°C. A chaque palier, la fluorescence est mesurée afin de vérifier notamment la présence de différents amplicons, mettant en évidence d'éventuelles contaminations. Les résultats ont été traités et normalisés selon la méthode de "geNorm" (Manualversion 1.4, 10 novembre 2003). Les résultats bruts sont les moyennes des valeurs de Ct (sampleCt) et les déviations standards des Ct (SD sampleCt). Pour chaque condition expérimentale la quantité relative de transcrits de l'échantillon (Q) est déterminée par la formule suivante : $Q = E^{(\min Ct - \text{sampleCt})}$ où E est l'efficacité d'amplification (estimée à 100%, soit E = 2) et minCt est la valeur de Ct la plus basse des échantillons comparés dans les conditions expérimentales. Ensuite la déviation standard de la quantité relative (SD Q) est calculée grâce à la formule : $SD Q = Q \times \ln E \times SD \text{ sampleCt}$. Les quantités relatives des échantillons sont ensuite normalisées (Q_{Norm}) à partir des quantités

relatives du gène constitutif, ici l'actine selon la formule : $Q_{\text{Norm}} = Q / Q_{\text{Actine}}$. Les déviations standard sont normalisées à partir des déviations standard des gènes constitutifs et selon la formule : $SD Q_{\text{Norm}} = Q_{\text{Norm}} \times \sqrt{((SD Q / Q)^2 + (SD Q_{\text{Actine}} / 2 \times Q_{\text{Actine}})^2)}$. Enfin, pour une lisibilité plus rapide des résultats, l'abondance relative des transcrits des différents échantillons est réévaluée par une simple règle de trois à la valeur du témoin rapportée à 1.

2 - 6 - Clonage moléculaire

2 - 6 - 1 - Système Gateway® (Invitrogen)

La technologie Gateway® (Invitrogen) est basée sur les propriétés de recombinaison « site spécifique » du phage lambda. Ce système permet le transfert rapide de séquence d'ADN dans de nombreux vecteurs grâce à deux réactions successives.

La première étape consiste à cloner un fragment d'intérêt, auquel les sites de recombinaison *attB* auront été ajoutés préalablement par PCR, dans un vecteur d'entrée contenant les sites *attP* (pDONR221™) (carte en annexe III). Les enzymes contenues dans le « Gateway® BP clonase™ II Enzyme Mix » (Invitrogen) utilisé pour la réaction vont permettre la recombinaison entre les sites *attB* et *attP*. Le vecteur obtenu contient alors des sites *attL*, pouvant être recombinés avec les sites *attR* de différents vecteurs de destination sous l'action des enzymes contenues dans le « Gateway® LRclonase™ II Enzyme Mix ». Les réactions BP et LR sont réalisées selon les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées pour les constructions qui ont été réalisées en utilisant la technologie Gateway sont données dans l'annexe I.

Le vecteur d'entrée pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) (carte en annexe III) a également été utilisé. Ce vecteur possède déjà les sites *attL*. Il suffit d'amplifier la séquence d'ADN à cloner avec une amorce sens commençant par CACC ce qui, sous l'action de la topoisomérase I, permettra l'assemblage de la séquence d'intérêt au niveau d'un site spécifique du vecteur et complémentaire de l'extrémité 5' du fragment PCR et l'intégration dans le vecteur d'entrée pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen). La composition du milieu réactionnel et les conditions de ligature suivent les recommandations du fournisseur.

2 - 6 - 1 - 2 - Construction des fusions *promGENE-CANDIDAT::GUS*

La méthode Gateway a été utilisée pour générer des constructions contenant les promoteurs des gènes candidats fusionnés au gène rapporteur *GUS*. Les promoteurs des gènes candidats ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique. Les amorces utilisées sont données en annexe I. Le vecteur de destination est le vecteur pKGWFS7 (carte en annexe III). Il contient un gène codant pour la β -glucuronidase situé en aval de la cassette de recombinaison permettant le clonage du promoteur du gène candidat.

2 - 6 - 1 - 3 - Construction des fusions YFP en N-terminal

Les parties codantes des trois gènes *ABCG* candidats ont été amplifiées à partir d'ADN génomique car ces séquences ne présentent aucun intron. Les amorces utilisées sont listées en annexe I. Les séquences ont été clonées dans le vecteur de destination pH7WGY2 (carte en annexe III) grâce au système Gateway. Ce vecteur permet l'expression avec le TAG YFP en N-terminal du gène cloné.

2 - 6 - 1 - 4 - Constructions BiFC

Les études de BiFC permettent la visualisation directe de l'interaction de protéines dans des cellules vivantes. Un fluorochrome est séparé en deux fragments, ce qui conduit à perdre toute émission de fluorescence. Chaque fragment est couplé à une des protéines à tester et s'il y a interaction entre les deux partenaires protéiques et que cette interaction est compatible avec une reconstitution du fluorochrome, l'émission de la fluorescence peut être à nouveau observée. Les parties codantes des gènes *ABGC6*, *ABCG10* et *ABCG20* ont été clonées dans les vecteurs de destination pBiFP2 et pBiFP3 suivant la méthode de clonage Gateway®. Les vecteurs pBiFP2 et pBiFP3 permettent respectivement la fusion de la partie N-ter et C-ter de la YFP en N-ter des séquences des gènes.

2 - 6 - 2 - Gibson Assembly®

Le Gibson Assembly® permet de lier plusieurs fragments d'ADN aux extrémités chevauchantes en une unique réaction grâce à trois activités enzymatiques (Figure 1). Une 5'-

exonucléase va créer des extrémités cohésives en 3', ce qui permet l'hybridation de fragments ayant des séquences complémentaires à une des extrémités. Une polymérase va ensuite combler les interstices entre les fragments hybridés. Enfin, une ligase va souder les cassures d'ADN.

Le NEBuilder® AssemblyTool permet de designer les amorces à utiliser pour générer des fragments avec des séquences chevauchantes qui pourront être assemblés avec le Gibson Assembly.

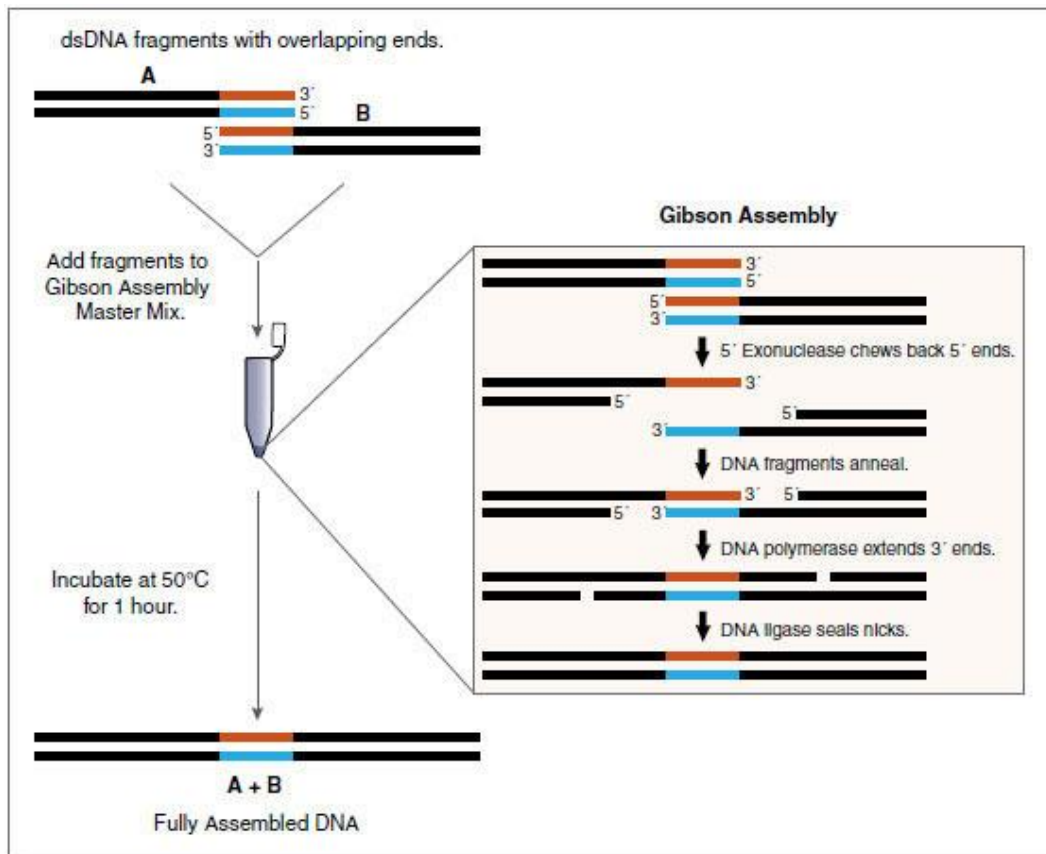


Figure 1 : Schéma de la méthode Gibson Assembly

II - 6 - 2 - 1 - Constructions des fusions YFP avec le Gibson Assembly®

La technique du Gibson Assembly® a été utilisée pour intégrer la séquence codant pour la YFP après la séquence « peptide signal » et avant la séquence « domaine LTP » des quatre LTPGs candidates. Les trois fragments à assembler ont été amplifiés par PCR avec les amorces proposées par le NEBuilder® AssemblyTool. Ces amorces sont données dans le tableau de l'annexe I. Pour les fragments des LTPs, l'amplification a été réalisée sur des

ADNc. Pour le fragment correspondant à la séquence codant pour la YFP, l'amplification a été faite à partir du vecteur pH7WGY2.

Le produit assemblé a été amplifié par PCR avec l'amorce sens utilisée pour amplifier la partie des LTPs placée en N-terminale de la YFP et avec l'amorce antisens utilisée pour amplifier la partie des LTPs placée en C-terminale de la YFP. Ces amorces contenant des sites *attB*, le fragment final a été cloné dans le pDONR221 puis recombiné dans le vecteur de destination pK2GW7 (carte en annexe III) permettant la surexpression dans les plantes.

2 - 6 - 3 - Construction des amiRNAs

Les amorces spécifiques pour la réalisation de amiRNA ciblant les transcrits des gènes *LTPG16*, *LTPG20* et *LTPG30* ont été définies grâce au logiciel WMD2 (WebMicroRNA Designer; <http://wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl>) et sont listées dans l'annexe I. Les séquences artificielles générées sont spécifiques de leurs cibles et incluent des particularités de séquences rencontrées dans les miRNAs endogènes (présence systématique de mismatch en 3' du amiRNA dans une limite de 4 et jamais plus de 2 de rang par exemple) qui permettraient une meilleure accumulation du amiRNA dans le cytoplasme de la cellule. Le miRNA artificiel a été construit en substituant la séquence de reconnaissance d'un miRNA endogène d'Arabidopsis (MIR319a, miR sur la Figure 2) par la séquence dirigée contre la ou les cibles. Cette substitution se fait par une succession de PCR, dont 2 étapes de PCR chevauchantes (c et f, Figure 2). Le plasmide pRS300, contenant MIR319a cloné dans le vecteur pBSK, a été utilisé comme matrice pour la première série de PCR (carte en annexe III). Les amorces A et B s'hybrident sur la séquence du plasmide matrice et permettent de générer des produits PCR plus longs. La séquence de l'amorce A préconisée par WMD2 est rallongée par la séquence CACC en 5' lors de la dernière PCR afin de permettre le clonage dans le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO.

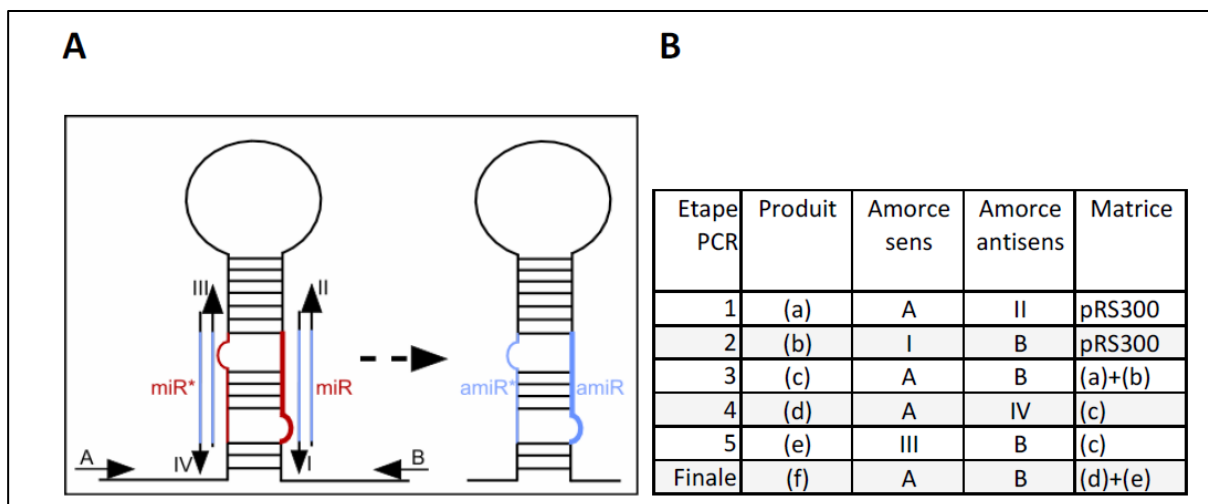


Figure 2 : Représentation schématique des étapes de construction des amiRNAs. (A) Schéma du principe de substitution de la séquence de reconnaissance du miRNA endogène (miR) par le amiRNA artificiel (amiR). (B) Tableau récapitulatif des étapes PCR nécessaires à la construction des amiRNAs.

3 - Méthodes de transgénèse

3 - 1 - Transformation des bactéries par électroporation

Pour la préparation des bactéries électrocompétentes, le protocole se trouve en annexe II.

Pour *A. tumefaciens*, 2mL de culture de bactéries dans du LB contenant de la gentamycine sont utilisés. Après 16h à 30°C sous agitation, la culture est centrifugée à 17 000 g pendant 1 minute puis le culot est repris dans 1mL d'eau stérile. Trois nouvelles étapes de centrifugations sont réalisées et le culot est repris successivement dans un volume d'eau stérile décroissant : 500µL, 250µL puis 200µL.

Cinquante µL de cellules électrocompétentes mélangées avec 1µL de plasmide sont déposés dans les cuves d'électroporation (électrodes distantes d'1mm). Les cuves sont placées dans l'électroporateur MicroPulseur™ (Biorad) où un courant électrique de 1,8 kilovolts pendant 4,5 millisecondes est appliqué. Les cellules sont ensuite mises dans 1mL de milieu LB et incubées pendant 1h à 37°C pour *E. coli* et 2h à 30°C pour *A. tumefaciens*. Les bactéries sont centrifugées pendant 5 minutes à 5000g, puis le culot est étalé sur des boîtes de

Pétri contenant du milieu LB avec l'antibiotique de sélection approprié. Les boîtes sont ensuite placées à 37°C pendant la nuit pour les *E. coli* et à 30°C pendant 48h pour les *A. tumefaciens*.

3 - 2 - Transformation d'*Arabidopsis thaliana*

3 - 2 - 1 - Transformation stable par *Agrobacterium tumefaciens* avec la méthode du « floral dipping »

Les transformations stables d'*Arabidopsis thaliana* sont réalisées par « Floral dipping » selon la méthode de Clough and Bent (1998). Une pré-culture de 10mL (LB-antibiotique) d'*A. tumefaciens* contenant la construction d'intérêt est réalisée sur la nuit à 30°C sous agitation (180 rpm). Le lendemain matin, 40mL de solution d'infiltration (Saccharose 10% (p/v), Silwett L77 0.05% (v/v)) sont ajoutés à la culture des agrobactéries. Les hampes florales sont trempées dans la solution d'infiltration 30 secondes. Un sachet plastique est placé au-dessus des pots afin de garder un taux d'humidité élevé autour des fleurs pendant 24h. Les plantes sont cultivées jusqu'à obtention de graines. Les vecteurs utilisés pour la transformation conférant la résistance au BASTA, les graines récoltées issues des plantes transformées sont semées en terre et aspergées d'une solution de BASTA (150mg/L) 3 fois par semaines pendant 3 semaines après apparition des deux premières feuilles.

3 - 2 - 2 - Transformation pour l'expression transitoire chez *Arabidopsis thaliana*

La transformation des cotylédons d'*Arabidopsis thaliana* se fait sur des plantules de 4 jours. Le protocole est celui de Marion et collaborateurs (2008) sauf quelques modifications. Les plantules d'écotype Col-0 sont cultivées dans des plaques 6 puits avec une grille (toile nylon avec une maille de 500µm de chez « Fisher scientific ») sur un milieu MS (cf. milieu et condition de culture). Une culture de 20mL (LB-antibiotique) d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur d'expression est mise à incuber pendant 30 heures à 30°C sous agitation (200 rpm) puis les cellules sont centrifugées à 3700 g pendant 15 minutes à température ambiante et re-suspendues dans 2 mL de solution d'infiltration (MS 2.15g/L ; glucose 20g/L ; MES 3.91g/L ; pH5.7 ; Acétosyringone 200µM). La culture est diluée de manière à obtenir la DO600nm désirée (0.3 à 0.5). Les plantes de 4 jours sont recouvertes par la solution d'*A. tumefaciens* et

le vide est appliqué deux fois pendant 1 minute. La solution est ensuite aspirée et les plantes sont mises à pousser dans la chambre de culture pendant 48h avant d'être observées.

4 - Test de perméabilité du manteau des graines

Des tests de perméabilité au tétrazolium sont utilisés pour évaluer la perméabilité du manteau des graines. Cinquante mg de graines sèches d'Arabidopsis sont incubés à 30°C à l'obscurité dans une solution aqueuse de tétrazolium (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 1% (p/v). Si les sels de tétrazolium pénètrent dans la graine, ils sont réduits par l'embryon en un précipité rouge appelé formazan. Les graines ont été observées avec un microscope LEICA MZ 16F équipé d'une caméra Moticam 10.

5 - Marquage histochimique GUS (β -glucuronidase)

5 - 1 - Coloration des tissus

Les tissus fraîchement récoltés sont incubés 20 minutes à 4°C dans l'acétone 90% (v/v) afin de perméabiliser les parois. Les tissus sont ensuite rincés par trois lavages successifs avec du tampon phosphate 100 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 170mM ; NaH_2PO_4 30 mM ; pH 7). Un mL de tampon de réaction (phosphate 100 mM ; X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) 1 mM ; potassium ferricyanide 0,5 mM ; potassium ferrocyanide 0,5 mM ; Triton X-100 0,5 % (v/v)) sont ajoutés et la réaction est effectuée à 37°C pendant la durée nécessaire à la coloration des tissus. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution d'éthanol à 70%. Les tissus sont conservés à 4°C avant observation.

5 - 2 - Observation des tissus

Les observations des tissus et les acquisitions d'images ont été faites avec un microscope LEICA MZ 16F et un microscope MOTIC BA 300 équipés d'une caméra Moticam 10.

6 - Microscopie confocale

Les observations de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal droit (LeicaTCSSp2, DMRXA2). La face inférieure des cotylédons des plantes transformées a été observée avec un objectif 63X à huile. Pour la YFP, l'excitation est réalisée avec le laser ion argon à 514 nm. Pour la RFP le laser He/Ne 543 est utilisé pour une excitation à 543 nm. Les fenêtres d'observation sont 580-610 nm pour la YFP et 630-680 nm pour la RFP. Les acquisitions pour le co-marquage YFP RFP ont été réalisées en mode séquentiel.

7 - Analyses de la composition du polymère de subérine

Extractions des lipides

Pour l'analyse de la fraction polymérique, des racines de plantes ayant poussé quatre semaines sur milieu MS ont été récoltées. Les racines sont immergées dans 4mL d'isopropanol pendant 1h à 85°C. Après avoir été refroidis, les échantillons sont délipidés par extraction des lipides solubles grâce à des bains successifs de solvants à polarité croissante d'une durée de 24h chacun et réalisés à température ambiante. Les bains utilisés sont dans l'ordre : 4mL de chloroforme:méthanol (2:1, v/v), 4mL de chloroforme:méthanol (1:1, v/v), 4mL de chloroforme:méthanol (1:2, v/v), 4mL de méthanol 100%. Les racines délipidées sont ensuite séchées à température ambiante sous une hotte aspirante pendant 24h puis dans un dessiccator pendant 3 jours.

Pour l'analyse de la fraction polymérique des graines, 50 mg de graines sont broyées dans l'isopropanol avec un mortier et un pilon. Les graines broyées sont ensuite transférées dans des tubes en verre et de l'isopropanol est ajouté pour atteindre un volume final de 4mL. Les tubes sont incubés pendant une heure à 85°C. Après avoir été refroidis, les échantillons sont délipidés par extraction des lipides solubles grâce à des bains successifs de solvants à polarité croissante d'une durée de 24h chacun et réalisés à température ambiante. Les bains utilisés sont dans l'ordre : 4mL de chloroforme:méthanol (2:1, v/v), 4mL de chloroforme:méthanol (1:1, v/v), 4mL de chloroforme:méthanol (1:2, v/v), 4mL de méthanol 100%. Ces étapes sont suivies par une série de lavages avec de l'eau (1h), du NaCl 2M (1h),

de l'eau (1h) et du méthanol 100% (1h). La délipidation des graines est poursuivie avec 4mL de chloroforme:méthanol (1:2, v/v), 4mL de chloroforme:méthanol (2:1, v/v) et 4mL de méthanol 100%, chacune des étapes ayant une durée de 24h. Les échantillons sont ensuite séchés à température ambiante sous une hotte aspirante pendant un jour puis dans un dessiccateur pendant 3 jours.

Analyse des lipides

Les résidus secs délipidés (graines et racines) sont pesés et placés dans des tubes en verre. Les échantillons sont dépolymérisés par transméthylation à 85°C pendant 3h en utilisant 1mL de méthanol acide sulfurique 5% (v/v). Cinq µg d'acide heptadécanoïque (C17), de pentadécanol (C15:0-OH) et d'acide pentadécanoïque ω-hydroxylés (C15:0-ω-OH) sont ajoutés comme standards internes (5µg/mL). Après refroidissement des échantillons, 1mL de NaCl (2,5%, p/v) et 2mL de méthyl tert-butyl éther (MTBE) sont ajoutés puis les tubes sont agités vigoureusement pendant 30 secondes. Les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 800g pour séparer les phases. La phase supérieure avec le MTBE est transférée dans un tube en verre et lavée avec 2mL d'une solution de Tris-NaCl (Tris base 100mM pH 8.0 dans NaCl 0,09% (p/v)). Les tubes sont agités vigoureusement pendant 30 secondes et centrifugés 5 minutes à 800g pour séparer les phases. La phase supérieure est prélevée délicatement puis placée dans un nouveau tube en verre et évaporée sous air. Les échantillons sont dérivatisés avec 150µL de BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoroacetamide:triméthylchlorosilane (99 :1, Sigma®)) pendant 30 minutes à 110°C. Cette étape, appelée aussi silylation, permet d'ajouter des groupements triméthylsilylés sur les groupes hydroxylés libres afin d'améliorer la séparation et la détection des composés. L'excès de BSTFA est ensuite évaporé et les lipides sont resolubilisés dans 150µL d'heptane:toluène (1:1, v/v) pour être analysés par un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6850 équipé d'une colonne apolaire HP-5MS (30 m × 0,32 mm × 0,25µm) connecté un détecteur de spectrométrie de masse Agilent 5975. Lors de la chromatographie en phase gazeuse, les molécules sont séparées selon leur taille et leur polarité. L'extrait lipidique (1µL) est injecté dans la colonne qui constitue la phase stationnaire sur laquelle les molécules vont se fixer. Les molécules sont portées à travers la colonne grâce à un gaz vecteur, l'hélium, qui constitue la phase mobile (1,5mL/min). Par élévation progressive de la température de la colonne, les molécules vont peu à peu se décrocher et être emportées par le gaz porteur vers le détecteur. Les molécules vont avoir un temps de rétention différents en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. Les cycles

de température comportent 1 minute à 50°C, une augmentation jusqu'à 200°C à 50°C/min, 1 minute à 200°C, une augmentation jusqu'à 320°C à 10°C/min puis 8 minutes à 320°C. Les molécules décrochées vont ensuite être fragmentées en ions de tailles différentes grâce à une cellule de collision. A chaque pic de chromatographie, qui correspond à un contenu total en ions, sera associé un spectre de masse caractéristique de la molécule, permettant ainsi de l'identifier. La quantification des échantillons est basée sur les aires des pics et celles des standards internes, dont les concentrations dans l'échantillon sont connues.

8 - Etudes Bioinformatiques

Liste des logiciels utilisés :

Amorces pour le criblage des lignées homozygote pour l'insertion T-DNA :
T-DNA Primer Design du SALK (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

Analyses de co-expression :

ATTED-II version 7.0 (<http://atted.jp/>)

Expression Angler (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi)

Domaines d'expression :

eFPBrowser (<http://bar.utoronto.ca/>)

AtGenexpress (<http://jsp.weigelworld.org/>)

Genevestigator (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>)

Alignement des séquences protéiques :

Geneious6.1.2 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012)

Recherche de domaines spécifiques à une famille protéique :

BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Prédiction d'hélices transmembranaires :

TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

Recherche de séquences “peptide signal” d’adressage au RE :

http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.htm

Recherche de séquence signal pour les ancrés GPI :

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

Amorces pour la PCR quantitative :

(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

Vérification des amorces pour la PCR quantitative :

(<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>)

Amorces pour la construction des amiRNAs :

WMD2 ([WebMicroRNA Designer; http://wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl](http://wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl))

Annexe I : Listes des amorces utilisées pour les différentes PCRs

Amorces utilisées pour le criblage des lignées d'insertion			
Gène	Lignées	Orientation	Séquences
<i>ABCG6</i> At5g13580	FLAG_445F05	sens	GGGAAGTGGTGAATCCTTTGGATC
		antisens	CACATAAGCTGAGATCGCTTTCTGC
	FLAG_108H08	sens	CATCTCCGATCACCGTATTTCGCC
		antisens	AAGGTGGGTGGGGGAATGGTGG
	GK-891H019	sens	GGAGTCCAAGAACGTCTTGGATGC
		antisens	CAAATAAATAGCAAGTAGTTGGGCTCC
	WiscDsLox461-464D3	sens	CCGAGATCGAATCCCTGGCTAC
		antisens	GCAAACCTGGAAACGGCCAAAGGTAC
<i>ABCG10</i> At1g53270	GK-331E02	sens	GCTTGTAAGGCTCTGGTTGTG
		antisens	AGATGGAATTGCCGGTAAAAG
	SALK_128668	sens	CACAACTTGAAGAGCGGACGC
		antisens	ACGGTCAATTTTTTCAGCTCACCCG
<i>ABCG20</i> At3g53510	SALK_086914	sens	GTTGGAAATCCAATTAACCCCTAGTC
		antisens	GGCTCTCTTTTGAAATCCGATTGGC
	SALK_081053	sens	GCTCACGGATAAGATCGAGTGC
		antisens	CCTGAGGCCAAAACATTAACCAGAC
	Sail_71_G09	sens	GGAGGAGAAAAGGAGAAGGGTC
		antisens	GGAGGAAATAAGCGAGGATTGCTAC
<i>LTPG30</i> At5g13900	FLAG_521E04	sens	GGCCTTGACATCAAAAGCCC
		antisens	GGATTTTCCCGGTAGTTGGTAATTC
	GK-636E02	sens	AGTGGCTGCAATAGCTAATGTTGTC
		antisens	GGGTTTATCTATGTTTCGCCGTCCT
<i>LTPG15 /LTPG16</i> At2g48130/At2g48140	SALK_110442	sens	GAAGTGCAGACCACCAATACAGC
		antisens	GCTTAATCTTCCGGTGACGATGCT
	SALK_125619	sens	TCCAACCTCCTGTGTACCGATGTGC
		antisens	TGCTTATCTGCTGACCTTGCCCT
<i>LTPG20</i> At3g22620	WiscDsLox374E22	sens	GTCATCTGGTTGCCGTGTTTTGAA
		antisens	GATTGTTTACCAGGAGCAGCAGCT
	SAIL_666_H05.v1	sens	ACAAAGACATCCCATTCCCTCCGGT
		antisens	TTTGTGACGGTCTAGGCTTTGGTTG
ADN-T	FLAG-LB		CGGCTATTGGTAATAGGACACTGG
	GK-LB		ATATTGACCATCATACTCATTGC
	WiscDsLox-LB		AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
	SALK-LB		TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
	SAIL-LB		TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC

Amorces utilisées pour la PCR-Q		
Gène	Orientation	Séquences
<i>ACTINE</i> At1g49240	sens	CCGAGCAGCATGAAGATTAAG
	antisens	CATACTCTGCCTTAGAGATCCACA
<i>ABCG2</i> At2g37360	sens	caactgtttaaTCACTTCCGTTTG
	antisens	TGTTTGTGGATTACTGTTGCTTG
<i>ABCG6</i> At5g13580	sens	GGGGCTTCTTCTTTCGAATC
	antisens	caaaccagtcctccataagatca
<i>ABCG10</i> At1g53270	sens	CAGATGTTACAGAACAAGAAGCTAGg
	antisens	gaaagtgctgaacaaaaagaaga
<i>ABCG11</i> At1g17840	sens	TAGCACGCAGAAGGATGAAG
	antisens	CCATCTGTTTCGTGTAGCAATG
<i>ABCG20</i> At3g53510	sens	AATGGAATTGCTTGTGGATCA
	antisens	agcaaagcaaagcaaagctg
<i>LTPG30</i> At5g13900	sens	agcaaagcaaagcaaagctg
	antisens	AGTTCCTCCATTGGCAACAC
<i>LTPG15</i> At2g48130	sens	ttgcttttgaaatgtggagttg
	antisens	ttcacttgctgtgccagatt
<i>LTPG16</i> At2g48140	sens	TCCCGTTGCTTTTCATATCTCT
	antisens	aatgaaaatatctgacaacacatgc
<i>LTPG20</i> At3g22620	sens	TCGCCCTCGTAGCTCTCA
	antisens	atggtttctttctataatcaacgatgc
<i>MYB41</i> At4g28110	sens	CTTAGACTCGCTCATGTCAACG
	antisens	CTTCCGGAATTCCAAAAGTCG
<i>FACT</i> At5g63560	sens	ATGTGCTGCTTGGACTTCCT
	antisens	GCTCCACCGACGAACAATA
<i>FAR1</i> At5g22500	sens	ACAGCTCATTCGGGAGACAC
	antisens	GTAACGAGCCGTGAAATCGT
<i>FAR4</i> At4g44540	sens	TGCGGTTGAAAAGAAAGGAG
	antisens	CGGGAATATGAATGGTCGTC
<i>FAR5</i> At4g44550	sens	CATGGCTTTGTTTCAGCCTCT
	antisens	AAAGCTTTTACGGAATCACAAGA
<i>GPAT5</i> At3g11430	sens	CACTTTCGAGCCTTGTCTCC
	antisens	AAACTGCAAACAGGTTTAATTTGA
<i>RALPH</i> At5g23190	sens	ACTATGCCAAGTCTTTTGATGAGG
	antisens	GCACACAATCTTCTTAGACCATTAAC
<i>HORST</i> At5g58860	sens	AGGTGCTTGCATGATTCACA
	antisens	TTTTGTAGGTGGAGAAAACATAGAA
<i>ASFT</i> At5g41040	sens	TCTTGACTTCCCGCTACAG
	antisens	GAGTAAAACGAATAGGTTTTGACAAT

Amorces utilisées pour le clonage des promoteurs des gènes candidats

Gènes	Orientation	Séquences
<i>ABCG6</i>	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAaAAAGCaGGCTctggtcagtttgtcacatatcggttggat
At5g13580	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCTTTGGGTTTGTTCGATTTGTAAGC
<i>ABCG10</i>	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAaAAAGCaGGCTTGCAGAAACCTGCTAATACACATGTTTAGG
At1g532870	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTctaagaagaagaaggaaaaaagaagcatcaaac
<i>ABCG20</i>	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAaAAAGCaGGCTCGTTCCTCCGATTAAGCTCGTCG
At3g53510	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAATTATTGTCTGGTTAATGTTTTGGC
<i>LTPG30</i>	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAaAAAGCaGGCTtttctttctcatcgtccatatttaataccttcc
At5g13900	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCACCTTAGTTACTATTTTGTAGTGTACTAA
<i>LTPG15</i>	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAaAAAGCaGGCTTTTAAATTGGCCTGCTTAATCTCCGGTGA
At2g48130	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAATTTGAGTTATTATTGTTCAACTTTGGTGTTTTT
<i>LTPG20</i>	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAaAAAGCaGGCTggatattgtggagtccttttgatggtataa
At3g22620	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTtgttggatagattaagcctttgattgttt

Amorces utilisées pour les fusions *YFP::ABCG* et les constructions *BIFC*

Gènes	Orientation	Séquences
<i>ABCG6</i> At5g13580	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAATGTCTCGTGTGGTCGCA
	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTACCTCCTCTTGTTCCTGCTACCC
<i>ABCG10</i> At1g532870	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAATGGAATTGCCGGTAAAAGCTCC
	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAGCTTCTTGTCTGTAAACATCTGTACC
<i>ABCG20</i> At3g53510	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAATGTCTGGTTTGTTCGGTATATTATCTCCG
	antisens	GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGCGACGCTTGTTCCTGCTTCCG

Amorces utilisées pour les fusions *YFP::LTPG*

Gènes	Nom de l'amorce	Orientation	Séquences
<i>LTPG30</i> At5g13900	ltpg30-f	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGATGATGGGGATGAAGTTTTTCTCT
	ltpg30-eyfp-r	antisens	ttgctcacCGAAACGCTCTGCCCAT
	ltpg30-eyfp-f	sens	gcggttcgGTGAGCAAGGGCGAGGAG
	eyfp-ltpg30-r	antisens	gtttagacaCGTTTCTCGTTCAGCTTTTTTGTAC
	eyfp-ltpg30-f	sens	gagaaacgTGTCTAAACCAACTTGCTC
	ltpg30-r	antisens	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAGTAATTATGTGATGGCAATATGA
<i>LTPG15</i> At2g48130	ltpg15-f	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGGGTATAGAAGAAGCTACGCAAT
	ltpg15-eyfp-r	antisens	ttgctcacTGAAGTCTCGGCTGTGC
	ltpg15-eyfp-f	sens	gcagttcaGTGAGCAAGGGCGAGGAG
	eyfp-ltpg15-r	antisens	ctcacgcaCGTTTCTCGTTCAGCTTTTTTGTAC
	eyfp-ltpg15-f	sens	gagaaacgTGCCTGAGCACACTGACC
	ltpg15-r	antisens	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAAGAAAAGAAGAAGTGCAGACCACC
<i>LTPG16</i> At2g48140	ltpg16-f	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAAGGCTTAACATTG
	ltpg16-eyfp-r	antisens	ttgctcacTGGCGTCTTATCTGCTG
	ltpg16-eyfp-f	sens	gcacgcccaGTGAGCAAGGGCGAGGAG
	eyfp-ltpg16-r	antisens	gaggtgcaCGTTTCTCGTTCAGCTTTTTTGTAC
	eyfp-ltpg16-f	sens	gagaaacgTGCACCTCCTCCATGATC
	ltpg16-r	antisens	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATAAGTTCAACAGGATAAGAGA
<i>LTPG20</i> At3g22620	ltpg20-f	sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTGCGAAGATTATTTCCCTTGTGGTG
	ltpg20-eyfp-r	antisens	ttgctcacTTGGCTTAGAGGTTGTTG
	ltpg20-eyfp-f	sens	ctaagccaaGTGAGCAAGGGCGAGGAG
	eyfp-ltpg20-r	antisens	ggagtacaCGTTTCTCGTTCAGCTTTTTTGTAC
	eyfp-ltpg20-f	sens	gagaaacgTGTACTCCATCAATGATGAC
	ltpg20-r	antisens	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAGTAGAATTTGAGAGCTACGAGGG

Amorces utilisées pour la création des amiRNAs

Gènes	Nom de l'amorce	Séquences
	A	CACCCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
	B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
<i>LTPG30</i> At5g13900	amirna-ltpg30I	gaTTTACTAATCATACGGCGCAAtctctcttttgtattcc
	amirna-ltpg30II	gaTTGCGCCGTATGATTAGTAAAtcaaagagaatcaatga
	amirna-ltpg30III	gaTTACGCCGTATGAATAGTAATtcacaggtcgtgatatg
	amirna-ltpg30IV	gaATTACTATTCATACGGCGTAAAtctacatatatattcct
<i>LTPG15</i> At2g48130	amirna-ltpg15I	gaTTACGCTCCATAGTGCCGCGAtctctcttttgtattcc
	amirna-ltpg15II	gaTCGCGGCACTATGGAGCGTAAtcaaagagaatcaatga
	amirna-ltpg15III	gaTCACGGCACTATGCAGCGTATtcacaggtcgtgatatg
	amirna-ltpg15IV	gaATACGCTGCATAGTGCCGTGAtctacatatatattcct
<i>LTPG20</i> At3g22620	amirna-ltpg20I	gaTAATCGGCAAAGCTAGCGCTGtctctcttttgtattcc
	amirna-ltpg20II	gaCAGCGCTAGCTTTGCCGATTAtcaaagagaatcaatga
	amirna-ltpg20III	gaCAACGCTAGCTTTCCCGATTTtcacaggtcgtgatatg
	amirna-ltpg20IV	gaAAATCGGAAAGCTAGCGTTGtctacatatatattcct

Annexe II : Protocole suivi pour la préparation des bactéries *E.coli* électrocompétentes

	Laboratoire de Biogénèse Membranaire	
	Mode Opérateur Préparation de bactéries <i>E.coli</i> électrocompétentes	Réf : MO-LBM-GEN-010 Version 01 Date de mise à jour: 17 Juin 2010 Page 1/1

Préparation de bactéries *E.coli* électrocompétentes

Travailler constamment en milieu stérile

La veille :

- Ensemencer une préculture de cellules en milieu LB (avec antibiotique ou non selon la souche)
- Stériliser 1 litre de glycérol 10% dans l'eau.
- Stériliser le matériel nécessaire (flacons, bouchons, erlen...)

Le jour de la préparation :

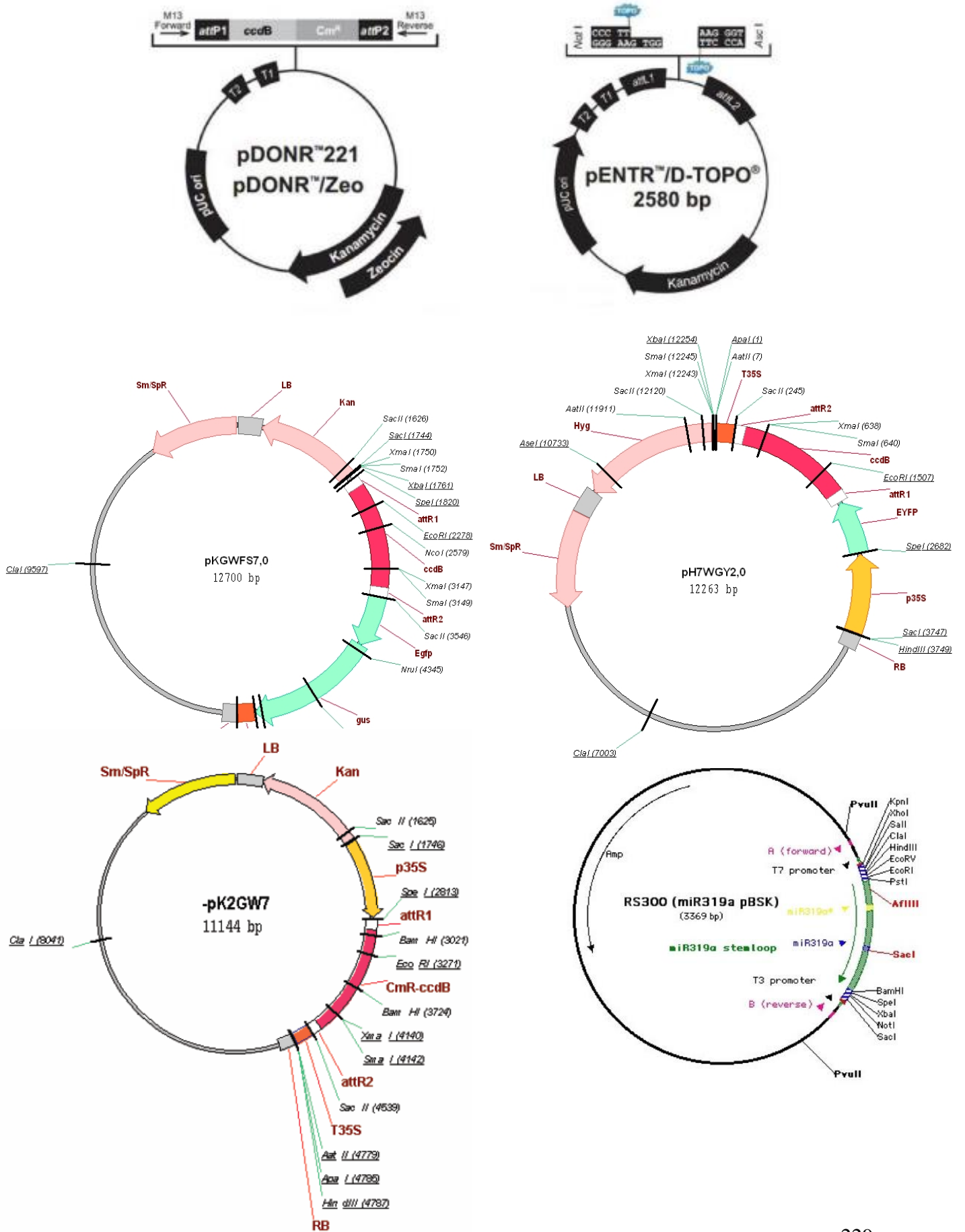
(pour 100 ml, à adapter en fonction du volume nécessaire)

- Ensemencer 100 ml de milieu LB (avec antibiotique ou non selon la souche) avec 3 ml de préculture
- Incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à atteindre 0.6 de DO à 600 nm (environ 2 à 3 heures)
- Pré-refroidir la centrifugeuse à 4 °C

A PARTIR DE MAINTENANT : TRAVAILLER IMPERATIVEMENT DANS LA GLACE

- Répartir la culture dans des tubes ou flacons (selon le volume) stériles
- Incuber 10 min dans la glace
- Centrifuger 10 min à 4500-5000 rpm 4 °C
- Eliminer le surnageant par inversion
- Reprendre les cellules dans un volume total de 60 ml de glycérol 10%
- Centrifuger 10 min à 4500-5000 rpm 4 °C
- Eliminer le surnageant par inversion
- Reprendre les cellules dans un volume total de 20 ml de glycérol 10%
- Centrifuger 10 min à 4500-5000 rpm 4 °C
- Eliminer le surnageant par inversion
- Reprendre les cellules dans un volume total de 10 ml de glycérol 10%
- Centrifuger 10 min à 4500-5000 rpm 4 °C
- Eliminer le surnageant par inversion
- Reprendre les cellules dans un volume total de 400 µl de glycérol 10%
- Aliquoter par 50 µl en tubes Eppendorf stériles refroidis dans la glace ou l'azote.
- Placer les aliquots le plus rapidement possible dans l'azote
- Congeler à - 80 °C

Annexe III : cartes des vecteurs



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agrawal, V. P., and Kolattukudy, P. E. (1977). Biochemistry of Suberization. *Plant Physiology*, 59(4), 667–672.
- Alassimone, J., Naseer, S., and Geldner, N. (2010). A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 5214–5219.
- Anselmi, C., Centini, M., Granata, P., Segal, A., Buonocore, A., Bernini, A., and Facino, R. M. (2004). Antioxidant activity of ferulic acid alkyl esters in a heterophasic system: a mechanistic insight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6425–6432.
- Baranowski, J. D., and Nagel, C. W. (1982). Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by Hydroxycinnamic Acids and Their Alkyl Esters. *Journal of Food Science*, 47(5), 1587–1589.
- Baxter, I., Hosmani, P. S., Rus, A., Lahner, B., Borevitz, J. O., Muthukumar, B., ... Salt, D. E. (2009). Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 5(5), e1000492.
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., and Ohlrogge, J. B. (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(1), 351–368.
- Benveniste, I., Saito, T., Wang, Y., Kandel, S., Huang, H., Pinot, F., ... Shimoji, M. (2006). Evolutionary relationship and substrate specificity of Arabidopsis thaliana fatty acid omega-hydroxylase. *Plant Science*, 170(2), 326–338.
- Benveniste, I., Tijet, N., Adas, F., Philipps, G., Salaün, J. P., and Durst, F. (1998). CYP86A1 from Arabidopsis thaliana encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(3), 688–693.
- Bernard, A., and Joubès, J. (2013). Arabidopsis cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 110–29.
- Bernards, M. A. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*, 80(3), 227–240.
- 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 Physiology*, 121(1), 135–146.
- Bernards, M. A., Lopez, M. L., Zajeck, 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. *Macromolecules*, 34, 1115–1122.

- Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraça, L., Efremova, N., Yephremov, A., ... 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(5), 1958–1970.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., ... Samuels, L. (2007). Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant Journal*, 52(3), 485–498.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546.
- Bonaventure, G., Beisson, F., Ohlrogge, J., and Pollard, M. (2004). Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with Arabidopsis epidermis: Occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1,18-dioate as the major component. *Plant Journal*, 40(6), 920–930.
- Boutrot, F., Chantret, N., and Gautier, M.-F. (2008). Genome-wide analysis of the rice and Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining. *BMC Genomics*, 9, 86.
- Buda, G. J., Barnes, W. J., Fich, E. A., Park, S., Yeats, T. H., Zhao, L., ... 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(10), 4000–4013.
- Buré, C., Cacas, J. L., Mongrand, S., and Schmitter, J. M. (2014). Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 995–1010.
- Cacas, J.-L. (2015). Re-Visiting Plant Plasma Membrane Lipids in Tobacco: a Focus on Sphingolipids. *Plant Physiology*. <http://doi.org/10.1104/pp.15.00564>
- Carrasco, S., and Meyer, T. (2011). STIM Proteins and the Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 973–1000.
- Chen, G., Komatsuda, T., Ma, J. F., Nawrath, C., Pourkheirandish, M., Tagiri, A., ... Nevo, E. (2011). An ATP-binding cassette subfamily G full transporter is essential for the retention of leaf water in both wild barley and rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), 12354–12359.
- Choi, H., Jin, J.-Y., Choi, S., Hwang, J.-U., Kim, Y.-Y., Suh, M. C., and Lee, Y. (2011). An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. *The Plant Journal*, 65(2), 181–193.
- Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G., and Tonelli, C. (2008). Over-expression of the Arabidopsis AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant Journal*, 53(1), 53–64.

- Compagnon, V., Diehl, P., Benveniste, I., Meyer, D., Schaller, H., Schreiber, L., ... Pinot, F. (2009). CYP86B1 Is Required for Very Long Chain ω -Hydroxyacid and α,ω -Dicarboxylic Acid Synthesis in Root and Seed Suberin Polyester. *Plant Physiology*, 150(4), 1831–1843.
- Dean, B. B., and Kolattukudy, P. E. (1976). Synthesis of Suberin during Wound-healing in Jade Leaves, Tomato Fruit, and Bean Pods. *Plant Physiology*, 58(3), 411–416.
- Dean, B.B., and Kolattukudy, P.E. 1977. Biochemistry of suberization: incorporation of [1- 14 C]oleic acid and [1- 14 C]acetate into the aliphatic components of suberin in potato tuberdisk (Solanum tuberosum). *Plant Physiology*. 59: 48–54.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., & Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122(2), 403–414.
- Debono, A., Yeats, T. H., Rose, J. K. C., Bird, D., Jetter, R., Kunst, L., and Samuels, L. (2009). Arabidopsis LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. *The Plant Cell*, 21(4), 1230–1238.
- Domergue, F., Vishwanath, S. J., Joubes, J., Ono, J., Lee, J. a, Bourdon, M., ... Rowland, O. (2010). Three Arabidopsis fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiology*, 153(4), 1539–1554.
- Edstam, M. M., Blomqvist, K., Eklöf, A., Wennergren, U., and Edqvist, J. (2013). Coexpression patterns indicate that GPI-anchored non-specific lipid transfer proteins are involved in accumulation of cuticular wax, suberin and sporopollenin. *Plant Molecular Biology*, 83(6), 625–649.
- Enstone, D. E., and Peterson, C. A. (2005). Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions, *Plant, Cell and Environment*, 28, 444–455.
- Enstone, D. E., Peterson, C. A., and Ma, F. (2002). Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 335–351.
- Espelie, K. E., and Kolattukudy, P. E. (1985). Purification and characterization of an abscisic acid-inducible anionic peroxidase associated with suberization in potato (Solanum tuberosum). *Arch Biochem Biophys*, 240(2), 539–545.
- Espelie, K. E., Sadek, N. Z., and Kolattukudy, P.E. (1980b). Composition of suberin-associated waxes from the subterranean storage organs of seven plants parsnip, carrot, rutabaga, turnip, red beet, sweet potato and potato. *Planta*, 148, 468-476.
- Franke, R. (2013). Physiological changes in suberin-modified plants. 6th European Symposium on Plants Lipids, Bordeaux, France.

- Franke, R. (2015). Characterization of peroxidase mutants provides genetic evidence for the involvement of oxidative cross-linking in seed coat and early endodermal suberization. 2nd PaDIBA, Nantes, France.
- Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C., and Schreiber, L. (2005). Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues - A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*, *66*(22), 2643–2658.
- Franke, R., Höfer, R., Briesen, I., Emsermann, M., Efremova, N., Yephremov, A., and Schreiber, L. (2009). The *DAISY* gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza-micropyle region of seeds. *The Plant Journal*, *57*(1), 80–95.
- Franke, R., and Schreiber, L. (2007). Suberin-a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(3), 252–9.
- Girard, A.-L., Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Gaillard, C., Elmorjani, K., Vivancos, J., ... Bakan, B. (2012). Tomato GDSL1 Is Required for Cutin Deposition in the Fruit Cuticle. *The Plant Cell*, *24*(7), 3119–3134.
- 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 of the United States of America*, *106*(44), 18855–18860.
- Graça, J., Cabral, V., Santos, S., Lamosa, P., Serra, O., Molinas, M., ... Franke, R. (2015). Partial depolymerization of genetically modified potato tuber periderm reveals intermolecular linkages in suberin polyester. *Phytochemistry*, *117*, 209–219.
- Graça, J., and Pereira, H. (1998). Feruloyl Esters of ω -Hydroxyacids in Cork Suberin. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, *18*(2), 207–217.
- Graça, J., and Pereira, H. (2000a). Methanolysis of bark suberins: Analysis of glycerol and acid monomers. *Phytochemical Analysis*, *11*(1), 45–51.
- Graça, J., and Pereira, H. (2000b). Suberin structure in potato periderm: Glycerol, long-chain monomers, and glyceryl and feruloyl dimers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(11), 5476–5483.
- Graça, J., and Santos, S. (2006a). Glycerol-derived ester oligomers from cork suberin. *Chemistry and Physics of Lipids*, *144*(1), 96–107.
- Graça, J., and Santos, S. (2006b). Linear aliphatic dimeric esters from cork suberin. *Biomacromolecules*, *7*(6), 2003–2010.
- Graça, J., and Santos, S. (2007). Suberin: A Biopolyester of Plants' Skin. *Macromolecular Bioscience*, *7*(2), 128–135.
- Hattersley, P. W., Beowning A. J. (1981). Occurrence of the suberized lamella in leaves of grasses of different photosynthetic types. I. In parenchymatous bundle sheaths and PCR ("Kranz") Sheaths. *Protoplasma*, *109*, 371-401.

- Ho, W. J., Ki, D. K., and Byung, K. H. (2005). Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (CALTPI) and the enhanced resistance of the CALTPI transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. *Planta*, 221(3), 361–373.
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L., and Franke, R. (2008). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(9), 2347–2360.
- Hose, E., Clarkson, D. T., Steudle, E., Schreiber, L., and Hartung, W. (2001). The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2245–2264.
- Joubès, J., Raffaele, S., Bourdenx, B., Garcia, C., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., ... Lessire, R. (2008). The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Molecular Biology*, 67(5), 547–566.
- Jun, J. H., Song, Z., Liu, Z., Nikolau, B. J., Yeung, E. S., and Lee, Y. J. (2010). High-spatial and high-mass resolution imaging of surface metabolites of *Arabidopsis thaliana* by laser desorption-ionization mass spectrometry using colloidal silver. *Analytical Chemistry*, 82(8), 3255–65.
- Jung, H. W., Kim, K. D., Hwang, B.K. (2005). Identification of pathogen responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (CALTPI) and the enhanced resistance of the CALTPI transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. *Planta*, 221, 361–373.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., and Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book*, 9(9), e0153.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12), 1647–1649.
- Kim, H., Lee, S. B., Kim, H. J., Min, M. K., Hwang, I., and Suh, M. C. (2012). Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 (LTPG2) and overlapping function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in cuticular wax export or accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 53(8), 1391–1403.
- Kolattukudy, P. E. (2001). Polyesters in higher plants. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 71, 1–49. http://doi.org/10.1007/3-540-40021-4_1
- Kolattukudy, P. E., and Agrawal, V. P. (1974). Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin). *Lipids*, 9(9), 682–691. 6
- Kolattukudy, P. E., Kronman, K., and Poulou, a J. (1975). Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and

- sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiology*, 55(3), 567–573.
- Kosma, D.K., Molina, I., Ohlrogge, J.B., Pollard, M. (2012). Identification of an Arabidopsis fatty alcohol:caffeoyle-Coenzyme A acyltransferase required for the synthesis of alkyl hydroxycinnamates in rootwaxes. *Plant Physiology*, 160, 237–248
- Kosma, D. K., Murmu, J., Razeq, F. M., Santos, P., Bourgault, R., Molina, I., and Rowland, O. (2014). AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types. *The Plant Journal*, 80(2), 216–229.
- Kosma, D. K., Rice, A., and Pollard, M. (2015). Analysis of aliphatic waxes associated with root periderm or exodermis from eleven plant species. *Phytochemistry*, 117, 351–362.
- Krishnamurthy, P., Jyothi-Prakash, P. A., Qin, L., He, J., Lin, Q., Loh, C.-S., and Kumar, P. P. (2014). Role of root hydrophobic barriers in salt exclusion of a mangrove plant *Avicennia officinalis*. *Plant, Cell and Environment*, 37(7), 1656–1671.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Trenkamp, S., Bär, S., Franke, R., Efremova, N., ... Yephremov, A. (2006). Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain α - ω -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta*, 224(2), 315–329.
- Kuromori, T., Ito, T., Sugimoto, E., and Shinozaki, K. (2011). Arabidopsis mutant of AtABCG26, an ABC transporter gene, is defective in pollen maturation. *Journal of Plant Physiology*, 168(16), 2001–2005.
- Landgraf, R., Smolka, U., Altmann, S., Eschen-Lippold, L., Senning, M., Sonnewald, S., ... Rosahl, S. (2014). The ABC Transporter ABCG1 Is Required for Suberin Formation in Potato Tuber Periderm. *The Plant Cell*, 26(8), 3403–3415.
- Larsson, K. E., Kjellberg, J. M., Tjellström, H., and Sandelius, A. S. (2007). LysoPC acyltransferase/PC transacylase activities in plant plasma membrane and plasma membrane-associated endoplasmic reticulum. *BMC Plant Biology*, 7, 64.
- Lee, S. B., Go, Y. S., Bae, H.-J., Park, J. H., Cho, S. H., Cho, H. J., ... Suh, M. C. (2009). Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, 150(1), 42–54.
- Lee, S.-B., Jung, S.-J., Go, Y.-S., Kim, H.-U., Kim, J.-K., Cho, H.-J., ... Suh, M.-C. (2009). Two Arabidopsis 3-ketoacyl CoA synthase genes, *KCS20* and *KCS2 / DAISY*, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *The Plant Journal*, 60(3), 462–475.
- Le Hir, R., Sorin, C., Chakraborti, D., Moritz, T., Schaller, H., Tellier, F., ... Bellini, C. (2013). ABCG9, ABCG11 and ABCG14 ABC transporters are required for vascular development in Arabidopsis. *Plant Journal*, 76(5), 811–824.

- Li, Y., Beisson, F., Koo, A. J. K., Molina, I., Pollard, M., and Ohlrogge, J. (2007b). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), 18339–18344.
- Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J., and Pollard, M. (2007a). Monoacylglycerols Are Components of Root Waxes and Can Be Produced in the Aerial Cuticle by Ectopic Expression of a Suberin-Associated Acyltransferase. *Plant Physiology*, 144(3), 1267–1277.
- Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J., and Beisson, F. (2009). Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 22008–22013.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., ... Ohlrogge, J. (2010). Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8, e0133.
- Liu, F., Zhang, X., Lu, C., Zeng, X., Li, Y., Fu, D., and Wu, G. (2015). Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5663–5681.
- Lotfy, S., Javelle, F., and Negrel, J. (1996). Purification and characterization of hydroxycinnamoyl-coenzyme A: omega-Hydroxypalmitic acid O-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco (*Nicotiana tabacum* L) cell-suspension cultures. *Planta*, 199(3), 475–480.
- Lotfy, S., Negrel J., Javelle F. (1994). Formation of omega-feruloyloxypalmitic acid by an enzyme from wound-healing potato-tuber disks. *Phytochemistry*, 35, 1419–1424
- Lü, S., Song, T., Kosma, D. K., Parsons, E. P., Rowland, O., and Jenks, M. A. (2009). Arabidopsis CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant Journal*, 59(4), 553–564.
- Lulai, E., and Corsini, D. (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.
- Luo, B., Xue, X. Y., Hu, W. L., Wang, L. J., and Chen, X. Y. (2007). An ABC transporter gene of Arabidopsis thaliana, AtWBC11, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion. *Plant and Cell Physiology*, 48(12), 1790–1802.
- Ma, F., and Peterson, C. A. (2003). Erratum: Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany*, 81(9), 991.

- Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L., and Faure, J.-D. (2008). Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal*, 56(1), 169–179.
- Masao, H., Kumi, M., Sumitra, H. (1987). Effect of long chain fatty acids and fatty alcohols on streptococcus mutans. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 3507–3510
- McFarlane, H. E., Watanabe, Y., Yang, W., Huang, Y., Ohlrogge, J., and Samuels, A. L. (2014). Golgi- and Trans-Golgi Network-Mediated Vesicle Trafficking Is Required for Wax Secretion from Epidermal Cells. *Plant Physiology*, 164(3), 1250–1260.
- Menezes, J. C., Kamat, S. P., Cavaleiro, J. a, Gaspar, a, Garrido, J., and Borges, F. (2011). Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates. *Eur J Med Chem*, 46(2), 773–777.
- Mertz, R. A, and Brutnell, T. P. (2014). Bundle sheath suberization in grass leaves: multiple barriers to characterization. *Journal of Experimental Botany*, 65(13), 3371–3380.
- Meyer, C. J., Peterson, C. A., and Bernards, M. A. (2011a). A comparison of suberin monomers from the multiseriate exodermis of *Iris germanica* during maturation under differing growth conditions. *Planta*, 233(4), 773–786.
- Meyer, C. J., Peterson, C. A., and Bernards, M. A. (2011b). Spatial and temporal deposition of suberin during maturation of the onion root exodermis. *Botany*, 89(2), 119–131.
- Millar, A A, and Kunst, L. (1997). Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *The Plant Journal*, 12(1), 121–131.
- Molina, I., Bonaventure, G., Ohlrogge, J., and Pollard, M. (2006). The lipid polyester composition of Arabidopsis thaliana and Brassica napus seeds. *Phytochemistry*, 67(23), 2597–2610.
- Molina, I., and Kosma, D. (2014). Role of HXXXD-motif/BAHD acyltransferases in the biosynthesis of extracellular lipids. *Plant Cell Reports*, 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(3), 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. *The Plant Journal*, 53(3), 437–449.
- Nair, M.G., Epp, M. D., Burke, B.A. (1988) Ferulate esters of higher fatty alcohols and allelopathy in Kalanchöe daigremontiana. *J Chem Ecol*14:589–603
- Negrel, J., Pollet, B., and Lapierre, C. (1996). Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. *Phytochemistry*, 43(6), 1195–1199.

- Pagnussat, L., Burbach, C., Baluška, F., and De La Canal, L. (2012). An extracellular lipid transfer protein is relocalized intracellularly during seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 63(18), 6555–6563.
- Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R. B., Hofer, R., ... Aharoni, a. (2007). The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiology*, 145(4), 1345–1360.
- 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(1), 113–124.
- Paul, S., Gable, K., Beaudoin, F., Cahoon, E., Jaworski, J., Napier, J. a., and Dunn, T. M. (2006). Members of the arabidopsis FAE1-like 3-ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9018–9029.
- Perraki, a., Cacas, J.-L., Crowet, J.-M., Lins, L., Castroviejo, M., German-Retana, S., ... Raffaele, S. (2012). Plasma Membrane Localization of *Solanum tuberosum* Remorin from Group 1, Homolog 3 Is Mediated by Conformational Changes in a Novel C-Terminal Anchor and Required for the Restriction of Potato Virus X Movement. *Plant Physiology*, 160, 624–637.
- Peterson, C. A., and Enstone, D. E. (1996). Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiologia Plantarum*, 97(3), 592–598.
- Pighin, J. A. (2004). Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter. *Science*, 306(5696), 702–704.
- Pinot, F., and Beisson, F. (2011). Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS Journal*, 278(2), 195–205.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*, 13(5), 236–246.
- Pulsifer, I. P., Kluge, S., and Rowland, O. (2012). Arabidopsis LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 31–39.
- Quilichini, T. D., Friedmann, M. C., Samuels, A. L., and Douglas, C. J. (2010). ATP-Binding Cassette Transporter G26 Is Required for Male Fertility and Pollen Exine Formation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(2), 678–690.
- Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., German Retana, S., Boubekour, T., ... Mongrand, S. (2009). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *The Plant Cell*, 21(5), 1541–1555.
- Ranathunge, K., Lin, J., Steudle, E., and Schreiber, L. (2011). Stagnant deoxygenated growth enhances root suberization and lignifications, but differentially affects water and NaCl permeabilities in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Cell Environ*, 34(8), 1223–1240.

- Ranathunge, K., and Schreiber, L. (2011b). Water and solute permeabilities of Arabidopsis roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *Journal of Experimental Botany*, *62*(6), 1961–1974.
- Ranathunge, K., Schreiber, L., and Franke, R. (2011a). Suberin research in the genomics era—New interest for an old polymer. *Plant Science*, *180*(3), 399–413.
- Razeq, F. M., Kosma, D. K., Rowland, O., and Molina, I. (2014). Extracellular lipids of *Camelina sativa*: Characterization of chloroform-extractable waxes from aerial and subterranean surfaces. *Phytochemistry*, *106*, 188–196.
- Rea, P. A. (2007). Plant ATP-Binding Cassette Transporters. *Annual Review of Plant Biology*, *58*(1), 347–375.
- Reinhardt, D., and Rost, T. (1995). Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany*, *35*(4), 563–574.
- Rowland, O. (2015). The regulated deposition of suberin. 2nd PaDIBA, Nantes, France.
- Rowland, O., and Domergue, F. (2012). Plant fatty acyl reductases: Enzymes generating fatty alcohols for protective layers with potential for industrial applications. *Plant Science*, *193-194*, 28–38.
- Rupasinghe, S., Duan, H., and Schuler, M. (2007). Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in *Arabidopsis thaliana*. *Proteins*, *68*, 279–293.
- Santos, S., Cabral, V., and Graça, J. (2013). Cork suberin molecular structure: Stereochemistry of the C18 epoxy and vic-diol ω -hydroxyacids and α,ω -diacids analyzed by nmr. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(29), 7038–7047.
- Santos, S., and Graça, J. (2006). Glycerol- ω -hydroxyacid-ferulic acid oligomers in cork suberin structure. *Holzforschung*, *60*(2), 171–177.
- Schmutz, A., Buchala, A. J., and Ryser, U. (1996). Changing the Dimensions of Suberin Lamellae of Green Cotton Fibers with a Specific Inhibitor of the Endoplasmic Reticulum-Associated Fatty Acid Elongases. *Plant Physiology*, *110*(2), 403–411.
- Schmutz, A., Jenny, T., Ryser, U. (1994). A caffeoyl fatty-acid glycerol ester from wax associated with green cotton fiber suberin. *Phytochemistry*, *36*, 1343–1346
- Schnurr, J., Shockey, J., and Browse, J. (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16*(3), 629–642.
- Schreiber, L. (2010). Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science*, *15*(10), 546–553.

- Schreiber, L., Franke, R., and Hartmann, K. (2005a). Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L .) and its relation to peridermal transpiration, 520–530.
- Schreiber, L., Franke, R., and Lessire, R. (2005b). Biochemical characterization of elongase activity in corn (*Zea mays* L.) roots. *Phytochemistry*, 66(2), 131–138.
- 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. *The Plant Journal*, 62(2), 277–290.
- Serra, O., Soler, M., Hohn, C., Franke, R., Schreiber, L., Prat, S., ... Figueras, M. (2009). Silencing of StKCS6 in potato periderm leads to reduced chain lengths of suberin and wax compounds and increased peridermal transpiration. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 697–707.
- Serra, O., Soler, M., Hohn, C., Sauveplane, V., Pinot, F., Franke, R., ... Figueras, M. (2008). CYP86A33-Targeted Gene Silencing in Potato Tuber Alters Suberin Composition, Distorts Suberin Lamellae, and Impairs the Periderm's Water Barrier Function. *Plant Physiology*, 149(2), 1050–1060.
- Shao, S., Meyer, C. J., Ma, F., Peterson, C. A., and Bernards, M. A. (2007). The outermost cuticle of soybean seeds: Chemical composition and function during imbibition. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1071–1082.
- Shi, J. X., Malitsky, S., De Oliveira, S., Branigan, C., Franke, R. B., Schreiber, L., and Aharoni, A. (2011). SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of Arabidopsis flower organs. *PLoS Genetics*, 7(5), e1001388.
- Shiono, K., Ando, M., Nishiuchi, S., Takahashi, H., Watanabe, K., Nakamura, M., ... Kato, K. (2014). RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 80(1), 40–51.
- Shoji, T. (2014). ATP-Binding Cassette and Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporters in Plants. *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 309). Elsevier Inc.
- Silva, S. P., Sabino, M. a., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., and Reis, R. L. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50(6), 345–365.
- Soler, M., Serra, O., Molinas, M., Huguet, G., Fluch, S., and Figueras, M. (2007). A Genomic Approach to Suberin Biosynthesis and Cork Differentiation. *Plant Physiology*, 144(1), 419–431.
- Soliday, C. L., Kolattukudy, P. E., and Davis, R. W. (1979). Chemical and ultrastructural evidence that waxes associated with the suberin polymer constitute the major diffusion barrier to water vapor in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Planta*, 146(5), 607–614.

- Soukup, A., Armstrong, W., Schreiber, L., Franke, R., and Votrubová, O. (2007). Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: A chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist*, *173*(2), 264–278.
- Staelin, L. A. (1997). The plant ER: A dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant Journal*.
- Stark, R. E., Sohn, W., Pacchiano Jr, R. A., Al-Bashir, M., and Garbow, J. R. (1994). Following Suberization in Potato Wound Periderm by Histochemical and Solid-State ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Methods. *Plant Physiology*, *104*(2), 527–533.
- Thomas, R., Fang, X., Ranathunge, K., Anderson, T. R., Peterson, C. A., and Bernards, M. A. (2007). Soybean Root Suberin: Anatomical Distribution, Chemical Composition, and Relationship to Partial Resistance to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiology*, *144*(1), 299–311.
- Togashi, N., Shiraishi, A., Nishizaka, M., Matsuoka, K., Endo, K., Hamashima, H., and Inoue, Y. (2007). Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, *12*(2), 139–148.
- Trenkamp, S., Martin, W., and Tietjen, K. (2004). Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(32), 11903–11908.
- Ukitsu, H., Kuromori, T., Toyooka, K., Goto, Y., Matsuoka, K., Sakuradani, E., ... Shinozaki, K. (2007). Cytological and biochemical analysis of COF1, an *Arabidopsis* mutant of an ABC transporter gene. *Plant and Cell Physiology*, *48*(11), 1524–1533.
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., ... Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, *13*(4), 151–159.
- Vishwanath, S.J., Kosma, D.K., Pulsifer, I.P., Scandola, S., Pascal, S., Joubès, J., Dittrich-Domergue, F., Lessire, R., Rowland, O., Domergue, F. (2013). Suberin-associated fatty alcohols in *Arabidopsis thaliana*: distributions in roots and contributions to seed coat barrier properties. *Plant Physiology*, *163*, 1118–1132
- Watanabe, K., Nishiuchi, S., Kulichikhin, K., and Nakazono, M. (2013). Does suberin accumulation in plant roots contribute to waterlogging tolerance? *Frontiers in Plant Science*, *4*, 178.
- Xue, Y., Xiao, S., Kim, J., Lung, S.-C., Chen, L., Tanner, J. A., ... Chye, M.-L. (2014). *Arabidopsis* membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 is involved in stem cuticle formation. *Journal of Experimental Botany*, *65*(18), 5473–5483.
- Yadav, V., Molina, I., Ranathunge, K., Castillo, I. Q., Rothstein, S. J., and Reed, J. W. (2014). ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *26*(9), 3569–88.

- Yan, B., and Stark, R. E. (2000). Biosynthesis, molecular structure, and domain architecture of potato suberin: a (13)C NMR study using isotopically labeled precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3298–3304.
- 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 of the United States of America*, 107(26), 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* (Vol. 160).
- Yang, W.-L., and Bernards, M. A. (2006). Wound-Induced Metabolism in Potato (*Solanum tuberosum*) Tubers. *Plant Signaling and Behavior*, 1(2), 59–66.
- Yatsu, L. Y., Espelie, K. E., and Kolattukudy, P. E., (1983). Ultrastructural and chemical evidence that the cell wall of green cotton fiber is suberized. *Plant Physiology*, 73, 521-524
- 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. *Plant Journal*, 77(5), 667–675.
- Yeats, T. H., Martin, L. B. B., Viart, H. M.-F., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., ... Rose, J. K. C. (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology*, 8(7), 609–611.
- Zeier, J., Goll, a., Yokoyama, M., Karahara, I., and Schreiber, L. (1999). Structure and chemical composition of endodermal and rhizodermal/hypodermal walls of several species. *Plant, Cell and Environment*, 22(3), 271–279.
- Zeier, J., Ruel, K., Ryser, U., and Schreiber, L. (1999). Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta*, 209(1), 1–12.

TRAVAUX REDACTIONNELS

Le dernier chapitre de cette thèse comprend deux articles écrits dans le cadre de cette thèse, une revue sur la subérine en tant que second auteur (publiée dans *Plant Cell Reports* en 2015) et un chapitre de livre sur les lipides de surface et le développement de l'épiderme en tant que premier auteur (en cours de publication).

Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier

Sollapura J. Vishwanath · Camille Delude ·
Frédéric Domergue · Owen Rowland

Received: 12 October 2014/Revised: 24 November 2014/Accepted: 2 December 2014/Published online: 14 December 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Suberin is a lipid-phenolic biopolyester deposited in the cell walls of certain boundary tissue layers of plants, such as root endodermis, root and tuber peridermis, and seed coats. Suberin serves as a protective barrier in these tissue layers, controlling, for example, water and ion transport. It is also a stress-induced antimicrobial barrier. The suberin polymer contains a variety of C16–C24 chain-length aliphatics, such as ω -hydroxy fatty acids, α,ω -dicarboxylic fatty acids, and primary fatty alcohols. Suberin also contains high amounts of glycerol and phenolics, especially ferulic acid. In addition, non-covalently linked waxes are likely associated with the suberin polymer. This review focusses on the suberin biosynthetic enzymes identified to date, which include β -ketoacyl-CoA synthases, fatty acyl reductases, long-chain acyl-CoA synthetases, cytochrome P450 monooxygenases, glycerol 3-phosphate acyltransferases, and phenolic acyltransferases. We also discuss recent advances in our understanding of the transport of suberin components intracellularly and to the cell wall, polymer assembly, and the regulation of suberin deposition.

Keywords Suberin · Lipid-phenolic polymer · Waxes · Cell wall · Stress resistance

Abbreviations

ABC	ATP-binding cassette
ASFT	Aliphatic suberin feruloyl transferase
CoA	Coenzyme A
CYP	Cytochrome P450 monooxygenase
DCA	α,ω -Dicarboxylic acid
ER	Endoplasmic reticulum
FACT	Fatty alcohol: coffeoyl-CoA coffeoyl transferase
FAR	Fatty acyl reductase
FTH	Suberin feruloyl transferase
GPAT	Glycerol 3-phosphate acyltransferase
KCS	β -Ketoacyl-CoA synthase
LACS	Long-chain acyl-CoA synthetase
LTP	Lipid transfer protein

Introduction

Plants have specialized lipid- and phenolic-based barriers that protect them from various environmental stresses such as drought and pathogen attack. Their aerial surfaces are coated with a cuticle that is comprised primarily of cutin, a glycerolipid polymer without much phenolic content, and associated waxes. Suberin is a glycerolipid-phenolic heteropolymer chemically related to cutin that is found in the cell walls of various aerial and underground tissues, external or internal. Suberin and its associated waxes play important roles at these tissue and plant–environment interfaces by serving as a barrier controlling the movements of water and solutes. Suberin is thus important for

Communicated by Neal Stewart.

S. J. Vishwanath · O. Rowland (✉)
Department of Biology and Institute of Biochemistry, Carleton
University, 1125 Colonel By Drive, Ottawa, ON K1S 5B6,
Canada
e-mail: owen.rowland@carleton.ca

C. Delude · F. Domergue
Laboratoire de Biogenèse Membranaire, CNRS, UMR 5200,
Université de Bordeaux, Bâtiment A3-INRA Bordeaux
Aquitaine, 71 Ave. Edouard Bourlaux, CS 20032,
33140 Villenave D'Ornon, France

the abilities of plants to withstand various abiotic stresses, such as drought and salinity, and also biotic stresses, such as microbial pathogen attack (Franke and Schreiber 2007; Schreiber 2010). An in-depth understanding of suberin biosynthesis and its regulated deposition may help in developing agronomically superior crops with drought tolerance and broad pathogen resistance. In addition, suberin contains high amounts of bifunctional oxygenated fatty acids (i.e. ω -hydroxy and α,ω -dicarboxylic fatty acids), which can serve as replacements for non-renewable petrochemical-derived products in the manufacturing of plastics or other chemical feedstocks (Gandini 2008; Pinto et al. 2009). Detailed knowledge of the suberin biosynthetic pathway is important for harnessing this renewable chemical resource to its full potential, for example, through metabolic engineering.

Significant progress has been made in our understanding of suberin monomer biosynthesis in the last decade with the availability of analytical and molecular genetic tools developed mostly for *Arabidopsis thaliana* and *Solanum tuberosum* (potato). Suberin composition, structure, distribution patterns and functions have been elaborated in detail in several reviews (Kolattukudy 2001; Bernards 2002; Ranathunge et al. 2011; Franke et al. 2012; Beisson et al. 2012). In this review, we focus on the enzymes producing the suberin monomers, recent discoveries on the transport of suberin precursors across the plasma membrane, and the regulation of suberin biosynthesis.

Suberin deposition sites and its functions in plants

Suberin is a complex polyester of aliphatics and phenolics deposited on the inner face of the cell wall adjacent to the plasma membrane (Fig. 1a) (Nawrath et al. 2013). The tissue distribution of suberized cell walls in plants suggests that plants synthesize and deposit suberin whenever they need to form a persistent barrier (Kolattukudy 2001; Franke and Schreiber 2007). Constitutive suberin deposition occurs primarily at tissue–tissue or plant–environment interfaces, such as root endodermal and peridermal cell walls (Fig. 1).

Plants synthesize suberin to create a hydrophobic barrier against uncontrolled water and solute diffusion through cell walls during normal development. Root exodermal and endodermal cell layers (the outermost and innermost layers of the root cortex, respectively) have a pronounced ability to limit apoplastic solute and water transport due to their characteristic cell wall-modifying structures (Hose et al. 2001; Enstone et al. 2003; Franke and Schreiber 2007). Specifically, these structures are Casparian strips and suberin lamellae. Casparian strips, which are primarily made up of lignin or a lignin-like polymer and possibly some

suberin, span the spaces between adjacent endodermal cells and serve as the initial barrier to the apoplastic movement of molecules (Naseer et al. 2012; Hosmani et al. 2013; Nawrath et al. 2013). Suberin lamellae are then laid down in the cell walls, but, unlike the Casparian strips, all around the endodermal cells. Suberin deposition has been proposed to further reduce uncontrolled transport of water and dissolved ions (e.g. nutrients and toxins) through the apoplast and transcellularly, and is thought to be important for selective nutrient uptake and exclusion of pathogens (Schreiber 2010). For example, an *Arabidopsis* suberin mutant *cyp86a1/horst*, which has a 60 % reduction in aliphatic suberin, has a reduced apoplastic barrier to the radial flow of water and NaCl in the root (Ranathunge and Schreiber 2011). Also, *Arabidopsis esb1* mutants, which have defective Casparian strips accompanied by ectopic suberin lamellae deposition close to the root tip, are reduced in their uptake of calcium, manganese and zinc (Baxter et al. 2009; Hosmani et al. 2013).

Suberin is deposited in the secondary growth periderm and wound periderm of matured aerial tissues (Franke and Schreiber 2007). A familiar example of suberized tissue is cork in the outer bark cells (phellogen) of the cork oak tree (*Quercus suber*) (Soler et al. 2007), which makes the cork layer impermeable to liquids and gases (Silva et al. 2005). It is also found in the peridermis of matured root tissues (Fig. 1b) and underground storage tubers, which is the direct interface between the plant and the soil environment thereby protecting the plant from various stresses such as exposure to desiccation, increased salt concentration, microbial attack, wounding, and soil pollutants such as heavy metals (Ranathunge et al. 2011). Suberin deposition can be induced by these stresses and others such as osmotic shock, soil acidity, and extreme temperature (Kolattukudy 2001; Franke et al. 2012). In mature seeds, suberin is found in seed coat layers and also seals off the chalazal micropyle region after disconnection from vascular tissue (Kolattukudy 1981; Molina et al. 2006, 2008; Domergue et al. 2010). Barrier properties depend on the species- and tissue-specific chemical variation in suberin monomers and the extent and pattern of deposition.

Suberin composition and structure

Suberin is a chemically complex heteropolymer. Studies have revealed that suberin is a glycerol-based polymer consisting of a polyaliphatic polyester linked with phenolic components and embedded waxes (Kolattukudy 1981; Bernards 2002; Nawrath 2002; Franke and Schreiber 2007; Pollard et al. 2008). The aliphatic portion is comprised of mainly ω -hydroxy fatty acids, α,ω -dicarboxylic acids, mid-chain oxygenated fatty acids, unsubstituted fatty acids, and

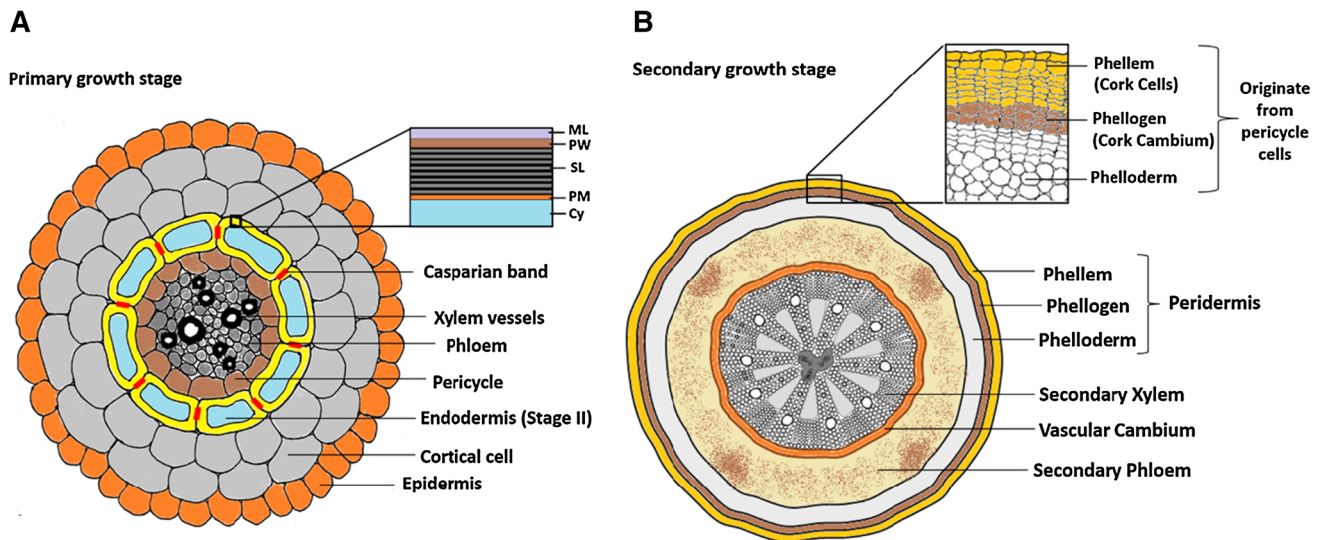


Fig. 1 Sites of suberin deposition in different developmental stages of roots. The diagrams depict root cross-sections of typical dicot plants (e.g. *Arabidopsis thaliana*). **a** Primary growth stage at stage II of endodermis development with suberin lamellae deposition in the inner face of endodermal cell walls (yellow) and deposition of

Casparian bands (red) localized at endodermal cell–cell junctions. *ML* middle lamellae *PW* primary cell wall, *SL* suberin lamellae, *PM* plasma membrane, *Cy* cytoplasm. **b** Secondary growth stage with suberin deposition in the phellem/cork cells (peridermis), which are differentiated from the pericycle cells (color figure online)

primary fatty alcohols (Kolattukudy 2001; Pollard et al. 2008). Glycerol in the suberin matrix is esterified to ω -hydroxy and α,ω -dicarboxylic fatty acids (Moire et al. 1999; Graça and Pereira 2000a; Graça and Santos 2006). The monomers are similar to cutin monomers, although longer chain lengths and greater proportions of α,ω -dicarboxylic acids are generally found in suberin. Common monomers released by transesterification of *Arabidopsis* suberin include C16–C24 ω -hydroxy fatty acids and C16–C24 α,ω -dicarboxylic acids, unsubstituted very long-chain fatty acids (>C18), 18:0–22:0 primary fatty alcohols, and ferulate (Franke et al. 2005; Molina et al. 2006). Considerable variability is observed in the total and relative amounts of suberin monomers between developmental stages, different tissues and plant species (Matzke and Reiderer 1991; Zeier and Schreiber 1998; Ranathunge et al. 2011). For example, in *Arabidopsis*, root suberin is dominated by C16, 18:1, and C22 monomers (Franke et al. 2005), while the predominant chain lengths in the seed coat are C22 and C24 (Molina et al. 2006). The phenolic components are derived from the phenylpropanoid pathway and mainly consist of hydroxycinnamates, commonly ferulic acid and coumaric acid, and monolignols (Bernards et al. 1995; Kolattukudy 2001).

Because it has not been possible to isolate suberin in an unaltered intact form, the overall organization of the interunit linkages between suberin monomers, including those involving monofunctional fatty acids and primary fatty alcohols, remains to be determined. Models proposed to explain the macromolecular structure of suberin have

been based on data generated by partial or incomplete depolymerisation of tree bark (cork) and tuber periderms, as well as solid state ^{13}C NMR spectroscopy of native and wound periderm of potato (Bernards et al. 1995; Graça and Pereira 2000a; Graça and Santos 2006; Ranathunge et al. 2011). There is no single method by which both aliphatic and phenolic fractions can be effectively isolated and studied together. Identified structures in partial depolymerisation experiments include: (1) monoacylglycerols of ω -hydroxy acids and α,ω -dicarboxylic acids (Graça and Pereira 2000b; Graça and Santos 2006), (2) ferulic acid linked to ω -hydroxy acids (Graça and Pereira 2000b), (3) trimeric diesters built of glycerol linked to two α,ω -dicarboxylic acids, and (4) ω -hydroxy acids linked to ferulic acid and glycerol (Graça and Santos 2006). Long-chain aliphatics, cross-linked phenolics, and cell wall polysaccharides were reported to be covalently linked to each other (Stark et al. 1994). The hydroxycinnamic acids have been proposed to covalently link the aliphatic suberin polyester to the cell wall, possibly with some monolignols (Kolattukudy 2001; Bernards 2002). A macromolecular structure model for suberin proposed that the monomeric blocks contain long-chain α,ω -dicarboxylic acids esterified to glycerol at both ends as the core of the suberin macromolecule (Franke and Schreiber 2007). These polyol glycerols may provide a two- and three-dimensional network by the formation of ester linkages to additional α,ω -dicarboxylic acids and ω -hydroxy acids, leading to an insoluble polymer (Franke and Schreiber 2007). The presence of glycerol in suberin with its three esterifying

position may generate a significantly cross-linked matrix (Beisson et al. 2007; Li et al. 2007b).

Sections of suberized cell walls when observed by transmission electron microscopy typically appear as a lamellar ultrastructure with distinctive alternating light (electron translucent) and dark (electron opaque) bands (Fig. 1). Using potato periderm as a model, Bernards proposed suberin to be composed of two spatially distinct but covalently linked domains: the polyphenolic and polyaliphatic domains (Bernards 2002). The polyphenolic domain is proposed to be lignin like, with covalent linkages to the carbohydrates of the primary cell, in which it resides, as well as covalent linkages to the suberin polyaliphatic domain abutting the primary cell wall. The polyaliphatic domain was then proposed to be a stacked, glycerol-based lipid-phenolic heteropolymer with the translucent, electron-light regions composed of fatty acid derivatives (aliphatics) and the dark, electron-rich regions composed of phenolics, mostly esterified ferulic acid. However, a knockout mutant of *Arabidopsis ASFT/HHT*, which has a complete reduction in ester-linked ferulic acid in its aliphatic suberin, is not affected in the lamellar structure of root peridermal cell walls (Molina et al. 2009). This contradicts the proposed role of ferulic acid as being important for the lamellae appearance of suberin. It has also been suggested that the light bands in the suberin lamellar structure represent a wax layer (Soliday et al. 1979). However, an *Arabidopsis far1 far4 far5* triple mutant, which has a major reduction in suberin-associated waxes by nearly completely lacking free fatty alcohols and alkyl hydroxycinnamates (Vishwanath et al. 2013), is not affected in its suberin lamellae appearance (Camille Delude and Frédéric Domergue, unpublished data). Thus, the structural basis of the lamellae appearance of suberin is still not understood.

Suberin biosynthesis

Deposition of suberin requires biosynthesis of aliphatic, phenolic and glycerol monomers, and then transportation to the cell wall to form an insoluble macromolecular assembly. Although the monomeric composition of suberin biopolymer is known for a wide variety of plants, numerous processes underlying suberin biosynthesis, such as the sequence of biosynthetic reactions, transport mechanism of monomers, and controlled polymerization, remain elusive.

The development of quantitative analytical tools to measure suberin composition following depolymerization and the characterization of *Arabidopsis* mutants with altered suberin composition have been key to identifying most of the genes encoding enzymes involved in suberin biosynthesis. However, biochemical approaches to isolate

these proteins and study them *in vitro* have been difficult, since enzymes involved in biosynthesis of suberin monomers are likely associated with membranes and/or are part of enzyme complexes. The major suberin biosynthetic steps and the suberin genes identified in different plant species are discussed below.

Aliphatic monomers

The biosynthetic routes for the major aliphatic monomers of suberin were initially elucidated by studying fatty acid ω -hydroxylation and ω -hydroxy acid oxidation using incorporation of radiolabeled oleic acid or acetate in wound-healed potato slices (Dean and Kolattukudy 1977; Agrawal and Kolattukudy 1978). Suberin monomer production begins with the plastidic synthesis of saturated C16 and C18 fatty acids driven by the fatty acid synthase multienzyme complex. Suberin aliphatic monomers are then mostly derived from 16:0 and 18:1 fatty acyl-CoAs.

Biosynthesis of suberin monomers involves ω -hydroxylation of fatty acids and subsequent oxidation to α,ω -dicarboxylic acids, elongation of long-chain fatty acid precursors, activation of fatty acids to fatty acyl-CoA thioesters, reduction of fatty acyl chains to primary fatty alcohols, various acylations largely involving glycerol, phenolic compound incorporation, and polymerization of monomers (Fig. 2) (Kolattukudy 1981; Bernards 2002; Franke and Schreiber 2007; Pollard et al. 2008; Ranathunge et al. 2011). The order of these reactions, however, is still unknown. Subcellular localisation studies have shown that the core reactions of the suberin biosynthetic pathway are membrane localized and occur at the endoplasmic reticulum.

The major steps involved in the possible sequence of reactions in synthesis of suberin polyester building blocks are illustrated in Fig. 2. Enzymes identified thus far for suberin monomer synthesis include β -ketoacyl-CoA synthases (KCS), fatty acid oxidases of the cytochrome P450 monooxygenase (CYP) family, fatty acyl reductases (FAR), acyltransferases of the glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) family, and hydroxycinnamoyl-CoA transferases (ASFT or FHT) (Table 1).

Acyl activation

Generally, the first step in metabolizing fatty acids is the conversion of free fatty acids to a fatty thioesters, for example fatty acyl-coenzymeA thioesters. There are at least nine long-chain acyl-CoA synthetase (LACS) genes in *Arabidopsis thaliana* (Shockey et al. 2002). One of them, LACS2, is involved in the synthesis of cutin and cuticular wax (Schnurr et al. 2004). Knockout mutants of LACS2 showed a defective cuticle with reduced monomer loads,

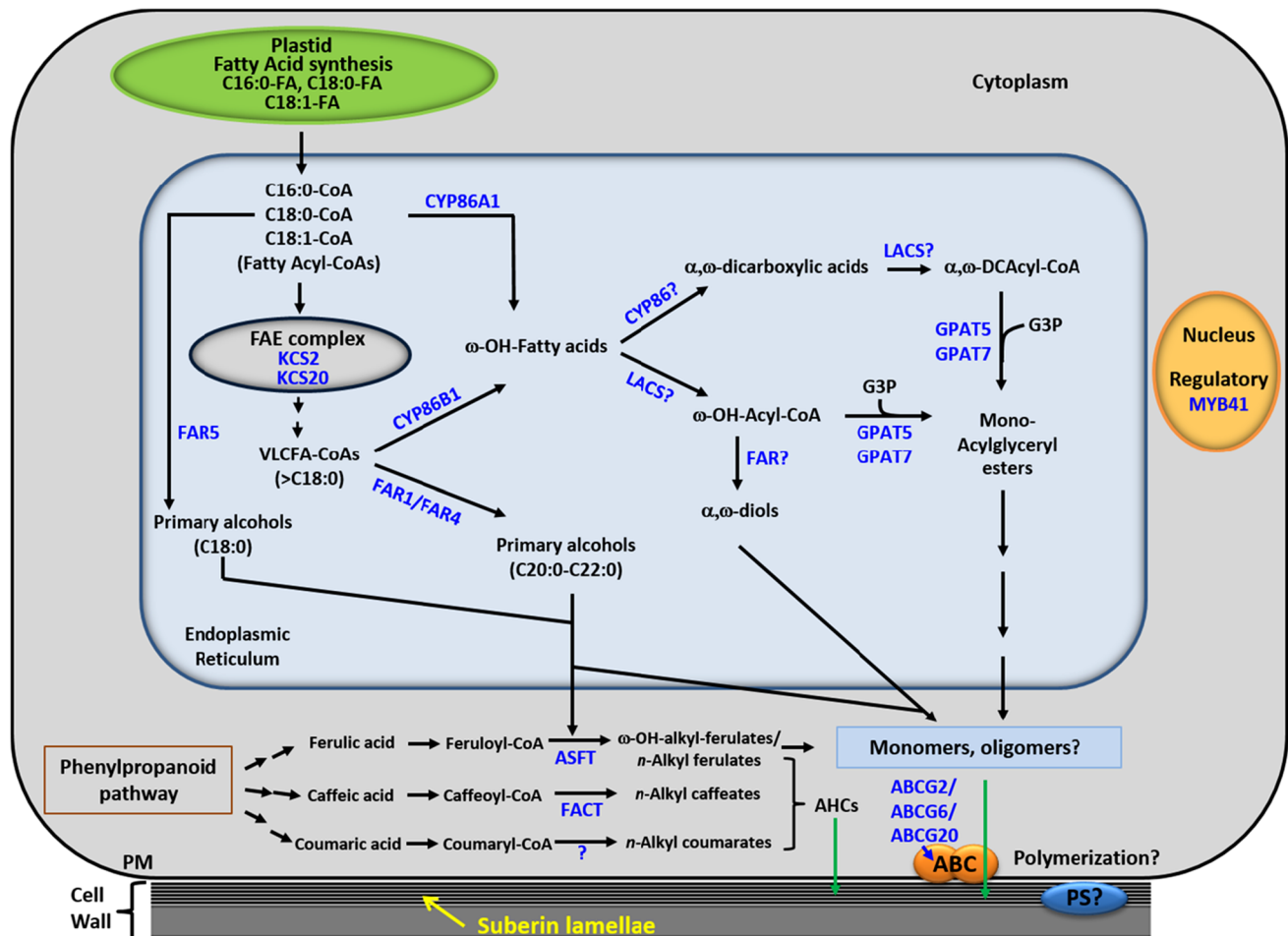


Fig. 2 Overview of the suberin biosynthetic pathway with subsequent export to the cell wall. Specific protein names in blue are those discovered in *Arabidopsis thaliana*. Fatty acid synthesis occurs in the plastid giving rise to predominately 16:0 and 18:1 acyl chains that can be exported and then modified by suberin biosynthetic enzymes localized in the endoplasmic reticulum. Fatty acyl elongation occurs via the fatty acid elongation (FAE) complex producing very long-chain fatty acids (VLCFAs); acyl reduction by fatty acyl reductases (FARs) producing primary alcohols and α,ω -diols; fatty acyl oxidation by cytochrome P450 enzymes (CYPs) producing ω -hydroxy fatty acids (ω -OHs) and α,ω -dicarboxylic acids (DCAs); and esterification of ω -OHs and DCAs to glycerol-3-phosphate (G3P) by glycerol 3-phosphate acyltransferases (GPATs) producing *sn*-2 monoacylglycerols. The further oxidation of ω -OHs to DCAs may be catalyzed by the same cytochrome P450s that generate the ω -OHs. Fatty acid activation to fatty acyl-CoAs by long-chain acyl-CoA synthetases

(LACSs) is likely to be important. The intracellular transport mechanisms and polymerization steps of suberin building blocks remain unclear. ATP-binding-cassette (ABC) transporters are involved in transport of suberin monomers across the plasma membrane (PM). Polyester synthase(s) (PS) may extend *sn*-2 monoacylglycerols with other suberin monomers to produce high molecular weight polyesters. Coumaric, caffeic, and ferulic acids, products of the phenylpropanoid pathway are linked to fatty alcohols by BAHD-type acyltransferases to produce alkyl hydroxycinnamates (AHCs) found in suberin-associated waxes. ASFT, Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase; FACT, Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Caffeoyl Transferase. Myb-type and other transcription factors are important for controlling the specific developmental and stress-induced gene expression patterns of the suberin biosynthetic genes (color figure online)

indicating that LACS2 is required for activating intermediates in cutin synthesis. LACS1 is an acyl-CoA synthetase that preferentially activates C16 fatty acids in cutin synthesis (Lü et al. 2009). LACS1 and LACS2 have been shown to have overlapping activities in cutin and wax synthetic pathways (Lü et al. 2009). LACS genes involved in suberin biosynthetic pathway have not yet been reported, but chemical analyses of loss-of-function mutants of LACS2 gene indicate additional roles in suberin formation

(Isabel Molina, unpublished data; Li-Beisson et al. 2013). LACS enzyme(s) may also act on the modified fatty acids (ω -hydroxy acids and α,ω -dicarboxylic acids) before esterification to glycerol.

Acyl elongation

The suberin polymer is characterized by long-chain and very long-chain fatty acids (Pollard et al. 2008). The

Table 1 Genes involved in suberin polyester and suberin-associated wax biosynthetic pathways in roots, periderms and/or seed coats of various plant species

Gene name	Organism and AGI code or NCBI accession	Function/annotation	Chemical phenotype of mutant or overexpressing line	Physiological phenotype of mutant and enzyme activities ^a	Reference
<i>CYP86A1/HORST</i>	Arabidopsis At5g58860	Fatty acyl ω -hydroxylase (cytochrome P450 monooxygenase)	Strongly reduced levels of 16:0, 18:0 and 18:1 ω -hydroxy acids and α,ω -DCAs; 60 % reduction in total suberin in roots	Altered suberin lamellae; recombinant protein exhibits C16 and C18 fatty acid hydroxylation activity	Höfer et al. (2008)
<i>CYP86B1/RALPH</i>	Arabidopsis At5g23190	Fatty acyl ω -hydroxylase (cytochrome P450 monooxygenase)	Root and seed coat suberin with near lack of C22 and C24 ω -hydroxy acids and α,ω -DCAs; increased C22 and C24 fatty acids	Enzyme activity not yet demonstrated in vitro	Compagnon et al. (2009), Molina et al. (2009)
<i>KCS2/DAISY</i>	Arabidopsis At1g04220	β -Ketoacyl-CoA synthase (condensing enzyme of fatty acid elongase complex)	Reduced levels of suberin monomers >C20; accumulation of \leq C20 monomers in roots	Reduced root growth; redundant function with KCS20; KCS activity when expressed in yeast	Franke et al. (2009), Lee et al. (2009)
<i>KCS20</i>	Arabidopsis At5g43760	β -Ketoacyl-CoA synthase (condensing enzyme of fatty acid elongase complex)	Reduced levels of suberin monomers >C20; accumulation of \leq C20 monomers in roots	Reduced root growth; redundant function with KCS2; KCS activity when expressed in yeast	Lee et al. (2009)
<i>GPAT5</i>	Arabidopsis At3g11430	Acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase	Mutant has 50 % reduction in total suberin content with main reduction in C20–C24 ω -hydroxy acids and α,ω -DCAs in seeds. Overexpression gives rise to monoacylglycerols and free fatty acids in aerial cuticular waxes	Increased dye permeability of the seed coat; increased salt sensitivity; recombinant protein shows acyltransferase activity but lacks phosphatase activity	Beisson et al. (2007), Li et al. (2007b), Yang et al. (2010)
<i>GPAT7</i>	Arabidopsis At5g06090	Acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase	Overexpression gives rise to suberin-like monoacylglycerols and free fatty acids in aerial cuticular waxes	Wound inducible gene. Leaves of mutants remain permeable to toluidine blue 48 h after wounding (wild-type plants impermeable)	Yang et al. (2012)
<i>ASFT/HHT</i>	Arabidopsis At5g41040	Feruloyl-CoA transferase/hydroxycinnamoyl transferase (BAHD acyltransferase)	In seeds, lack of ferulate in aliphatic suberin, quantitatively similar reduction in ω -hydroxy acids, increase in α,ω -DCAs; major reduction in ferulate in root suberin	Feruloyl transferase activity of the recombinant protein to ω -hydroxy fatty acids and fatty alcohols	Molina et al. (2009), Gou et al. (2009)
<i>FAR1</i>	Arabidopsis At5g22500	Fatty acyl-CoA reductase	Root: reduction in 22:0 alcohols; seed: reduction in 22:0 alcohols and 22:0 diols	22:0 (and 18:0) alcohol formation in yeast expressing FAR1	Domergue et al. (2010), Vishwanath et al. (2013)
<i>FAR4</i>	Arabidopsis At3g44540	Fatty acyl-CoA reductase	Root and seed: reduction in 20:0 alcohols	20:0 (and 18:0) alcohol formation in yeast expressing FAR4	Domergue et al. (2010), Vishwanath et al. (2013)
<i>FAR5</i>	Arabidopsis At3g44550	Fatty acyl-CoA reductase	Root and seed: reduction in 18:0 alcohols	18:0 alcohol formation in yeast expressing FAR5	Domergue et al. (2010), Vishwanath et al. (2013)
<i>ESB1</i>	Arabidopsis At2g28670	Dirigent-domain containing protein	Disordered and defective Casparian strips (lignin) with twofold increase in all suberin monomers in roots	Reduced Ca ²⁺ content in shoots, reduced transpiration; increased drought tolerance and water use efficiency	Baxter et al. (2009), Hosmani et al. (2013)

Table 1 continued

Gene name	Organism and AGI code or NCBI accession	Function/annotation	Chemical phenotype of mutant or overexpressing line	Physiological phenotype of mutant and enzyme activities ^a	Reference
<i>FACT</i>	Arabidopsis At5g63560	Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Caffeoyl Transferase (BAHD acyltransferase)	Near complete lack of 18:0-22:0 alkyl caffeates in root waxes	Acyltransferase activity of recombinant FACT1 to caffeoyl-Coenzyme A (CoA) substrate	Kosma et al. (2012)
<i>MYB41</i>	Arabidopsis At4g28110	MYB-type transcription factor	Overexpression of MYB41 results in upregulation of suberin biosynthetic genes and the accumulation of 22-times more suberin-type monomers in leaves	Overexpression in Arabidopsis and <i>Nicotiana benthamiana</i> leaves led to formation of suberin-like lamellae in both epidermal and mesophyll cells	Kosma et al. (2014)
<i>ABCG2</i>	Arabidopsis At2g37360	ATP-binding cassette (ABC) transporters	Triple <i>abcg2 abcg6 abcg20</i> mutant has reduced suberin load in seed coats, but increased suberin load in roots; tap root waxes have reduced alkyl hydroxycinnamates	Triple <i>abcg2 abcg6 abcg20</i> mutant has increased seed coat and root permeability, and increased sensitivity to inhibition of seed germination by abscisic acid. Altered suberin lamellae in roots	Yadav et al. (2014)
<i>ABCG20</i>	At5g13580				
<i>CYP86A33</i>	Potato EU293405	Fatty acyl ω -hydroxylase (cytochrome P450 monooxygenase)	Potato tuber periderm: 70-90 % reduced 18:1 ω -hydroxy acids and α,ω -DCAs; 60 % reduction in total suberin; 60 % reduced glycerol content	Altered suberin lamellae; three to fivefold increase of peridermal water permeability	Serra et al. (2009a)
<i>SKCS6</i>	Potato EU616538	β -Ketoacyl-CoA synthase (condensing enzyme of fatty acid elongase complex)	Tuber periderm: chain length specific reduction in monomers \geq C28; accumulation of compounds \leq C26; same chain length specific phenotype in suberin-associated waxes	50 % increased peridermal water permeability	Serra et al. (2009b)
<i>FHT</i>	Potato FJ825138	Feruloyl-CoA transferase (BAHD acyltransferase)	Potato tuber periderm: >70 % reduction in ferulate and 18:1 ω -hydroxy acids of suberin; reduced alkyl ferulates and increased free fatty acids and fatty alcohols in suberin-associated waxes	10- to 15-fold increased peridermal water permeability; feruloyl transferase activity of the recombinant protein to ω -hydroxy acids and alcohols	Serra et al. (2010), Boher et al. (2013)
<i>ABCG1</i>	Potato XM_006345853.1	ATP-binding cassette (ABC) transporter	Potato tuber periderm : reduction of 18:1 and \geq C24 monomers; increase in C20 and C22 monomers; accumulation of hydroxycinnamic acid conjugates	Reduced suberin deposition; disorganized cell layers in tuber periderm and root exodermis, twofold reduction of potato tuber weight	Landgraf et al. (2014)
<i>RCN11</i> <i>OsABCG5</i>	Rice Os03g17350	ATP-binding cassette (ABC) transporter	Defect in suberization of the hypodermis but not in the endodermis; under stagnant deoxygenated conditions, reduction in aliphatic monomers and increase in aromatic monomers	Reduced root growth and flexibility under stagnant deoxygenated conditions; absence of hypodermal suberization; impairment of the apoplastic barrier	Shiono et al. (2014)

DCAs dicarboxylic acids^a Data from in vitro assays and/or heterologous expression studies

elongation of fatty acyl-CoAs is catalyzed by an ER-localized multienzyme system known as the fatty acid elongase complex, which is composed of four enzymes (Samuels et al. 2008). The extent of elongation of the long-chain fatty acyl-CoAs is controlled by the β -ketoacyl-CoA synthase (KCS), the first enzyme in the fatty acid elongase complex (Millar and Kunst 1997).

There are 21 *KCS* genes in Arabidopsis and assigning a specific function to each gene is difficult since the saturated long-chain fatty acids are common to several biosynthetic pathways (e.g. waxes, suberin and sphingolipids). Two Arabidopsis β -ketoacyl-CoA synthases, *DAISY/AtKCS2* and *AtKCS20*, are involved in elongation of C20 acyl chain suberin precursors (Franke et al. 2009; Lee et al. 2009). Loss-of-function mutations in the corresponding *KCS2* gene resulted in reductions of C22 and C24 very long-chain fatty acid derivatives in root suberin, although the total amount of suberin remained the same as wild type. However, the double mutant *kcs2 kcs20* is more drastically affected in aliphatic root suberin than either single mutant, indicating that the enzymes function in a partially redundant manner (Lee et al. 2009).

Similarly, in potato, *StKCS6* was found to be highly expressed in suberising tuber periderm (Serra et al. 2009b). Silencing of potato *StKCS6* resulted in reduction of suberin monomers with chain lengths of C28 and higher in the tuber peridermis, while precursors with chain lengths of C26 and lower accumulated (Serra et al. 2009b). This indicates that *StKCS6* is involved in elongation of suberin precursors to C28 or higher chain lengths. It is not known whether *StKCS6*, as part of the fatty acid elongase complex, can alone elongate fatty acyl-CoAs past C28 or whether additional factors are required. For example, in Arabidopsis stem epidermal cells, *CER2*, a predicted BAHD acyltransferase, is additionally required for the elongation of fatty acids above C28 (Haslam et al. 2012; Pascal et al. 2013). A *CER2*-like protein may thus be active in potato periderm to achieve the analogous elongation step.

Acyl oxidation

The ω -hydroxy acids and α,ω -dicarboxylic acids are two major monomers of the suberin polyester. In plants, hydroxylation of the terminal methyl group of aliphatics (ω -position) is catalyzed by enzymes belonging to the CYP86 subfamily of cytochrome P450 monooxygenases (Molina 2010). The fatty acids (or activated forms) are hydroxylated to 16:0 and 18:1 ω -hydroxy fatty acids, of which a proportion are further oxidized into 18:1 α,ω -dicarboxylic acids by an ω -hydroxy fatty acid dehydrogenase (Agrawal and Kolattukudy 1978; Kurdyukov et al. 2006).

CYP86A1 and CYP86B1 are two of the cytochrome P450-dependent Arabidopsis fatty acid oxidases and fatty acid hydroxylases (monooxygenases/ ω -hydroxylases) of the CYP86 subfamily that are involved in root suberin synthesis (Li et al. 2007a; Höfer et al. 2008; Compagnon et al. 2009; Molina et al. 2009). CYP86A1 generates in vitro shorter-chain ω -hydroxy acids from C12 to C18 fatty acids and is especially important in the early deposition of suberin in the primary endodermis (Höfer et al. 2008). Loss-of-function mutants of *CYP86A1* (*HORST*) have altered root suberin ultrastructure and a 60 % decrease in total aliphatic root suberin due to significant reductions in C16 and C18 ω -hydroxy acids and α,ω -dicarboxylic acids. CYP86B1 is responsible for generation of long-chain ω -hydroxy acids from C22 to C24 fatty acids (Compagnon et al. 2009; Molina et al. 2009). Analysis of *CYP86B1* (*RALPH*) knockout lines showed increased accumulation of long-chain C22 and C24 fatty acids and almost complete lack of C22 and C24 corresponding ω -hydroxy acids, and α,ω -dicarboxylic acids compared to wild type in root and seed coat aliphatic suberin.

Similarly, potato *StCYP86A33*, the orthologue of *AtCYP86A1*, is important for production of ω -functionalized suberin monomers of the tuber periderm (Serra et al. 2009a). Silencing of *StCYP86A33* resulted in significant reduction in 18:1 ω -hydroxy acids and α,ω -dicarboxylic acids in potato tuber periderm (Serra et al. 2009a).

Acyl reduction

The reduction of activated fatty acids to primary alcohols is catalyzed by fatty acyl reductases (FARs). Saturated primary fatty alcohols of chain lengths C18, C20 and C22 are the common components of suberin (Franke et al. 2005; Schreiber et al. 2005; Domergue et al. 2010). Primary alcohols were found to constitute about 6–7 % of total aliphatics in the suberin polymer (Pollard et al. 2008). In potato tuber periderm, fatty alcohols of higher chain lengths (C22, C24 and C26) constitute about 70 % of the total primary alcohol content (Graça and Pereira 2000a).

In Arabidopsis, a family of eight *FAR* genes has been identified (Rowland and Domergue 2012). Three of these genes, *FAR1*, *FAR4* and *FAR5*, are involved in production of suberin-associated primary alcohols (Domergue et al. 2010; Vishwanath et al. 2013). The T-DNA insertion single mutant lines for each gene have chain-length specific reductions of primary alcohols; *far1* is reduced in 22:0-OH, *far4* is reduced in 20:0-OH and *far5* is reduced in 18:0-OH in root and seed suberin (Domergue et al. 2010). *FAR1* and *FAR4* may be involved in the synthesis of α,ω -diols present in seed coat suberin although it remains to be tested whether they accept ω -hydroxy acyl chains as substrates. In *far1 far4 far5* triple mutant lines, the total fatty alcohol

load in suberin is reduced by 70–80 % without any effect on the other main monomers, suggesting that the polymerization process has not been altered. Nevertheless, an increased permeability of the seed coat was observed in these triple *far* mutant lines (Vishwanath et al. 2013).

FAR1, *FAR4* and *FAR5* also generate the 18:0–22:0 fatty alcohol components that make up alkyl hydroxycinnamates of root waxes (Kosma et al. 2012). Interestingly, analysis of the distribution of fatty alcohols in Arabidopsis roots showed that only 20 % of the total is part of the root suberin polymer, while the remaining 80 % are found in the non-polymeric (soluble) fraction (Vishwanath et al. 2013). If these latter are soluble components of the suberin barrier, fatty alcohols are then as abundant as α,ω -dicarboxylic fatty acids and therefore represent major aliphatics of Arabidopsis suberin.

Acyl esterification

Acyl transfer reactions are carried out by acyl-CoA-dependent glycerol 3-phosphate acyltransferases (GPATs) that produce monoacylglycerols, which may be considered as the initial suberin building blocks. GPATs catalyze the transfer of a fatty acid moiety from acyl-coenzyme A (acyl-CoA) or acyl–acyl carrier protein (acyl-ACP) to the *sn*-1 or *sn*-2 position of glycerol 3-phosphate (Yang et al. 2012). Glycerol has been reported to be covalently bound to the aliphatic and phenolic parts of suberin (Moire et al. 1999; Graça and Pereira 2000a).

In Arabidopsis, at least 20 such potential acyltransferases have been identified through sequence similarity and conserved motif searches (Beisson et al. 2003; Li-Beisson et al. 2013). Of these, eight *GPAT* genes have been characterized by gain- and loss-of-function approaches, and are now known to play a role in synthesis of cutin or suberin. Unlike GPATs with *sn*-1 regiospecificity involved in membrane or storage lipid synthesis, GPAT4, 6 and 8 are unique bifunctional enzymes with both *sn*-2 acyltransferase and phosphatase activities resulting in the formation of *sn*-2 monoacylglycerol products (Yang et al. 2010, 2012). GPAT4, 6 and 8 strongly prefer 16:0 and 18:1 ω -oxidized acyl-CoAs over unmodified or longer acyl chains substrates (Yang et al. 2010, 2012). GPAT5 is involved in the transfer of very long-chain aliphatics (C20–C24) to a glycerol-based acceptor for Arabidopsis root and seed coat suberin (Beisson et al. 2007). GPAT5 also exhibits a strong preference for *sn*-2 acylation, however, it lacks phosphatase activity (Yang et al. 2010). Arabidopsis mutants of *GPAT5* were reported to have large reductions in C20–C24 unsubstituted fatty acids, ω -hydroxy acids and α,ω -dicarboxylic acids in both root and seed coat suberin with a 50 % reduction in total suberin content (Beisson et al. 2007). *GPAT7* is induced by wounding and produces

suberin-like monomers when overexpressed in leaves, supporting its involvement in wound-induced suberin biosynthesis (Yang et al. 2012).

Genes encoding feruloyl-CoA transferases required for incorporation of ferulate into the suberin polyester have been identified from Arabidopsis and potato (Gou et al. 2009; Molina et al. 2009; Serra et al. 2010; Boher et al. 2013). Aliphatic suberin feruloyl transferase (*ASFT/HHT*) from Arabidopsis and its ortholog from potato called fatty omega-hydroxy acid/fatty alcohol hydroxycinnamoyl transferase (*FHT*) belong to the BAHD family of acyltransferases. *ASFT* catalyzes acyl transfer of feruloyl-CoA to ω -hydroxy fatty acids and fatty alcohols. Mutants of *ASFT/HHT* have a complete lack of ferulate in root suberin and significant reductions in ω -hydroxy acids and α,ω -dicarboxylic acids (Gou et al. 2009; Molina et al. 2009). Periderms of *FHT*-RNAi silenced potato have a strong reduction in ester-linked ferulic acids, but without any structural alterations in the suberin lamellae (Serra et al. 2010). *ASFT* and *FHT* are cytosol-localized enzymes that catalyze the acyl transfer from feruloyl-CoA to ω -hydroxy acids and fatty alcohols (Molina et al. 2009; Serra et al. 2010; Boher et al. 2013).

Suberin-associated root waxes

Suberin is found in association with non-covalently linked waxes, which are typically extracted by brief immersion of tissues in chloroform or by extensive solvent extraction of isolated periderms. In the periderm of underground storage organs, suberin-associated waxes include alkanes, primary fatty alcohols, fatty acids and alkyl ferulates, with the alkyl ferulates representing up to 60 % of the total wax load in native and wound-healing periderm of potato (Espelie et al. 1980; Schreiber et al. 2005). Similar compounds have been found in waxes associated with suberin in roots of soybean, *Iris germanica*, Arabidopsis, and *Camelina sativa* (Thomas et al. 2007; Li et al. 2007b; Meyer et al. 2011; Razeq et al. 2014). Suberin-associated waxes are considered as major contributors to the barrier for water diffusion across suberized cell walls (Soliday et al. 1979; Schreiber 2010).

In Arabidopsis, root waxes have so far only been found in mature taproots having a fully developed periderm. They mainly consist of alkyl hydroxycinnamates (principally, alkyl caffeate and alkyl coumarate esters), fatty acids and fatty alcohols, and also contain 29:0 alkanes and their mid-chain oxidized derivatives, sterols and *sn*-2 monoacylglycerols (Li et al. 2007b; Molina et al. 2009; Kosma et al. 2012). Arabidopsis root waxes have chemical characteristics in common with monomers released upon depolymerization of root suberin, and a positive correlation between accumulation of *sn*-2 monoacylglycerols and the

ectopic expression of GPAT5 was reported (Li et al. 2007b). Similarly, FARs are responsible for the synthesis of the C18–C22 fatty alcohols present in the suberin polymer and those found in root waxes (Kosma et al. 2012; Vishwanath et al. 2013), suggesting that common biosynthetic pathways produce polymerized and non-covalently linked aliphatics associated with suberin.

In potato, suberin-associated waxes are dominated by alkyl ferulates (Bernards and Lewis 1992; Schreiber et al. 2005). A BAHD acyltransferase, suberin feruloyl transferase (FTH), is involved in their synthesis (Serra et al. 2010). In *FTH* RNAi plants, the alkyl ferulates and ferulate are reduced in suberin-associated waxes and suberin polymer, respectively. Although the typical suberin lamellar ultrastructure is unaffected, water loss is greatly increased and maturation prevented, suggesting that alkyl ferulates have important functions in the sealing properties and maturation of the potato periderm. Another BAHD acyltransferase, fatty alcohol:caffeoyl-CoA caffeoyl transferase (FACT), is responsible for the synthesis of the alkyl caffeates present in Arabidopsis taproot waxes (Kosma et al. 2012).

Transportation and polymer assembly

The various suberin precursors, whether they be monomers or partially formed oligomers, need to be transported from the ER to and across the plasma membrane, and then be polymerized in the apoplast to form the suberin barrier. Although the synthesis of the various aliphatics found in suberin is now fairly well documented (see above), their transport is just starting to be elucidated while the polymerisation mechanisms remain unknown. Nevertheless, numerous reports on these processes in cutin and sporopollenin biosynthesis allow for the prediction of candidate genes involved in suberin transport and assembly.

Suberin transport

The transport between the ER and the plasma membrane may occur through the secretory pathway. Golgi and *trans*-Golgi network-mediated vesicle trafficking were recently shown to be involved in the export of cuticular waxes to the apoplast (McFarlane et al. 2014). The same may be true for suberin and associated waxes. Also, like for cutin and wax, trafficking through the plasma membrane and into the cell wall involves ATP-binding cassette (ABC) transporters and possibly lipid transfer proteins (LTPs).

Plasma membrane-localized ABC transporters of the G-subfamily were predicted to be involved since such transporters are responsible for the export of cuticular and sporopollenin precursors (Pighin et al. 2004; Choi et al. 2011). Furthermore, transcripts encoding an ABC

transporter of the WBC/WHITE, a subgroup of the G-family, are highly upregulated in phellem/cork tissue of cork oak tree (Soler et al. 2007). In agreement, it was recently shown that the rice transporter RCN1/OsABCG5 is involved in the suberization of the hypodermis of rice roots (Shiono et al. 2014) and that ABCG1 is required for the formation of suberin in potato tuber periderm (Landgraf et al. 2014). In Arabidopsis, an *abcg2 abcg6 abcg20* triple mutant was also characterized and shown to have alterations in the structure, composition and properties of root and seed coat suberin (Yadav et al. 2014). The fact that no visible phenotypes were observed in the single mutants suggests that there is functional redundancy amongst these ABC transporters in the export of suberin precursors through the plasma membrane.

Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored LTPs and Type III LTPs were also shown to be involved in cuticular lipid deposition and pollen exine formation, respectively (Kim et al. 2012; Huang et al. 2013). Results from gene co-expression analysis in *A. thaliana* and rice suggest that LTPGs are separated into three modules involved in cutin, suberin and sporopollenin biosynthesis and/or deposition (Edstam et al. 2013). Nevertheless, a detailed analysis of some of these *ltpg* mutants in Arabidopsis revealed that the ones most affected in seed coat permeability and suberin composition did not belong to the suberin module (Edstam and Edqvist 2014).

Taken together, these results support the involvement of ABCG transporters and LTPs in the transport of suberin components, but further studies are required to fully understand the mechanisms involved in these processes.

Suberin assembly

The elucidation of surface lipid polymer assembly has been recently advanced by the identification in tomato of the first cutin synthase, CD1 (Yeats et al. 2012; Girard et al. 2012). This extracellular protein belongs to the GDSL-motif lipase/hydrolase family and catalyzes in vitro transesterification of *sn*-2-(10,16-dihydroxyhexadecanoyl)-monoacylglycerol precursors (Yeats et al. 2012). A homolog from Arabidopsis was found and characterized in vitro, but the fact that polymerized products are solely linear in vitro suggests that other proteins are required for branching and cross-linking to form a reticulate insoluble polymer (Yeats et al. 2014). A cell wall-associated protein called BODYGUARD, which is an α,β -hydrolase-fold protein, has also been proposed to be involved in cutin cross-linking, although biochemical evidence is lacking (Kurdyukov et al. 2006). Paralogues of CD1 and BODYGUARD may be involved in suberin polymerization, and candidates exist but remain untested. Also, the fact that the GPATs involved in suberin biosynthesis, GPAT5 and GPAT7, lack

phosphatase active site residues and produce in vitro *sn*-2 acyl-lysophosphatidic acids as major products (see above) suggests that there may be differences between the cutin and suberin polymerisation processes.

Analogous to the oxidative cross-linking model accepted for lignification, it has been hypothesized that the phenolic components of suberized cell walls are polymerized via a peroxidase/H₂O₂-mediated process (Kolattukudy 1980; Nawrath 2002). An anionic peroxidase isoform of potato involved in the polymerization of the phenolic component during wound-induced suberization was found to have a preference for feruloyl (*o*-methoxyphenol)-substituted substrates, in paralleling those that accumulate in tubers during wound healing (Espelie and Kolattukudy 1985; Bernards et al. 1999). A scaffolding of NADPH-dependent oxidases and peroxidases, as recently described for the precise lignification of the Casparian strips in the endodermis (Lee et al. 2013), may exist in suberizing tissues.

Regulation of suberin biosynthesis

As described above, suberin deposition is restricted to very specific cell types and is induced by various abiotic and biotic stresses. The expression patterns of suberin biosynthetic genes closely match these sites and conditions of suberin deposition, indicating that suberin biosynthesis is tightly controlled at the level of transcription. However, not much progress has yet been made in understanding the mechanisms governing this regulation, for example, the identity of transcription factors directly controlling the transcriptional regulation of suberin biosynthetic genes.

Arabidopsis MYB41 was recently reported to ectopically induce suberin when stably overexpressed in leaves of *Arabidopsis* or transiently overexpressed for 6 days in leaves of *Nicotiana benthamiana* (Kosma et al. 2014). This induction included the formation of suberin-like lamellae in the leaf cell walls of both plant species. Myb41-induced production of suberin is accompanied by substantially increased levels of all known suberin biosynthetic genes in the overexpressing tissues. Additionally, lignin is induced in the MYB41-overexpressing leaves with correspondingly increased levels of phenylpropanoid biosynthetic genes. This reveals a regulatory link between the deposition of aliphatic suberin and lignin or a lignin-like polyphenolic domain. Strikingly, leaf epidermal cells overexpressing MYB41 and consequently possessing suberin-like lamellae on the inner face of the cell wall have an intact cuticle on the outer surface of the cell wall. The gene expression levels of cuticle biosynthetic genes are not altered much by MYB41 overexpression. Additionally, despite the chemical similarities between suberin and cuticle, the polymers are still directed to different positions in the cell wall when

deposited in the same cell type. It was also found in this study that the *MYB41* gene is not expressed in roots during the normal course of development, but rather induced specifically in the endodermis in response to abiotic stresses, such as high salt concentrations. Thus, MYB41 appears to be a regulator of suberin only under stress conditions, although whether this occurs by direct binding to the promoters of suberin genes is not presently known. Other transcription factors must, therefore, control the developmental deposition of suberin during non-stress conditions, but their identities are currently unknown. Identifying additional suberin transcription factors thus remains a major goal in suberin research. Knowledge of these master regulatory factors would allow for the genetic manipulation of the entire suberin biosynthetic apparatus, potentially allowing for the generation of enhanced apoplastic barriers at important plant tissue and plant–environment interfaces, which may lead to more stress resistant plants.

Conclusions

Understanding suberin biosynthesis, deposition and regulation is important, as this knowledge may help in generating crops with superior barrier properties and thus higher stress tolerance. There has been considerable progress in our understanding of suberin biosynthesis in recent years. Despite these advances, important aspects of suberin synthesis remain obscure. Central questions include how the suberin monomers are trafficked, the extent of extracellular assembly and attachment to the cell wall, the mechanisms of polymerization of suberin in the cell wall, and the regulation of suberin biosynthesis.

Author contribution statement SJV, CD, FD, and OR all participated in the writing of the manuscript.

Acknowledgments We thank Nayana de Silva and Jessica White of Carleton University for valuable comments on the manuscript. SJV and OR were supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. CD was supported by a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Agrawal V, Kolattukudy P (1978) Purification and characterization of a wound-induced omega-hydroxy fatty acid:NADP oxidoreductase from potato tuber disks (*Solanum tuberosum* L.). Arch Biochem Biophys 191:452–465
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE (2009) Root

- suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. *PLoS Genet* 5:e1000492
- Beisson F, Koo AJK, Ruuska S, Schwender J, Pollard M, Thelen JJ, Paddock T, Salas JJ, Savage L, Milcamps A, Mhaske VB, Cho Y, Ohlrogge JB (2003) Arabidopsis genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiol* 132:681–697
- Beisson F, Li-Beisson Y, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB (2007) The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in the seed coat and root of Arabidopsis. *Plant Cell* 19:351–368
- Beisson F, Li-Beisson Y, Pollard M (2012) Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 15:329–337
- Bernards MA (2002) Demystifying suberin. *Can J Bot* 80:227–240
- Bernards MA, Lewis NG (1992) Alkyl ferulates in wound-healing potato-tubers. *Phytochemistry* 31:3409–3412
- Bernards MA, Lopez ML, Zajack J, Lewis NG (1995) Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin. *J Biol Chem* 270:7382–7386
- Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A, Plourde GL (1999) Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* 121:135–145
- Boher P, Serra O, Soler M, Molinas M, Figueras M (2013) The potato suberin feruloyl transferase FHT which accumulates in the phellogen is induced by wounding and regulated by abscisic and salicylic acids. *J Exp Bot* 64:3225–3236
- Choi H, Jin JY, Choi S, Hwang JU, Kim YY, Suh MC, Lee Y (2011) An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. *Plant J* 65:181–193
- Compagnon V, Diehl P, Benveniste I, Meyer D, Schaller H, Schreiber L, Franke R, Pinot F (2009) CYP86B1 is required for very long chain ω -hydroxyacid and α,ω -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant Physiol* 150:1831–1843
- Dean BB, Kolattukudy PE (1977) Biochemistry of suberization—incorporation of [1-C-14] oleic acid and [1-C-14] acetate into aliphatic components of suberin in potato tuber disks (*Solanum tuberosum*). *Plant Physiol* 59:48–54
- Domergue F, Vishwanath SJ, Joubès J, Ono J, Lee J, Bourdon M, Alhattab R, Lowe C, Pascal S, Lessire R, Rowland O (2010) Three Arabidopsis fatty acyl-CoA reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiol* 153:1539–1554
- Edstam MM, Edqvist J (2014) Involvement of GPI-anchored lipid transfer proteins in the development of seed coats and pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 152:32–42
- Edstam MM, Blomqvist K, Eklöf A, Wennergren U, Edqvist J (2013) Coexpression patterns indicate that GPI-anchored non-specific lipid transfer proteins are involved in accumulation of cuticular wax, suberin and sporopollenin. *Plant Mol Biol* 83:625–649
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2003) Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *J Plant Growth Regul* 21:335–351
- Espelie KE, Kolattukudy PE (1985) Purification and characterization of an abscisic acid-inducible anionic peroxidase associated with suberization in potato (*Solanum tuberosum*). *Arch Biochem Biophys* 240:539–545
- Espelie KE, Sadek NZ, Kolattukudy PE (1980) Composition of suberin-associated waxes from the subterranean storage organs of seven plants, parsnip, carrot, rutabaga, turnip, red beet, sweet potato and potato. *Planta* 148:468–476
- Franke R, Schreiber L (2007) Suberin—a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr Opin Plant Biol* 10:252–259
- Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L (2005) Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues—a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66:2643–2658
- Franke R, Hofer R, Briesen I, Emsermann M, Efremova N, Yephremov A, Schreiber L (2009) The *DAISY* gene from Arabidopsis encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza-micropyle region of seeds. *Plant J* 57:80–95
- Franke R, Dombrink I, Schreiber L (2012) Suberin goes genomics: use of a short living plant to investigate a long lasting polymer. *Front Plant Sci* 3:1–8
- Gandini A (2008) Polymers from renewable resources: a challenge for the future of macromolecular materials. *Macromolecules* 41:9491–9504
- Girard AL, Mounet F, Lemaire-Chamley M, Gaillard C, Elmorjani K, Vivancos J, Runavot JL, Quemener B, Petit J, Germain V, Rothan C, Marion D, Bakan B (2012) Tomato GDSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *Plant Cell* 24:3119–3134
- Gou J-Y, Yu X-H, Liu C-J (2009) A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18855–18860
- Graça J, Pereira H (2000a) Suberin structure in potato periderm: glycerol, long-chain monomers, and glyceryl and feruloyl dimers. *J Agri Food Chem* 48:5476–5483
- Graça J, Pereira H (2000b) Methanolysis of bark suberins: analysis of glycerol and acid monomers. *Phytochem Anal* 11:45–51
- Graça J, Santos S (2006) Glycerol-derived ester oligomers from cork suberin. *Chem Phys Lipids* 144:96–107
- Haslam TM, Mañas-Fernández A, Zhao L, Kunst L (2012) Arabidopsis ECERIFERUM2 is a component of the fatty acid elongation machinery required for fatty acid extension to exceptional lengths. *Plant Physiol* 160:1164–1174
- Höfer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R (2008) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *J Exp Bot* 59:2347–2360
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W (2001) The exodermis—a variable apoplastic barrier. *J Exp Bot* 52:2245–2264
- Hosmani PS, Kamiya T, Danku J, Naseer S, Geldner N, Guerinet ML, Salt DE (2013) Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:14498–14503
- Huang MD, Chen TL, Huang AH (2013) Abundant type III lipid transfer proteins in Arabidopsis tapetum are secreted to the locule and become a constituent of the pollen exine. *Plant Physiol* 163:1218–1229
- Kim H, Lee SB, Kim HJ, Min MK, Hwang I, Suh MC (2012) Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 (LTPG2) and overlapping function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in cuticular wax export or accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53:1391–1403
- Kolattukudy PE (1980) Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208:990–1000
- Kolattukudy PE (1981) Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annu Rev Plant Physiol* 32:539–567
- Kolattukudy PE (2001) Polyesters in higher plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 71:1–49
- Kosma DK, Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M (2012) Identification of an Arabidopsis fatty alcohol:caffeoyl-Coenzyme A acyltransferase required for the synthesis of alkyl hydroxycinnamates in root waxes. *Plant Physiol* 160:237–248
- Kosma DK, Murmu J, Razeq FM, Santos P, Bourgault R, Molina I, Rowland O (2014) AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis

- and assembly in multiple plant species and cell types. *Plant J* 80:216–229
- Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bar S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Metraux JP, Yephremov A (2006) The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:321–339
- Landgraf R, Smolka U, Altmann S, Eschen-Lippold L, Senning M, Sonnwald S, Weigel B, Frolova N, Strehmel N, Hause G, Scheel D, Böttcher C, Rosahl S (2014) The ABC transporter ABCG1 is required for suberin formation in potato tuber periderm. *Plant Cell* 26:3403–3415
- Lee SB, Jung SJ, Go YS, Kim HU, Kim JK, Cho HJ, Park OK, Suh MC (2009) Two *Arabidopsis* 3-ketoacyl CoA synthase genes, KCS20 and KCS2/DAISY, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *Plant J* 60:462–475
- Lee Y, Rubio MC, Alassimone J, Geldner N (2013) A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* 153:402–412
- Li Y, Beisson F, Koo AJ, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J (2007a) Identification of acyltransferases required for cutin synthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18339–18344
- Li Y, Beisson F, Ohlrogge J, Pollard M (2007b) Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin associated acyltransferase. *Plant Physiol* 144:1267–1277
- Li-Beisson Y, Shorosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, DeBono A, Durrett TD, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J (2013) Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* 11:e0161
- Lü S, Song T, Kosma DK, Parsons EP, Rowland O, Jenks MA (2009) *Arabidopsis CER8* encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant J* 59:553–564
- Matzke K, Reiderer R (1991) A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. *Planta* 185:233–245
- McFarlane HE, Watanabe Y, Yang W, Huang Y, Ohlrogge J, Samuels AL (2014) Golgi- and trans-Golgi network-mediated vesicle trafficking is required for wax secretion from epidermal cells. *Plant Physiol* 164:1250–1260
- Meyer CJ, Peterson CA, Bernards MA (2011) A comparison of suberin monomers from the multiseriate exodermis of *Iris germanica* during maturation under differing growth conditions. *Planta* 233:773–786
- Millar AA, Kunst L (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J* 12:121–131
- Moire L, Schmutz A, Buchala A, Yan B, Stark RE, Ryser U (1999) Glycerol is a suberin monomer: new experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiol* 119:1137–1146
- Molina I (2010) Biosynthesis of plant lipid polyesters. The AOCs lipid library. <http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/polyesters/index.htm>. Accessed July 2014
- Molina I, Bonaventure G, Ohlrogge J, Pollard M (2006) The lipid polyester composition of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* seeds. *Phytochemistry* 67:2597–2610
- Molina I, Ohlrogge J, Pollard M (2008) Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 53:437–449
- Molina I, Beisson-Li Y, Beisson F, Ohlrogge J, Pollard M (2009) Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-CoA transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiol* 151:1317–1328
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C, Geldner N (2012) Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:10101–10106
- Nawrath C (2002) The biopolymers cutin and suberin. *Arabidopsis Book* 1:e0021
- Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L (2013) Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 11:e0167
- Pascal S, Bernard A, Sorel M, Pervent M, Vile D, Haslam RP, Napier JA, Lessire R, Domergue F, Joubès J (2013) The *Arabidopsis cer26* mutant, like the *cer2* mutant, is specifically affected in the very long chain fatty acid elongation process. *Plant J* 73:733–746
- Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels LA (2004) Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* 306:702–704
- Pinto PCRO, Sousa AF, Silvestre AJD, Neto CP, Gandini A, Eckerman C, Holmbom B (2009) *Quercus suber* and *Betula pendula* outer barks as renewable sources of oleochemicals: a comparative study. *Ind Crops Prod* 29:126–132
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13:236–246
- Ranathunge K, Schreiber L (2011) Water and solute permeabilities of *Arabidopsis* roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *J Exp Bot* 62:1961–1974
- Ranathunge K, Schreiber L, Franke R (2011) Suberin research in the genomics era—new interest for an old polymer. *Plant Sci* 180:399–413
- Razeq FM, Kosma DK, Rowland O, Molina I (2014) Extracellular lipids of *Camelina sativa*: characterization of chloroform-extractable waxes from aerial and subterranean surfaces. *Phytochemistry* 106:188–196
- Rowland O, Domergue F (2012) Plant fatty acyl reductases: enzymes generating fatty alcohols for protective layers with potential for industrial applications. *Plant Sci* 193–194:28–38
- Samuels L, Kunst L, Jetter R (2008) Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu Rev Plant Biol* 59:683–707
- Schnurr J, Shockey J, 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 Plant Sci* 15:546–553
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K (2005) Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpiration. *Planta* 220:520–530
- Serra O, Soler M, Hohn C, Franke R, Schreiber L, Prat S, Molinas M, Figueras M (2009a) Silencing of StKCS6 in potato periderm leads to reduced chain lengths of suberin and wax compounds and increased peridermal transpiration. *J Exp Bot* 60:697–707
- Serra O, Soler M, Hohn C, Sauveplane V, Pinot F, Franke R, Schreiber L, Prat S, Molinas M, Figueras M (2009b) CYP86A33-targeted gene silencing in potato tuber alters suberin composition, distorts suberin lamellae, and impairs the periderm's water barrier function. *Plant Physiol* 149:1050–1060
- Serra O, Hohn C, Franke R, Prat S, Molinas M, 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. *Plant J* 62:277–290
- Shiono K, Ando M, Nishiuchi S, Takahashi H, Watanabe K, Nakamura M, Matsuo Y, Yasuno N, Yamanouchi U, Fujimoto M, Takanashi H, Ranathunge K, Franke RB, Shitan N, Nishizawa NK, Takamura I, Yano M, Tsutsumi N, Schreiber L, Yazaki K, Nakazono M, Kato K (2014) RCN1/OsABCG5, an ATP-

- binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). *Plant J* 80:40–51
- Shockey JM, Fulda MS, Browse JA (2002) Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol* 129:1710–1722
- Silva S, Sabino M, Fernandes E, Correló V, Boesel L, Reis R (2005) Cork: properties, capabilities and applications. *Int Mater Rev* 50:345–365
- Soler M, Serra O, Molinas M, Huguet G, Fluch S, Figueras M (2007) A genomic approach to suberin biosynthesis and cork differentiation. *Plant Physiol* 144:419–431
- Soliday CL, Kolattukudy PE, Davis RW (1979) Chemical and ultrastructural evidence that waxes associated with the suberin polymer constitute the major diffusion barrier to water vapor in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Planta* 146:607–614
- Stark RE, Sohn W, Pacchiano RA, Albashir M, Garbow JR (1994) Following suberization in potato wound periderm by histochemical and solid-state C-13 nuclear-magnetic-resonance methods. *Plant Physiol* 104:527–533
- Thomas R, Fang X, Ranathunge K, Anderson TR, Peterson CA, Bernards MA (2007) Soybean root suberin: anatomical distribution, chemical composition, and relationship to partial resistance to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol* 144:299–311
- Vishwanath SJ, Kosma DK, Pulsifer IP, Scandola S, Pascal S, Joubès J, Dittrich-Domergue F, Lessire R, Rowland O, Domergue F (2013) Suberin-associated fatty alcohols in *Arabidopsis thaliana*: distributions in roots and contributions to seed coat barrier properties. *Plant Physiol* 163:1118–1132
- Yadav V, Molina I, Ranathunge K, Castillo IQ, Rothstein SJ, Reed JW (2014) ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in Arabidopsis. *Plant Cell* 26:3569–3588
- Yang W, Pollard M, Li-Beisson Y, Beisson F, Feig M, Ohlrogge J (2010) A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with *sn*-2 preference and phosphatase activity producing 2-monooacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:12040–12045
- Yang W, Simpson JP, Li-Beisson Y, Beisson F, Pollard M, Ohlrogge JB (2012) A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in Arabidopsis: substrate specificity, *sn*-2 preference, and evolution. *Plant Physiol* 160:638–652
- Yeats TH, Laetitia BB, Martin Viart HMF, Isaacson T, He Y, Zhao L, Matas AJ, Buda GJ, Domozych SD, Clausen MH, Rose JKC (2012) The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chem Biol* 8:609–611
- Yeats TH, Huang W, Chatterjee S, Viart HM, Clausen MH, Stark RE, Rose JK (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. *Plant J* 77:667–675
- Zeier J, Schreiber L (1998) Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledonous species: chemical composition in relation to fine structure. *Planta* 206:349–361

Plant surface lipids and epidermis development

Camille Delude, Steven Moussu, Jérôme Joubès, Gwyneth Ingram and Frédéric Domergue

ABSTRACT

The epidermis has a strategic position at the interface between the plant and the environment. In order to control exchanges with the environment as well as to protect the plant from external threats, the epidermis synthesises and secretes surface lipids to form a continuous, transparent and hydrophobic layer known as the cuticle. Cuticle formation is a strictly epidermal property in plants and all aerial epidermal cells produce some sort of cuticle on their surface. Conversely, all cuticularized plant surfaces are of epidermal origin. This seemingly anodyne observation has surprisingly profound implications in terms of understanding the function of the plant cuticle, since it underlies in part, the difficulty of functionally separating epidermal cell fate specification from cuticle biogenesis.

Keywords : Cuticle, epidermis, regulation, waxes, development, Arabidopsis.

F. Domergue (✉) - C. Delude - J. Joubès

Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, CNRS / Université de Bordeaux, 71 av. E. Bourleaux, CS 20032, 33140, Villenave d'Ornon, France.

e-mail: frederic.domergue@u-bordeaux.fr

S. Moussu - G. Ingram

Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, UMR 5667, CNRS / INRA / UCBL / ENS Lyon, 46, allée d'Italie, 69364, Lyon, France.

INTRODUCTION

The lipid metabolism of the epidermis is highly specialized because this cell monolayer is located at the interface between the plant and its surrounding environment. Due to this highly strategic positioning, one important function of the epidermis is to form a hydrophobic barrier over aerial surfaces to permit the regulation of water and gas exchange as well as protecting the plant from both biotic and abiotic stresses. In order to achieve this role, the epidermis synthesises and secretes surface lipids to form a continuous transparent and hydrophobic layer on the outside of leaves, stems and flowers. In contrast to the lipid metabolism of most cortical cells, which is mainly channelled towards the generation of thylakoid membranes for photosynthesis, that of epidermal cells is therefore principally devoted to the biosynthesis of surface lipids.

All aerial parts of the plants as well as parts of the root system are delimited by a layer of epidermal cells. Above ground epidermal cells include a “basal” cell type, known as pavement cells, which are abundant and show a highly organ dependent morphology, as well as trichomes, also known as leaf hairs, and the guard cells of stomata. Underground, young primary roots possess an epidermis layer, but this tissue, together with the endodermis and the cortex, disappears during secondary development, when a periderm originating from the pericycle develops. Aerial and mature root surfaces are covered by lipid layers known as the cuticle and suberin, respectively. Over the last 20 years, the biosynthetic pathways producing the lipids of these apoplastic diffusion barriers have been well described, especially in the plant model *Arabidopsis thaliana*, where many mutants have been isolated and characterised [1]. None of the suberin mutants identified to date have been associated with root epidermal or peridermal defects, but this may be due to technical difficulties in studying the precise morphology of these underground tissues. In contrast, the fact that several mutants affected in their cuticle composition and/or content also display defects in epidermal development, such as organ fusions, abnormal trichome morphology or decreased stomatal index, suggests a link between surface lipids and the differentiation of epidermal cells [2]. Furthermore, two studies have highlighted a potential role of the epidermis in restricting plant growth [3,4]. Interestingly, cutinase treatments in rapidly growing internodes of deepwater rice suggest that the cuticle acts as a growth-limiting structure, and could thus be a key epidermal element in keeping the underlying parenchyma cells under compression [5].

In this chapter, we will present our current knowledge of the biosynthesis of surface lipids and describe in more detail how certain mutants with defects in their surface lipid content and/or composition are also affected in their epidermal development. We will then

discuss the complex transcriptional regulation of plant surface lipid biosynthesis and epidermis development. Finally, we will take advantage of recent advances in our understanding of the establishment of the protocuticle in *Arabidopsis* embryos to present the inter-cellular signaling pathway monitoring the formation of a functional embryonic cuticle and enabling the physical separation of the embryo from the endosperm.

BIOSYNTHESIS OF THE CUTICULAR BARRIER BY EPIDERMAL CELLS

The plant cuticle is a continuous lipophilic layer, of which the main roles are to limit non-stomatal water loss, control gaseous exchanges, protect the plant from both biotic and abiotic environmental stresses, provide mechanical strength, and prevent organ fusion during development. The cuticle is composed of a fatty acid derived polymer, known as cutin, which is impregnated with, and covered by, a mixture of very long-chain (VLC) aliphatic compounds, called cuticular waxes [6].

Cuticular waxes consist of a mixture of very-long chain aliphatic compounds, containing from 22 to 48 carbon atoms, which are produced in the endoplasmic reticulum (ER) [7]. Their biosynthesis relies on the elongase complex, which produces VLC-acyl-CoAs (and free VLC fatty acids; VLCFAs), the alcohol-forming pathway, which converts these into even-numbered primary alcohols and alkyl esters, and the alkane-forming pathway, which yields aldehydes and odd-numbered alkanes, secondary alcohols and ketones (Figure 1). The cutin polymer is mainly made of interesterified hydroxy fatty acids, but also contains some glycerol and dicarboxylic acids, as well as phenolic compounds. Cutin biosynthesis starts in the ER where hydroxyl fatty acids are produced and esterified to mono-acyl glycerol (MAG), and ends in the apoplast where polymerization takes place (Figure 1). A key step in surface lipid biosynthesis is therefore the transport of the cutin monomers and cuticular waxes across both the plasma membrane and the hydrophilic cell wall (Figure 1).

The fatty acid elongase complex produces very long chain fatty acids. Free C₁₆ and C₁₈ fatty acids, issuing from *de novo* fatty acid synthesis in the plastids, are used as precursors for fatty acid elongation [8]. Recent reports revealed the important role of at least three Long-Chain-Acyl-CoA Synthetase (LACS) iso-enzymes, which activate free fatty acids into CoA thioesters, in *Arabidopsis* wax synthesis [9-11]. Each cycle of the ER-bound multi-enzymatic fatty acid elongase (FAE) consists of four successive reactions that generate an acyl-chain extended by two carbons. The reactions involve 1) formation of β -ketoacyl-CoA by

condensation of malonyl-CoA with an a C_n -acyl-CoA catalysed by a β -ketoacyl-CoA synthase (KCS), 2) reduction to β -hydroxyacyl-CoA by a β -ketoacyl-CoA reductase (KCR), 3) dehydration to enoyl-CoA by a β -hydroxyacyl-CoA dehydratase (HCD) and 4) a final reduction by a enoyl-CoA reductase (ECR) yielding a C_{n+2} -acyl-CoA. Biochemical studies and the co-existence of twenty-one putative KCS-encoding genes annotated in the Arabidopsis genome [12], led to the idea that multiple elongase complexes with distinct chain-length specificities perform sequential and parallel reactions to produce the wide range of chain-lengths found in plant VLCFAs [13].

Over the last decade, major advances in understanding VLCFA synthesis in yeast have permitted the identification of the ECR, KCR and HCD enzymes of Arabidopsis. Sequence similarity searches with ECR from yeast revealed one single locus in Arabidopsis. Complementation of the Arabidopsis *cer10* (*cer* standing for *eceriferum*, i.e. wax-less) mutant by expression of *AtECR* demonstrated that *CER10* encodes a functional ECR activity [14]. Likewise, two Arabidopsis loci were identified as encoding potential HCDs and two loci as encoding potential KCRs [15,16]. Surprisingly, complementation assays in corresponding yeast mutants revealed that only *PASTICCINO2* encodes a functional HCD and only *KCR1* has KCR activity. Although several *KCS* mutants show defects in their cuticular waxes, *CER6* is the only one considered to be strictly wax-specific [17,18], indicating a preponderant role in wax synthesis. The recent functional characterization of *CER2* and related proteins suggests that these proteins are necessary for elongation up to C_{34} , even though the precise function of these proteins remains to be elucidated [19-21].

The VLC-acyl-CoAs produced by the FAEs are either used as precursors in the alcohol- and alkane-forming pathways (below), or simply converted by thioesterase(s) to free VLCFAs, a significant quantity of which are detected in surface lipids.

The alcohol forming pathway produces primary alcohols and alkyl esters. The first biochemical studies of primary alcohol formation suggested a two-step reaction in which fatty acyl reductase (FAR) reduces VLCFAs to aldehydes, which are further reduced to primary alcohol by an aldehyde reductase [22]. However, biochemical studies on jojoba seeds and pea leaves, as well as expression of genes encoding FAR alcohol-forming activities in heterologous systems, revealed that a single enzyme produced fatty alcohols, with the potential intermediate aldehyde remaining bound to the enzyme [23]. In Arabidopsis, the *cer4* mutant shows a severe reduction of primary alcohols and wax esters, suggesting that *CER4* could play a role in this biosynthetic pathway [24]. Expression of *CER4* in yeast resulted in

the production of VLC-primary alcohols with C₂₄ and C₂₆ chain lengths, confirming the FAR activity of CER4 [25]. However, the activity of CER4 on C₂₈ and C₃₀ fatty acids has never been demonstrated, indicating that another FAR or functionally related enzyme, is likely responsible for C₃₀ primary alcohol formation [23]. Detailed analysis of wax ester chain-lengths from the stems of Arabidopsis *cer4* mutants indicated that primary alcohols formed by CER4 act as substrates for subsequent alkyl ester formation [26]. Wax Synthase (WS) enzymes catalyze the esterification of primary alcohols with acyl-CoAs in higher plants, mammals and bacteria [27-29]. In Arabidopsis, sequence similarity with jojoba seed WS and bi-functional WS/Diacylglycerol acyltransferases (DGATs) from *Acinetobacter calcoaceticus*, revealed 12 and 11 similar sequences respectively. Analysis of a putative WS/DGAT encoding gene (*WSD1*), highly expressed in the epidermis, subsequently confirmed its involvement as the major WS in cuticular wax synthesis [30].

The alkane forming pathway produces aldehydes and odd-numbered alkanes, secondary alcohols and ketones. Analyses of *cer* mutants and biochemical experiments established a putative alkane forming pathway in which VLCFAs are used as precursors to form alkanes via a potential aldehyde intermediate [7]. Several *cer* mutants with a decreased alkane load have been biochemically characterized [24]. The *cer3* mutant showed a dramatic reduction in aldehydes, alkanes, secondary alcohols and ketones, while the *cer1* mutant exhibits a drastic decrease in alkanes and a near abolition of secondary alcohol and ketone production, accompanied by a slight increase in aldehyde content [31-34]. It has been proposed from these phenotypes that *CER3* could encode a potential VLCFA reductase producing aldehydes, whereas *CER1* could encode the alkane-forming enzyme, catalyzing the presumed decarbonylation of aldehydes to alkanes. Consistent with a role in wax associated processes, the expression of *CER1* and *CER3* was found to be restricted to the aerial epidermis, and to be up-regulated in drought conditions when wax synthesis is particularly active [33,34]. Additionally, wax analyses of *CER1* overexpressors revealed a specific increase in alkanes with chain-lengths between 27 and 33 carbon atoms, consistent with *CER1* encoding an alkane-forming activity with strict substrate specificity for compounds containing more than 27 carbon atoms [34]. Recently, the proof that *CER1* and *CER3* act as an enzymatic complex catalyzing the synthesis of VLC-alkanes was provided by co-expression of the two proteins in yeast [35].

Whereas alkanes are the end products of the alkane-forming pathway in Arabidopsis leaves, they can also be further modified by consecutive oxidation to produce secondary

alcohols, and subsequently ketones, in stems. By looking for genes up-regulated in the epidermis and encoding proteins potentially involved in lipid oxidation, a cytochrome P₄₅₀ encoding gene, *CYP96A15*, was pinpointed as a candidate for a catalytic role in secondary alcohol and ketone formation [36]. Its ectopic expression resulted in the production of secondary alcohols and ketones in leaves, suggesting that *CYP96A15* functions as a mid-chain alkane hydroxylase (MAH1).

Acyl-oxidation, esterification to glycerol and extracellular polymerization generate the insoluble cutin polymer. Although the major steps involved in the biosynthesis of cutin have been elucidated over the last 10 years, its exact three-dimensional structure remains unknown. Cutin isolation followed by depolymerization reactions have shown that it is a polyester mostly composed of C16 and C18 ω -hydroxyacid, polyhydroxyacid and α,ω -dicarboxylic acid (DCA), as well as of glycerol and small amounts of phenylpropanoids [37]. In *Arabidopsis*, the cutin of leaves and stems is enriched in DCA, while that of flowers is dominated by polyhydroxyacids, suggesting that the composition of cutin varies between different organs of the same plant species [38,39]. The oxidative reactions converting fatty acids to ω -hydroxyacids are catalyzed by members of the CYP86 cytochrome P450 family. The characterization of the *lcr* and *att1* mutants showed that LCR (*CYP86A8*) and ATT1 (*CYP86A2*) are the two major cytochrome P450s involved in the acyl-oxidation of cutin precursors in *Arabidopsis* leaves and stems [40,41]. The mechanism underlying further conversion to DCA is still unclear but could involve oxydoreductases such as HOTHREAD (HTH), even though HTH is not specifically expressed in the epidermis [42-43]. In *Arabidopsis* flowers, *CYP86A4* and *CYP77* respectively are the ω -hydroxylase and in-chain hydroxylase responsible for the formation of 10,16-dihydroxypalmitate, the main floral cutin precursor [44]. Although the sequential order of reactions is still a matter of debate, substrate specificities tested *in vitro* suggest that fatty acyl oxidation is most probably followed by acyl activation before transfer to glycerol.

Two long chain acyl-CoA acyltransferases, LACS1 and LACS2 have been shown to be important for cutin synthesis in *Arabidopsis* [9,45]. Once activated as acyl-CoAs, hydroxylated fatty acyls are most probably esterified to the *sn*-2 position of glycerol by glycerol-3-phosphate:acyl-CoA acyltransferases such as GPAT4 and GPAT8 in leaves and stems [46] and GPAT6 in flowers [44]. These enzymes also possess phosphatase activity so that end products are 2-monoacylglycerol instead of 2-acyl-lysophosphatidic acids. This additional activity could be instrumental in the separation of glycerolipid precursors for cutin

and membrane lipid biosynthesis [48,49]. Incorporation of phenylpropanoids into the cutin polyester requires BAHD acyltransferases such as Deficient in Cutin Ferulate (DCF) and possibly Defective in Cuticular Ridges (DCR) which transfer ferulic acid to ω -hydroxyacids [49,50].

Using fluorescent fusion proteins, all the reactions described above, with the exception of those catalyzed by BAHD-type proteins which could be cytosolic, were shown to take place in the endoplasmic reticulum. Thus precursors must be transported across the plasma membrane and through the cell wall (see below) before polymerization occurs. Although this process is the least well understood part of cutin biosynthesis, the recent identification of an extracellular tomato cutin synthase (GDSL1/CD1), has provided a major step forward [51-52]. The *cd1* mutant shows a dramatic reduction in polymerized cutin, and *in vitro* assays showed that CD1 catalyzes the formation of polyester oligomers from 2-monoacylglycerol [52]. Loss of function of Li-tolerant lipase 1 (LTL1), which encodes an Arabidopsis ortholog of CD1, causes typical characteristics of cutin mutants, while LTL1 can also catalyze cutin polymerization *in vitro* [53].

ABC transporters and LTPs are involved in the export of precursors to the cuticular matrix. Although most cuticle biosynthetic enzymes have been shown to be localized in the ER, little is known about the intracellular trafficking of the cuticular precursors before their export out of epidermal cells. Nevertheless, the recent use of mutants defective in vesicle trafficking and protein secretion suggests that the transfer of these hydrophobic molecules through the hydrophilic cytoplasm involves vesicles, and that they transit through the ER-Golgi interface and the trans-Golgi network to deliver cargo to the plasma membrane (PM) [54]. Once the cuticle components have reached the PM, their export is carried out by ABC transporters. The gene encoding the first ABC transporter identified as required for wax transport was found to be allelic to *CER5*, and was named *ABCG12* [55]. A search for ABC protein-encoding genes with an expression pattern similar to *ABCG12* revealed *ABCG11* as a potential candidate for a role in wax export [56,57]. The *abcg11* mutant and the double mutant *abcg11 cer5* show similar wax composition, suggesting that ABCG11 and ABCG12 act in the same pathway or ABC transporter unit. Furthermore, *abcg11* showed organ fusions, defects in cuticle permeability and reduced cutin load, indicating that ABCG11 is also involved in cutin monomer export in vegetative organs [57], as well as in flowers, siliques and seedcoats [58]. However, residual export of waxes and cutin monomers onto the plant surface in the absence of ABCG11 and ABCG12 indicates that

other ABC transporters might also export these compounds. Interestingly, ABCG11 and ABCG12 are half transporters, and ABCG11/ABCG12 heterodimers have a function in wax export, while ABCG11 can also homodimerize or heterodimerize with other unknown component(s) to transport cutin monomers [59]. Recently, two other ABCG transporters have been characterized. ABCG13, which is closely related to ABCG11 and ABCG12, contributes to cutin formation in flowers [60]. In contrast, ABCG32/PEC1, which is a full length transporter, is required for hydroxylated fatty acid transport in leaves and flowers [61].

Based on transcriptome analysis of Arabidopsis stems and stem epidermal cells, seven candidate LTPs, which could play a role in wax and/or cutin monomer transport were isolated [62]. The analysis of the cuticle phenotype of *ltpg1* and *ltpg2* mutants suggests that both of these glycosylphosphatidylinositol-anchored LTPs (LTPGs) could be involved in cuticle formation ([63-65]. However, the very specific transport shown to be affected in *ltpg1* or *ltpg2* mutants has given rise to the proposition that multiple specialized LTPs, possibly with overlapping functions, are required to deliver the whole diversity of cuticle compounds to the epidermal surface.

CUTICLE MUTANTS WITH EPIDERMAL DEFECTS

As illustrated above, numerous Arabidopsis lines with mutations in genes involved in cuticle metabolism have been characterized by reverse and forward genetics. Besides their defects in surface lipid composition and / or content, several also present abnormalities in the development of their epidermis, the most common being post-genital organ fusions. The severity of these phenotypes seems to vary dramatically depending on the enzymatic step affected, as summarized in Table 1.

Mutations in genes of the fatty elongation complex affect epidermal development to various degrees. Loss of KCR or HCD, two of the three activities of the elongation complex that are encoded by a single functional gene, causes embryo lethality. Corresponding knock-down mutants (*AtKCR-RNAi* lines or *pas2-1*, a weak allele of *HCD*) display strong developmental defects, such as dwarfism, spontaneous organ fusions and abnormal epidermal cell morphology. For example, *pas2-1* lines show ectopic cell divisions and loss of cell adhesion [66], while *AtKCR-RNAi* lines have abnormally short trichomes with fused branches, and produce swollen pavement cells with adhesion defects [16]. Knock-out mutants in the other activity of the elongation complex encoded by a single functional gene (*ECR*) are viable

because of a partial functional complementation by a yet unidentified enzyme. Nevertheless, *ecr* mutants exhibit severe morphological abnormalities such as size reduction in aerial organs, and flower buds with fused tissues [14]. However, because the elongation complex is also necessary for the production of the VLCFAs present in sphingolipids, it is not possible to distinguish whether epidermal defects are linked to abnormal surface lipid composition or to impaired sphingolipid metabolism and/or plasma membrane abnormality.

Among the *KCS* multigene family, loss of function alleles of four genes show epidermal abnormalities, amongst which *kcs10/fiddlehead/fdh* is the most strongly affected. *fdh* mutant lines are dwarf, show fusions in both floral organs and leaves, have an increased cuticular permeability, allow pollen to germinate on leaves, and show a 50% reduction in trichome density [67,68]. Although *FDH* is specifically expressed in the epidermis and appears to affect epidermal cell interactions [69], no strong alterations in the lipid composition of *fdh* has been reported, even though mutant cell walls are enriched in one particular C24-VLCFA [67]. Similarly, the *kcs13/hic* mutant shows no major modification in its lipid profiles, but exhibits a 20-25% increase in stomatal index at elevated atmospheric CO₂ concentrations [70]. Consistent with this phenotype, *KCS13* is specifically expressed in guard cells. *KCS6/CER6/CUT1* is the most important condensing enzyme for cuticular wax biosynthesis since *cer6* mutants show a 48 and 81 % decreases in leaf and stem wax loads, respectively [17,71]. Despite these dramatic reductions in wax load, *cer6* mutants do not display any major epidermal defect, with the exception of a 30% increase in stomatal index [70]. The defects observed in *kcs1* mutants depend on the relative humidity (RH) used for growth. At high RH, *kcs1-1* plants resemble wild-type segregants but have 25% fewer flowers, a 35% reduction in silique length and very thin stems. In contrast, at low RH, 2 week old seedlings are very small and have a mortality rate of over 90% [72]. Finally, no epidermal defects were reported in plants with a mutation in *KCS9* or any *CER2*-like protein, although the corresponding mutants are affected in fatty acid elongation and/or the chain length of epicuticular wax compounds [19,20,73].

Knock-out mutations in cuticular wax biosynthesis have no major epidermal defects. The *cer4* and *wsd1* mutants, which are affected in the reduction pathway producing fatty alcohols and wax esters, are phenotypically similar to wild-type plants, and show normal epidermis development [25,30]. A mutation in *CER1*, which is responsible for the synthesis of the major wax components in *Arabidopsis* (alkanes), results in conditional male sterility (at low RH) despite the fact that the pollen coat (tryphine) of the mutant looks like that of wild-

type [74]. Contradictory results have been reported concerning the stomatal index of *cer1* plants: Gray et al., [70] report an increase, but in contrast Bourdenx et al., [34] report no difference compared to wild-type, suggesting that in a *cer1* background, growth conditions could affect the development of stomata. Conversely, mutations in *CER3*, which is also involved in the biosynthesis of alkanes, cause a reduced stomatal index but also result in male sterility at low RH [32]. Depending on the study, *cer3* mutants either have no other epidermal defect [75,76], show smaller trichomes and aerial organ adhesions [33], or can even display postgenital organ fusions in leaves and flower buds [32]. Although this last study attributed fusions to a putative role for CER3 in cutin formation, lipid analysis later showed that CER3 has no role in the biosynthesis of cutin, at least in leaves [76].

Cutin mutants often present pleiotropic defects in epidermal development. In contrast to cuticular wax mutants in which development and morphology is often indistinguishable from that of wild-type plants, many cutin mutants present extremely severe phenotypes with multiple epidermal defects, especially in reproductive organs. Mutations in the ABC transporters responsible for the export of cuticle precursors best exemplify this discrepancy. The *cer5* mutant, which is affected in wax load (54% less wax on stems) but not in cutin content, does not present any visible phenotype [55,56]. In contrast, the *wbc11* mutant, which is affected in both wax and cutin loads, shows many surface defects which are typical of an abnormal epidermal development [56,57]. Mutant plants present a strong growth retardation at the vegetative stage, and multiple thin-stemmed short inflorescences at the reproductive stage (loss of apical dominance). Numerous fusion events between leaves or between leaves and flower buds are also observed in this background, as are the production of misshapen rosette leaves, an increase in permeability to solutes and the appearance of pavement cell abnormalities. In addition the production of asymmetric stomata, shorter trichomes with irregular branching and frequent trichome collapse has been reported. Finally flower morphology is affected in the *wbc11* mutant where the fertility of pollen and the functionality of stigmatic papillae are reduced, and siliques are shorter and contain fewer seeds than those of wild-type plants. Consistent with the strong expression of *ABCG13* in flowers, the *abcg13* mutant also shows inter-organ post-genital fusions in inflorescences, but shows no defects during the vegetative phase [60]. The analysis of *abcg13* flower surface lipids showed that although wax load is normal, cutin load is reduced by 50%. Petals are most strongly affected, with a loss of the typical conical shape of the epidermal cells and an absence of cuticular ridges [60]. An identical floral phenotype was observed in the *gpat6*,

cyp77a6, and *dcr* mutants, which all show a reduction in 10,16-dihydroxypalmitate, the main floral cutin precursor, of over 90% [44,50].

Although mutants with reduced floral organ cutin always show strong epidermal defects such as post genital organ fusions, phenotypes associated with a reduction in leaf cutin content can vary dramatically. For example, the *lcr* mutant has multiple developmental abnormalities whereas the *att1* mutant looks morphologically normal, although both genes are thought to code for P450 hydroxylases involved in fatty acid oxidation [40,77]. Unfortunately, lipid analyses were only conducted for *att1*, where the authors did not report any epidermal defects although the stem cutin load was decreased by 70% [77]. Similar to the situation for *lcr*, the effect of a mutation in *LACS2* on cutin content and/or composition has not been reported, even though epidermis development is strongly affected in *lacs2* mutants [45]. In particular leaf pavement cells, which are shaped like jigsaw puzzle pieces in wild-type, have fewer lobes or even collapse in *lacs2* mutants. This phenotype is reminiscent to that of *dcr* mutants, in which the pavement cell patterning is disrupted and trichomes often collapse [50]. In contrast, mutation in the *DCF* gene, encoding another BAHD, does not result in any epidermal defect even though the leaf cutin of *dcr* is devoid of ferulate. Finally, *gpat4gpat8* double mutants, containing 65% less cutin in their stems, have deformed pavement cells and stomata lacking cuticular edges, while *bdg* mutants, in which cutin load is 1.2 to 3 times higher than that of wild type, have deformed leaves with flattened trichomes that often collapse and adhere to neighboring pavement cells [78]. It should nevertheless be noted that growing conditions can apparently strongly modulate the consequences of cutin defects on epidermis development, since *lacs1lacs2* double mutants were described as unaffected in size, growth and development by Lü and coworkers [9], but severely disrupted with temporary organ fusion in flowers, by Weng and coworkers [10].

Together, these results suggest that epidermal developmental defects are related to modifications in the composition and/or content of cutin, rather than waxes. This idea is further supported by the fact that similar epidermal defects have been observed in Arabidopsis transgenic plants expressing a fungal cutinase [79] or an Arabidopsis putative cutinase [80]. In addition, the primary role of cuticular waxes is widely considered to be related to the waterproof function of the cuticle, consistent with their having a much stronger hydrophobic character than cutin monomers. In contrast, cutin monomers or derivatives have been shown to function as elicitors of plant defense suggesting that plants actively monitor cutin integrity [81,82]. Intriguingly, an increased permeability of the cuticle to pathogen-derived lipid-signals eliciting plant defenses was proposed as an explanation for the enhanced biotic

resistance observed in certain cutin-deficient mutants [83]. Similarly, Bird and Grey [2] suggested that a lipid molecule, most probably a VLCFA (or derivative) produced in guard cells, could diffuse in the cutin matrix and prevent surrounding cells from differentiating in guard cells, thereby participating in the fine-tuning of stomatal patterning. The control of epidermal cell fate by non-autonomous VLCFA-derivative signals is further supported by the *fdh* mutant which presents higher levels of a cell-wall localized C24:0 fatty acid derivative and strong developmental defects [67], as well as by the recent demonstration that synthesis of VLCFAs in the epidermis can restrict cell proliferation in the vasculature [84]. The cutin polymer could therefore function to restrict the mobility of lipid signaling molecules within the cuticle, thus fine tuning the development of the epidermis.

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF CUTICULAR LIPID BIOSYNTHESIS AND EPIDERMIS SPECIFICATION

The epidermis-specific expression of many genes involved in the biosynthesis and transport of cuticle components suggests that these processes must be under strict transcription regulation. Large-scale screens of Arabidopsis overexpressor/activation tagged lines identified the AP2/EREBP transcription factor SHN1/WIN1 as a major positive regulator of cuticle production [85,86]. Plants over expressing SHN1/WIN1, or one the two other members of this small AP2/EREBP clade (SHN2 and SHN3), display clear visual phenotypes including dwarfism, shiny leaves that curl, smaller and more shiny siliques, and flowers with affected morphology, especially in petals. In addition, the differentiation of their leaf epidermal cells was clearly altered as trichomes were less abundant and often single branched, pavement cells were enlarged, and stomatal density was decreased by two thirds [86]. The first published lipid analyses conducted on these plants indicated that their wax load was several fold increased, consistent with their shiny appearance [85,86]. However, further analyses showed that cutin production was the primary target of regulation (resulting in a 2 to 3 times higher cutin load in leaves), with *LACS2* identified as a direct target of WIN1, while wax deposition was only up-regulated in a second later phase [87].

The redundant functions of SHN1, 2 and 3 in shaping the surface and morphology of Arabidopsis flowers was shown using microRNA technology. Plants silenced simultaneously for all 3 genes displayed flowers with organs fusions and lacking the typical nanoridges on the adaxial epidermis of petals [88]. Transcriptomic analyses further showed that downstream targets are either related to cutin biosynthesis or to cell wall metabolism, suggesting that SHN

transcription factors not only regulate the deposition of cuticular lipids, but also modulate cell wall pectins and epidermal cell elongation, adhesion and separation, to prevent organ fusion. The relation between cutin metabolism and epidermal development is further supported by a study conducted on *SISHN3* in tomato. In fruits from *SISHN3*-silenced lines, a 60% decrease in cutin load was correlated with strong modification of the morphology and patterning of the fruit epidermal cells. Most interestingly, among the putative *SISHN3* target genes were several encoding transcription factors associated with epidermal cell patterning. These included *SISHN2*, the R2R3-MYB-encoding *SIMIXTA*, and three HDZIPIV genes (*SIGL2*, *SIHDG11a* and *SIANL2c*). In Arabidopsis, the MIXTA-like MYB transcription factor MYB106, which was known to regulate the formation and branching of trichomes, was recently shown to act as a positive regulator of WIN1/SHNs, supporting the link between cuticle and epidermal cell differentiation [89]. Similarly, Arabidopsis HDG1, a member of the HDZIP IV family of homeodomain transcription factors, was shown to bind the promoter of the cutin-related genes *BDG* and *FDH*, and HDG1 chimeric repressor plants were shown to have a defective cuticle resulting in leaf fusion events [90].

In Arabidopsis, the *HDZIP IV* gene family comprises 16 members, of which several have been shown to be involved in both epidermal specification and differentiation [91-100]. This gene family encodes plant-specific transcription factors which play a key role in regulating the intimately intertwined processes of epidermal fate specification and cuticle biogenesis. Loss of function of two closely related family members, *ATML1* and *PDF2*, leads to a complete loss of epidermal cell fate specification during early embryogenesis [94,99]. Conversely, the ectopic expression of *ATML1*, and/or of the closely related *HDG2* gene leads to the ectopic formation of stomata in internal positions within developing organs, suggesting that these proteins are not only necessary, but also sufficient for the specification of some epidermal cell types [100,101]. Transcriptional analyses of *ATML1* and *HDG2* ectopic expression lines show an over-expression (probably also ectopic) of other members of the *HDZIPIV* gene family, such as *PDF2*. Interestingly however, over-expression of either *ATML1* or *PDF2* specifically within the epidermis leads to a repression of the endogenous *ATML1* and *PDF2* genes during post-embryonic development, suggesting that the level of expression of these two genes, and probably of other family members, is tightly regulated by complex feedback mechanisms. In support of this hypothesis, it has been shown that *ATML1* and *PDF2* are capable of binding to their own, and each other's, promoters. Furthermore, the normal expression of the *ATML1* gene is at least in part dependent upon the presence of an L1 box, the cognate binding site for HDZIPIV proteins [98, 102-104]. Interestingly, *ATML1*

and PDF2 are capable of both homodimerization and heterodimerization *in planta*, the latter both with each other and with other HDZIPIV proteins (our unpublished results) and indeed with other transcription factor families [99,105]. Taken together, these observations suggest a complex picture in which the production of multiple different heterodimeric complexes could fine-tune both feedback regulation and target gene activation by this protein family.

Because of their important role in specifying epidermal cell fate it could be argued that the effects of altering HDZIPIV activity on cuticle composition are largely indirect. Nonetheless, several pieces of evidence support a more direct role for members of the HDZIPIV family in the control of cuticle production. Ectopic overexpression of the maize HDZIPIV protein OCL1 leads to changes in cuticle composition associated with regulation of several genes involved in cuticle biogenesis. In the case of at least one gene, *ZmWBC11a*, this regulation requires an L1 box [106]. More evidence for regulation of cuticle biogenesis by HDZIP proteins, albeit potentially indirect, comes from *Arabidopsis* lines ectopically overexpressing *ATML1* and *HDG2*, which show strong up-regulation of both *FDH* and *WBC12/CER5* [100]. Furthermore the defective trichomes of *hdg2* mutants show reduced cuticle load and reduced expression of *CYP94C*, a gene required for the production of dicarboxylic acids potentially involved in cutin biosynthesis [97]. Finally, defects in both the tomato HDZIPIV encoding *CUTIN DEFICIENT2* gene, and its *Arabidopsis* orthologue *ANTHOCYANINLESS2 (ANL2)* reduce cuticle loads [92]. At a more global level, both co-expression data and the presence of L1 boxes in the promoters of a subset of genes with important roles in cuticle production support a link between HDZIPIV expression and cuticle biogenesis (unpublished results), although how this is integrated with the activity of other key cuticle-regulating transcription factors, such as members of the WIN/SHINE clade, remains rather unclear.

PROTOCOLICULE AND EPIDERMAL CELL FATE

Early plant embryogenesis involves the sequential specification of key cell types including the epidermis. In *Arabidopsis*, where this process has perhaps been most extensively studied, epidermal cell fate is generally considered to be “fixed” at the dermatogen stage of embryogenesis. At this stage, the 8 roughly geometrically equivalent cells derived from the original apical cell of the two celled embryo by two perpendicular longitudinal and one latitudinal rounds of division, each undergo a periclinal cell division to give 16 cells, of which 8 form the skin (protoderm) of the embryo. Interestingly, markers of

epidermal cell fate, including the *ATML1* gene, are expressed as early as the two cell embryo stage suggesting that “epidermis” or at least “protoderm” may be a default state, at least of the embryo proper. Our unpublished results suggest that at this stage in embryo development, and indeed during early preglobular stages, there is no detectable trace of cuticle deposition within the cell wall separating the membrane of the embryo from that of the surrounding syncytial endosperm. However, *in silico* transcriptomic data issuing from painstaking laser microdissection and microarray analysis of Arabidopsis seed development [107], shows that many key components of the cuticle biosynthesis pathway including *LACS2*, *FDH*, and *BDGI* are already strongly expressed in the pre-globular embryo proper, suggesting that cuticle biogenesis and deposition is likely initiated very early in the developing embryo. Both *FDH* and *BDGI* contain L1 boxes upstream their transcription start sites, consistent with a potential regulation by HDZIPIV proteins [94,98,104]. However, although it is clear that well before embryo maturity cotyledons are covered by a layer of cuticular material [108], frustratingly little is known about the biogenesis of the embryonic cuticle.

In terms of cuticle biogenesis, plant embryos are unique from two important points of view. Firstly, because they arise from gametophyte cells, which in turn are derived from non-epidermal cells buried within the ovule nucellus, their cuticle, like the epidermal identity of the cells on which it appears, arises *de novo*. In contrast, clonal analyses in several species suggests that after early embryogenesis the overwhelming majority of, if not all plant epidermal cells arise from anticlinal divisions of existing epidermal cells, and are thus “pre-equipped” with a cuticle bearing surface [109]. Secondly, not only does the embryonic epidermis and therefore its cuticle arise *de novo*, but it also arises in a position where it is not juxtaposed by another cuticularized surface. In angiosperms, the embryo develops in an invagination of the endosperm, which initially takes the form of a rapidly growing coenocytic single cell (commonly called the syncytial endosperm). This cell subsequently undergoes cellularization in a wave, starting in the zone surrounding the developing embryo. There is no evidence in the literature or from TEM data (our unpublished results) that the endosperm produces a cuticle at its junction with the developing embryo. The embryonic cuticle, and thus the apoplastic separation of the embryo from the endosperm, therefore arises in developmentally unique circumstances since in all other aerial plant organs the outer, cuticle bearing surfaces of all epidermal cells juxtapose the equivalent surfaces of other epidermal cells. The juxtaposed cuticles of these cells play a seminal role in preventing post genital fusion of epidermal surfaces, no matter how tightly they are packed together in developing buds. The developmental importance of this “separation” function is manifest in the many

cuticle-related mutants where this function is impacted, and in which organs fuse, impacting growth, fertility and viability (see previous section).

The unique circumstances surrounding angiosperm embryonic cuticle formation might be predicted to demand the deployment of specific molecular and cellular mechanisms which permit the correct definition and positioning of the nascent cuticle, and the successful separation of the embryo from surrounding endosperm tissues. Consistent with this idea, recent research has uncovered a seed-specific signaling pathway, involving both endosperm and embryonically expressed components, which is necessary for the formation of a functional embryonic cuticle, and for physical separation of the embryo and endosperm, in *Arabidopsis*. In the interests of conciseness, we will refer to this pathway as the Embryo Cuticle Functionality (ECF) pathway. To date, five critical components of this pathway have been identified. The first two comprise two very distantly related bHLH transcription factors: ZHOUP1 (ZOU)/RGE1 which is expressed specifically in the embryo surrounding endosperm [110-112], and ICE1/SCREAM which acts as a heterodimer with ZOU [113], but is also involved in several other developmental and physiological processes [114-118]. Both *zou* and *ice1* mutants fail to form a functional embryonic cuticle, and their cotyledons are highly permeable to toluidine blue [113]. In addition mutant embryos fail to physically separate from the surrounding endosperm [111]. Interestingly however, cuticle components appear to be present at the surface of *zou* mutant embryos, and, importantly, the expression of neither epidermal markers [111-113] nor genes involved in cuticle biosynthesis (our unpublished results) is strongly affected in either mutant background. The third gene involved in the ECF pathway is again expressed specifically in the embryo-surrounding endosperm, but in this case encodes a Subtilisin-like serine protease called ABNORMAL LEAF SHAPE1 (ALE1), which is necessary for normal embryonic surface formation and endosperm/embryo separation [108]. ALE1 is predicted to act in the secretory pathway or apoplast, and therefore represents a non-cell autonomous component of the pathway. The expression of *ALE1* is almost completely abolished in *zou* and *ice1* mutants, and reintroduction of *ALE1* expression into *zou* mutants partially complements their cuticle defects [111-113]. Consistent with the fact that *ZOU* and *ALE1* act in the same genetic pathway their mutant phenotypes show no additivity in double mutants [111]. Finally, two genes encoding the closely related receptor kinases GASSHO1 (GSO1) and GSO2, and which show strong expression in developing embryos, act redundantly to promote the production of a functional embryonic cuticle and embryo/endosperm separation [119]. Double *gso1 gso2* mutant shows remarkably similar phenotypes to *ale1* mutants and non-additive genetic interactions with both *ale1* and *zou*

mutants, confirming its likely participation in a signaling processes involving communication between the developing embryo and endosperm necessary for normal embryonic cuticle biogenesis [112,120].

Despite their defective cuticle phenotypes, like *zou* mutants, neither *gso1 gso2* double mutants nor *ale1* mutants show significant changes in the expression of epidermal marker genes such as *ATML1* and *PDF2* [99]. Consistent with this observation, the formation of an epidermal cell layer does not appear to be significantly affected in these mutants suggesting that the defects in cuticle integrity which they display are not linked to a fundamental defect in epidermal cell fate specification. Interestingly however, mutants in the ECF pathway show very strong synergistic interactions with single mutants in either *ATML1*, *PDF2* and with mutant alleles of *ACR4*, a receptor-kinase encoding gene, homologues of which are required for normal epidermal development in several species [96,121-125] and which has recently been shown to be both directly regulated by, and necessary for the maintained expression of, *ATML1* and *PDF2* [99] (Figure 2). Although *atml1 pdf2* mutants show early embryo lethality, single mutant *atml1*, *pdf2* or *acr4* seedlings show only very weak defects in cotyledon permeability, and no major morphological abnormalities [94,99,125]. In addition genetic interactions between *acr4* mutants and either *atml1* or *pdf2* single mutants are consistent with the signaling feedback loop described above [99,126]. In contrast, mutants in the ECF pathway, when combined with either *atml1*, *pdf2* or *acr4* mutant alleles, lead at best to the production of extremely abnormal seedlings with highly abnormal epidermal surfaces, and in most cases to early embryo lethality and a loss of epidermal identity [99,112,124], effectively phenocopying *atml1 pdf2* double mutants.

The genetic interactions described in the above paragraph are complex and rather non-intuitive. In addition, the fact that they involve a pathways active in specific compartments of the developing seed makes them extremely difficult to dissect. However a possible explanation for the observed genetic synergism between the ECF pathway and the epidermal specification pathway described above, was provided by mathematical modeling of the predicted behavior of the feedback loop involved in epidermal cell fate specification and maintenance [99]. Molecular and genetic analysis of the regulatory behavior of this feedback loop post germination suggested that although *ACR4* mediated signaling was necessary for maintaining the expression levels of *ATML1* and *PDF2*, these two proteins fed back negatively on the expression of the *ACR4*, *ATML1* and *PDF2* genes. In mathematical models, this scenario gives a robust maintenance of *ATML1* and *PDF2* expression (and thus epidermal identity) over a wide range of possible values for *ACR4* signaling activity (which can be

considered to be equivalent to the presence of the, as yet unidentified, ligand of ACR4). Interestingly however, data concerning the regulation of elements of the epidermal specification feedback loop in developing seeds suggested that during early embryogenesis the net regulation of *ACR4* expression, and likely the expression of *ATML1* and *PDF2* by HDZIP IV class proteins, is likely to be positive rather than negative [99,100,102]. Mathematical modeling of this scenario leads to an unstable scenario, in which modestly decreasing the level of ACR4 signaling activity can lead to a sudden and irreversible loss of expression of *ATML1* and *PDF2* [99]. A plausible scenario then is that the production of a functional embryonic cuticle, mediated by the ECF pathway, is necessary for the maintenance of ACR4 signaling activity, possibly via the restriction of a diffusible apoplastically localized ligand to the embryo. In an otherwise wild-type background, defects in the ECF pathway are not sufficient to destabilize the epidermal specification feedback loop. However in backgrounds where this loop is defective, cuticle defects are able to “tip the balance” leading to a sudden and catastrophic loss of epidermal identity. Interestingly, and in accord with this hypothesis, loss of epidermal cell fate in ECF component mutant combinations with mutants in elements of the epidermal feedback loop, occurs at the early heart stage, at the time when endosperm dramatically increases the potential for apoplastic diffusion in the embryo-surrounding endosperm. However, until more is known about when and where the cuticle is formed during embryogenesis, it will be difficult to address its function as a developmentally important diffusion barrier in more detail.

CONCLUDING REMARKS

The differentiation of a distinct, continuous epidermal cell layer containing highly specialized cells such as stomata, and the appearance of a cuticle on the surface of epidermal cells, represent key adaptive responses developed by the green phyla to cope with dry conditions when plants colonized non-aqueous environments about 450 million years ago. Ever since, epidermal differentiation and the biosynthesis of surface lipids, and their respective regulation, have co-evolved to allow plants to successfully colonize an astounding range of terrestrial habitats. Recent studies focusing on the transcriptional regulation of epidermal characters have started to unravel a highly complex network and have highlighted interplay in the regulation of key epidermal traits. Major cuticle regulators interact with proteins necessary for epidermal cell differentiation, which in turn can control the expression of genes coding for proteins involved in surface lipid biosynthesis. Tantalizingly, HDZIPIV

transcription factors, which play a central role in specifying epidermal cell fate and in the differentiation of various epidermal cell types, contain a START domain that has the potential to bind regulatory lipids, while VLCFA derivatives have been identified as candidate signaling lipids involved in fine-tuning the development of both the epidermis and the cuticle in response to environmental clues. Together, these data hint at mechanisms underlying a complex cross-talk between cuticle formation and epidermis differentiation both at the transcriptional and metabolic level.

Acknowledgments: This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche through the INASEED grant (ANR-13-BSV2-0002 to G.I.).

Table 1: Epidermal defects observed in Arabidopsis cuticular mutants

Mutant	Locus	Pathway affected	General features				Organ fusion		Epidermal cell defects			Defective cuticular permeability**	References
			Dwarfism	Male Sterility	Glossy stems	Curly leaves	Flowers	Leaf	Pavement cells morphology	Trichome morphology	Stomatal density		
<i>kcr*</i>	At1g67730	VLCFA biosynthesis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[16]
<i>hcd</i>	At5g10480		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[15,66]
<i>cer10*</i>	At3g55360		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[14]
<i>cer6</i>	At1g68530		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[2,17,18]
<i>fdh</i>	At2g26250		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[2,67-69]
<i>hic</i>	At2g46720		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[2,70]
<i>kcs1</i>	At1g01120		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[2,72]
<i>cer1</i>	At1g02205	Wax biosynthesis		+	+						+/-		[34,70,74]
<i>cer3</i>	At5g57800			+	+		+	+			+	+	[32,33,75-76]
<i>wbc11</i>	At1g17840	Cutin biosynthesis	+	+		+	+	+	+	+	+	+	[56,57]
<i>abcg13</i>	At1g51460						+					+	[60]
<i>lcr</i>	At2g45970					+	+	+		+		+	[40]
<i>lacs2</i>	At1g49430				+	+					+	+	[9,10,45]
<i>hth</i>	At1g72970						+					+	[42,43]
<i>gpa4 gppat8</i>	At1g01610 / At4g00400										+	+	[46-48]
<i>dcr</i>	At3g48720						+				+		[50]
<i>gpat6</i>	At2g38110						+				+	+	[44,47,48]
<i>bdg</i>	At1g64670		+					+	+	+	+	[78]	

* Embryo lethal knock-out.

** Assayed using toluidine blue, chlorophyll leaching, weight loss or pollen germination on leaf test.

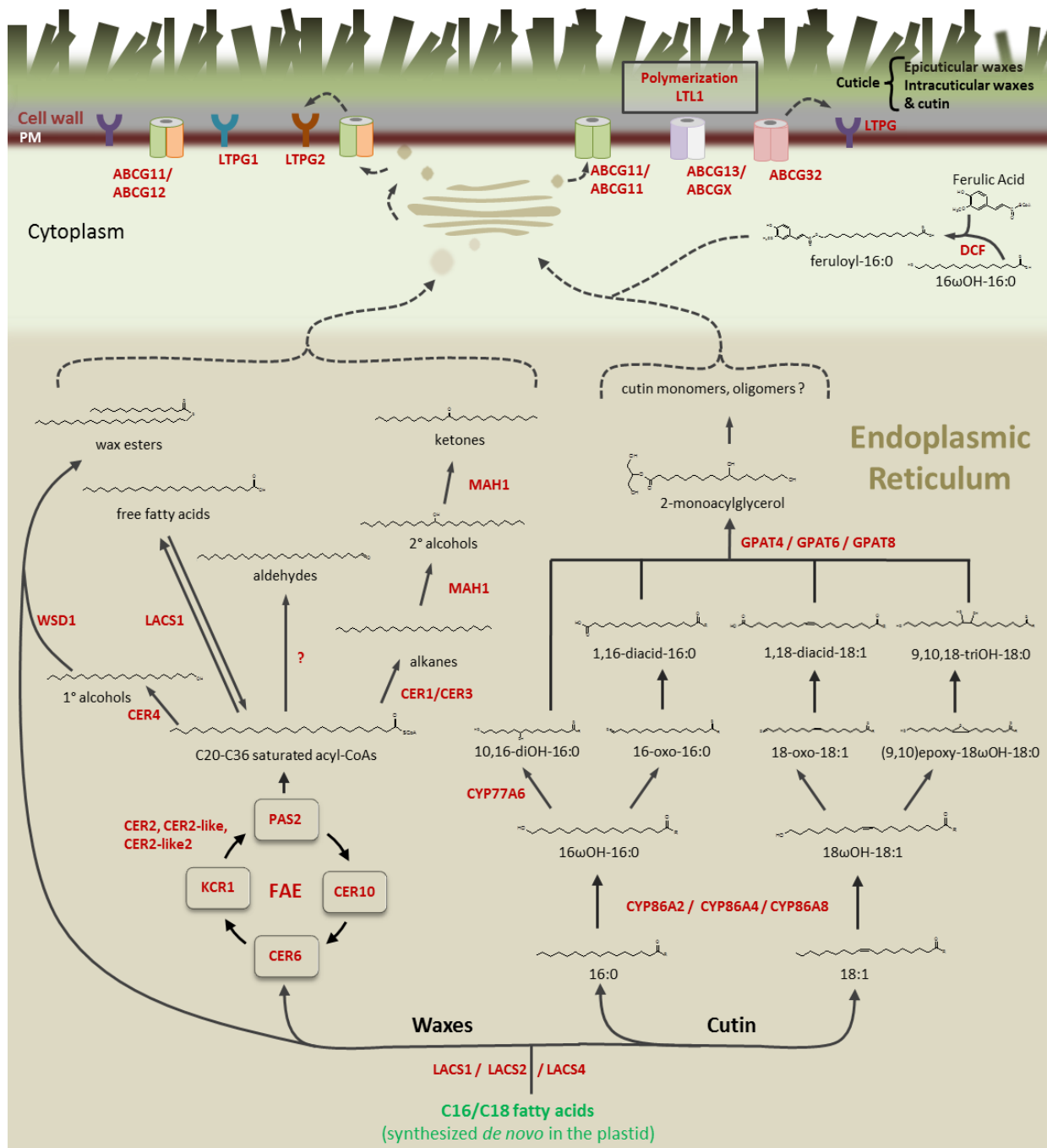


Figure 1: Cuticle biosynthetic pathways. The genes in red are those discovered in *Arabidopsis thaliana*.

Wax biosynthetic pathways: Very long chain fatty acyl-CoAs are synthesized by the fatty acid elongase (FAE) multienzymatic complex from C16-C18 fatty acids. VLCFAs are then modified via two distinct biosynthetic pathways to generate the aliphatic compounds of waxes; the alcohol forming pathway resulting in the formation of primary alcohols (1° alcohols) and wax esters, and the alkane forming pathway which leads to the production of aldehydes, alkanes, secondary alcohols (2° alcohols) and ketones.

Cutin biosynthetic pathways: Addition of a hydroxyl group at the terminal or mid-chain position of C16 and C18 is catalyzed by members of the cytochrome P450 family (CYPs). Formation of dicarboxylic acids (DCA) from ω-hydroxyacids (ω-OH) may involve oxydoreductases. Intermediates are annotated “R”, where R could be H, CoA or glycerol,

since the exact substrate of P450 and order of reaction remains unclear. Esterification of ω -OH and DCA to glycerol-3-phosphate by glycerol-3-phosphate acyl-CoA transferases (GPATs) produces *sn*-2-monoacylglycerol. Incorporation of phenolic components into the cutin polymer requires BAHD-type acyltransferases. Extracellular polymerisation are performed by cutin synthases.

Export of precursors to the cuticular matrix: Cuticle precursors produced in the endoplasmic reticulum (ER) reach the plasma membrane (PM) via the Golgi apparatus through the secretory pathway. Export of cuticle compounds from the plasma membrane is carried out by ATP-Binding Cassette (ABCs) transporters and glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer proteins (LTPGs).

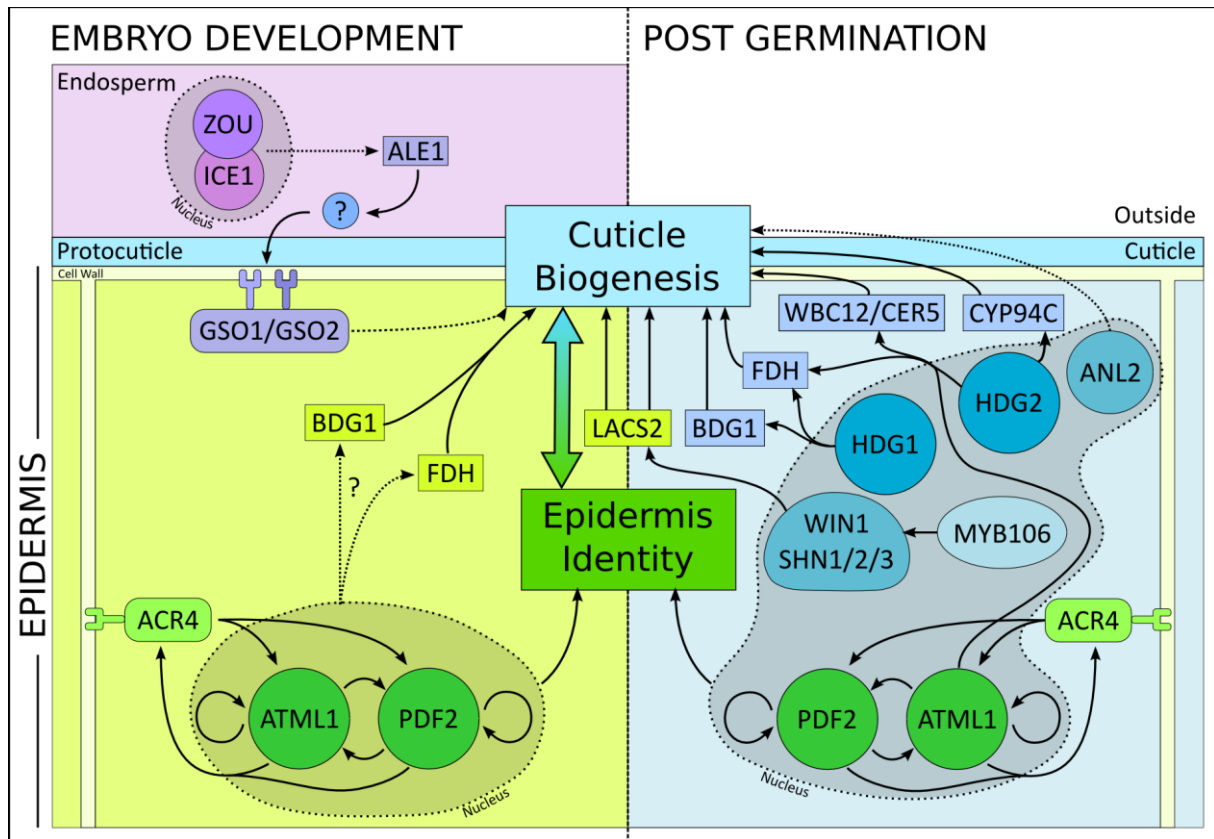


Figure 2: Transcriptional control of cuticle biosynthesis and epidermis specification during development

During plant development, epidermis identity is thought to be specified by the HDZIPIV transcription factors ATML1 and PDF2. Cell-cell signaling, for example mediated by the ACR4 receptor, generates a feedback loop allowing identity maintenance. During zygotic embryogenesis, cuticle biogenesis is affected by two different genetic pathways. The first involves an inter-compartmental signaling pathway between the endosperm and the embryo. The second is poorly understood but may be regulated by ATML1, PDF2 and other HDZIPIV transcription factors, and thus be intricately linked to epidermis identity. Later during development, many transcription factors from different classes, including HDZIPIV transcription factors have been shown to regulate the expression of different effectors involved in cuticle biosynthesis. Similar transcription factors could be involved in cuticle biogenesis during embryogenesis, although evidence to support this is currently lacking.

Transcription factors are represented by circles, effectors by rectangles and receptor by round-cornered boxes. Left panel shows an epidermal cell and its environment during early embryogenesis. Right panel shows the same cell after germination.

REFERENCES

1. Nawrath C, Schreiber L, Franke RB et al (2013) Apoplastic Diffusion Barriers in Arabidopsis. The Arabidopsis Book doi:10.1199/tab.0167
2. Bird SM, Gray JE (2003) Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. New Phytol. 157:9-23
3. Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J (2007) The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. Nature 446:199-202
4. Nobusawa T, Okushima Y, Nagata N et al (2013) Synthesis of Very-Long-Chain Fatty Acids in the Epidermis Controls Plant Organ Growth by Restricting Cell Proliferation. PLoS Biol 11(4):e1001531
5. Hoffmann-Benning S, Kende H (1994) Cuticle biosynthesis in rapidly growing internodes of deepwater rice. Plant Phys 104:719-723
6. Yeats TH, Rose JKC (2013) The Formation and Function of Plant Cuticles. Plant Phys 163:5-20
7. Bernard A, Joubès J. (2013) Arabidopsis cuticular waxes: advances in regulation, synthesis, export and functions. Prog Lipid Res 52:110-129
8. Haslam TM, Kunst L (2013) Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. Plant Sci 210:93-107
9. Lü S, Song T, Kosma DK et al (2009) Arabidopsis CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. Plant J 59:553-564
10. Weng H, Molina I, Shockey J et al (2010) Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1lacs2* double mutant of Arabidopsis. Planta 231:1089-1100
11. Jessen D, Olbrich A, Knüfer J et al (2011) Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in Arabidopsis. Plant J 68:715-726
12. Joubès J, Raffaele S, Bourdenx B et al (2008) The VLCFA elongase gene family in Arabidopsis thaliana: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. Plant Mol Biol 67:547-566
13. von Wettstein-Knowles P. (1982) Elongase and epicuticular wax biosynthesis. Physiol Vég 20:797-809
14. Zheng H, Rowland O, Kunst L (2005) Disruptions of the Arabidopsis enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. Plant Cell 17:1467-1481

15. Bach L, Michaelson LV, Haslam R et al (2008) The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14727-14731
16. Beaudoin F, Wu X, Li F et al (2009) Functional characterization of the Arabidopsis β -ketoacyl-Coenzyme A reductase candidates of the fatty acid elongase. *Plant Physiol* 150:1174-1191
17. Millar AA, Clemens S, Zachgo S et al (1999) CUT1, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* 11:825-838
18. Hooker TS, Millar AA, Kunst L. (2002) Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis. *Plant Physiol* 129:1568-1580
19. Haslam TM, Manas-Fernandez A, Zhao L et al (2012) Arabidopsis ECERIFERUM2 is a component of the fatty acid elongation machinery required for fatty acid extension to exceptional lengths. *Plant Physiol* 160:1164-1174
20. Pascal S, Bernard A, Sorel M et al (2013) The Arabidopsis cer26 mutant, like the cer2 mutant, is specifically affected in the very-long-chain fatty acid elongation process. *Plant J* 73:733-746
21. Haslam TM, Haslam R, Thoraval D et al (2015) CER2-LIKE proteins have unique biochemical and physiological functions in very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Physiol* 167:682-692
22. Kolattukudy PE (1971) Enzymatic synthesis of fatty alcohols in Brassica oleracea. *Arch Biochem Biophys* 142:701-709
23. Rowland O, Domergue F. (2012) Plant fatty acyl reductases: Enzymes generating fatty alcohols for protective layers with potential for industrial applications. *Plant Science* 193-194:28-38
24. Jenks MA, Tuttle HA, Eigenbrode SD et al (1995) Leaf epicuticular waxes of the eceriferum mutants in Arabidopsis. *Plant Physiol* 108:369-377
25. Rowland O, Zheng H, Hepworth SR et al (2006) CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142:866-877
26. Lai C, Kunst L, Jetter R. (2007) Composition of alkyl esters in the cuticular wax on inflorescence stems of Arabidopsis thaliana cer mutants. *Plant J* 50:189-196

27. Lardizabal KD, Metz JG, Sakamoto T et al (2000) Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122:645-656
28. Cheng JB, Russell DW (2004) Mammalian wax biosynthesis-I: identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions, *J Biol Chem* 279:37789-37797
29. Stoveken T, Kalscheuer R, Malkus U et al (2005) The wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase. *J Bacteriol* 187:1369-1376
30. Li F, Wu X, Lam P et al (2008) Identification of the wax ester synthase/acyl-Coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148:97-107
31. Aarts MGM, Keijzer CJ, Stiekema WJ et al (1995) Molecular characterization of the *CERI* gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell* 7:2115-2127
32. Chen X, Goodwin SM, Boroff VL et al (2003) Cloning and characterization of the *WAX2* gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell* 15:1170-1185
33. Kurata T, Kawabata-Awai C, Sakuradani E et al (2003) The *YORE-YORE* gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J* 36:55-66
34. Bourdenx B, Bernard A, Domergue F et al (2011) Overexpression of *Arabidopsis* *ECERIFERUM1* promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* 156:29-45
35. Bernard A, Domergue F, Pascal S et al (2012) Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that *Arabidopsis* *ECERIFERUM1* and *ECERIFERUM3* are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex. *Plant Cell* 24: 3106-3118
36. Greer S, Wen M, Bird D et al (2007) The cytochrome P450 enzyme *CYP96A15* is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145:653-667
37. Beisson F, Li-Beisson Y, Pollard M (2012) Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 15:329-337
38. Bonaventure G, Beisson F, Ohlrogge J et al (2004) Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with *Arabidopsis* epidermis: Occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1,18-dioate as the major component. *Plant J* 40:920-930

39. Franke R, Briesen I, Wojciechowski T et al (2005) Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues - A typical suberin and a particular cutin. *Phytochem* 66:2643-2658
40. Wellesen K, Durst F, Pinot F et al (2001) Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid ω -hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9694-9699
41. Xiao F, Goodwin SM, Xiao Y et al (2004) Arabidopsis CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J* 23:2903-2913
42. Krolkowski K, Victor JL, Wagler TN et al (2003) Isolation and characterization of the Arabidopsis organ fusion gene HOTHEAD. *Plant J* 35:501-511
43. Kurdyukov S, Faust A, Trenkamp S et al (2006) Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain α,ω -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* 224:315-329.
44. Li-Beisson Y, Pollard M, Sauveplane V et al (2009) Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:22008-22013
45. Schnurr J, Shockey J, Browse J (2004) The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 16:629-642
46. Li Y, Beisson F, Koo AJK et al (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18339-18344
47. Yang W, Pollard M, Li-Beisson Y et al (2010) A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:12040-12045
48. Yang W, Simpson JP, Li-Beisson Y et al (2012) A Land-Plant-Specific Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Family in Arabidopsis: Substrate Specificity, sn-2 Preference, and Evolution. *Plant Physiol* 160:638-652
49. Rautengarten C, Ebert B, Ouellet M 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
50. Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L et al (2009) The Arabidopsis DCR encoding a soluble BAHD acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. *Plant Physiol* 151:1773-1789
51. Yeats TH, Martin LBB, Viart HM-F et al (2012) The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat Chem Biol* 8:609-611

52. Girard L, Mounet F, Lemaire-Chamley M et al (2012) Tomato GDSL1 Is Required for Cutin Deposition in the Fruit Cuticle. *Plant Cell* 24:3119-3134
53. Yeats TH, Huang W, Chatterjee S et al (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. *Plant J* 77:667-675
54. McFarlane HE, Watanabe Y, Yang W et al (2014) Golgi- and trans-Golgi network-mediated vesicle trafficking is required for wax secretion from epidermal cells. *Plant Physiol* 164:1250-1260
55. Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ et al (2004) Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* 306:702-704
56. Bird D, Beisson F, Brigham A et al (2007) Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J* 52:485-498
57. Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T et al (2007) The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol* 145:1345-1360
58. Panikashvili D, Shi JX, Bocobza S et al (2010) The Arabidopsis DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Mol Plant* 3:563-575
59. McFarlane HE, Shin JJH, Bird DA et al (2010) Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell* 22:3066-3075
60. Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L et al (2011) The Arabidopsis ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytol* 190: 113-124
61. Bessire M, Borel S, Fabre G et al (2011) A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in Arabidopsis. *Plant Cell* 23:1958-1970
62. Suh MC, Samuels AL, Jetter R et al (2005) Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in Arabidopsis stem epidermis. *Plant Physiol* 139:1649-1665
63. DeBono A, Yeats TH, Rose JKC et al (2009) Arabidopsis LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. *Plant Cell* 21:1230-1238
64. Lee SB, Go YS, Bae H-J et al (2009) Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and

- enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol* 150:42-54
65. Kim H, Lee SB, Kim HJ et al (2012) Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 (LTPG2) and overlapping function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in cuticular wax export or accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53:1391-1403
 66. Faure JD, Vittorioso P, Santoni V et al. (1998) The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development* 125:909-918
 67. Lolle SJ, Berlyn GP, Engstrom EM et al (1997) Developmental regulation of cell interactions in the *Arabidopsis* fiddlehead-1 mutant: a role for the epidermal cell wall and cuticle. *Dev Biol* 189:311-321
 68. Yephremov, A., et al., Characterization of the FIDDLEHEAD gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell* 11: 2187-2201
 69. Pruitt RE, Vielle-Calzada JP, Ploense SE et al (2000) FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1311-1316
 70. Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM et al (2000) The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* 408:713-716
 71. Fiebig A, Mayfield JA, Miley NL et al (2000) Alterations in CER6, a gene identical to CUT1, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* 12:2001-2008
 72. Todd J, Post-Beittenmiller D, Jaworski JG (1999) KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 17:119-130
 73. Kim J, Jung JH, Lee SB et al (2013) *Arabidopsis* 3-ketoacyl-coenzyme a synthase9 is involved in the synthesis of tetracosanoic acids as precursors of cuticular waxes, suberins, sphingolipids, and phospholipids. *Plant Physiol.* 162:567-580
 74. Aarts MG, Keijzer CJ, Stiekema WJ et al (1995) Molecular characterization of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell* 7:2115-2127

75. Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K et al (2003). A novel male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana*, faceless pollen-1, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. *Plant Mol Biol* 53: 107-116
76. Rowland O, Lee R, Franke R et al (2007) The CER3 wax biosynthetic gene from *Arabidopsis thaliana* is allelic to WAX2/YRE/FLP1. *FEBS Lett* 581:3538-3544
77. Xiao F, Goodwin SM, Xiao Y et al (2004) *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J* 23:2903-2913
78. Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C et al (2006) The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:321-339
79. Sieber P, Schorderet M, Ryser U et al (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell* 12:721-738
80. Takahashi K, Shimada T, Kondo M et al (2010) Ectopic Expression of an Esterase, Which is a Candidate for the Unidentified Plant Cutinase, Causes Cuticular Defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51:123-131
81. Schweizer P, Felix G, Buchala A et al (1996) Perception of free cutin monomers by plant cells. *Plant J* 10:331-341
82. Fauth M, Schweizer P, Buchala A et al (1998) Cutin monomers and surface wax constituents elicit H₂O₂ in conditioned cucumber hypocotyl segments and enhance the activity of other H₂O₂ elicitors. *Plant Physiol* 117:1373-1380
83. Reina-Pinto JJ, Yephremov A (2009) Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol Biochem* 47:540-549
84. Nobusawa T, Okushima Y, Nagata N et al (2013) Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation. *PLoS Biol.* DOI: 10.1371/journal.pbio.1001531
85. Broun P, Poindexter P, Osborne E et al (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4706-4711
86. Aharoni A, Dixit S, Jetter R et al. (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2463-2480
87. Kannangara R, Branigan C, Liu Y et al (2007) The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19:1278-1294

88. Shi JX, Malitsky S, De Oliveira S et al (2011) SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of Arabidopsis flower organs. *PLoS Genetics* 7, e1001388
89. Oshima Y, Shikata M, Koyama T et al (2013) MIXTA-like transcription factors and WAX INDUCER1/SHINE1 coordinately regulate cuticle development in Arabidopsis and *Torenia fournieri*. *Plant Cell* 25/1609-1624
90. Wu R, Li S, He S et al (2011) CFL1, a WW Domain Protein, Regulates Cuticle Development by Modulating the Function of HDG1, a Class IV Homeodomain Transcription Factor, in Rice and Arabidopsis. *Plant Cell* 23:3392-3411
91. Javelle M, Klein-Cosson C, Vernoud V et al (2011) Genome-wide characterization of the HD-ZIP IV transcription factor family in maize: preferential expression in the epidermis. *Plant Physiol* 157:790-803
92. Nadakuduti SS, Pollard M, Kosma DK et al (2012) Pleiotropic Phenotypes of the sticky peel Mutant Provide New Insight into the Role of CUTIN DEFICIENT2 in Epidermal Cell Function in Tomato. *Plant Physiol* 159:945-960
93. Depege-Fargeix N, Javelle M, Chambrier P et al (2011) Functional characterization of the HD-ZIP IV transcription factor OCL1 from maize. *J Exp Bot* 62:293-305
94. Abe M, Katsumata H, Komeda Y et al (2003) Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in Arabidopsis. *Development* 130:635-643
95. Vernoud V, Laigle G, Rozier F et al (2009) The HD-ZIP IV transcription factor OCL4 is necessary for trichome patterning and anther development in maize. *Plant J* 59:883-894
96. Roeder AH, Cunha A, Ohno CK et al (2012) Cell cycle regulates cell type in the Arabidopsis sepal. *Development* 139:4416-4427
97. Marks MD, Wenger JP, Gilding E et al (2009) Transcriptome analysis of Arabidopsis wild-type and gl3-sst sim trichomes identifies four additional genes required for trichome development. *Mol Plant* 2009:803-822
98. Nakamura M, Katsumata H, Abe M et al (2006) Characterization of the class IV homeodomain-Leucine Zipper gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol* 141:1363-1375
99. San-Bento R, Farcot E, Galletti R et al (2014) Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 77:46-58
100. Takada S, Takada N, Yoshida A (2013) ATML1 promotes epidermal cell differentiation in Arabidopsis shoots. *Development* 140:1919-1923

101. Peterson KM, Shyu C, Burr CA et al (2013) Arabidopsis homeodomain-leucine zipper IV proteins promote stomatal development and ectopically induce stomata beyond the epidermis. *Development* 140:1924-1935
102. Takada S, Jurgens G (2007) Transcriptional regulation of epidermal cell fate in the Arabidopsis embryo. *Development* 134:1141-1150
103. Sessions A, Weigel D, Yanofsky M.F. (1999) The Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* 20:259-263
104. Abe M, Takahashi T, Komeda Y (2001) Identification of a cis-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant J* 26:487-494
105. Rombola-Caldentey B, Rueda-Romero P, Iglesias-Fernández R et al (2014) Arabidopsis DELLA and two HD-ZIP transcription factors regulate GA signaling in the epidermis through the L1 box cis-element. *Plant Cell* 26:2905-2919
106. Javelle M, Vernoud V, Depège-Fargeix N et al (2010) Overexpression of the epidermis-specific homeodomain-leucine zipper IV transcription factor Outer Cell Layer1 in maize identifies target genes involved in lipid metabolism and cuticle biosynthesis. *Plant Physiol* 154:273-286
107. Le BH, Cheng C, Bui AQ et al (2010) Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:8063-8070
108. Tanaka H, Onouchi H, Kondo M et al (2001) A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. *Development* 128:4681-4689
109. Javelle M, Vernoud V, Rogowsky PM et al (2011) Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol* 189:17-39
110. Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M et al (2008) RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiol* 147:1924-1935
111. Yang S, Johnston N, Talideh E et al (2008) The endosperm-specific ZHOUPI gene of Arabidopsis thaliana regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development*, 135:3501-3509.

112. Xing Q, Creff A, Waters A et al (2013) ZHOUP1 controls embryonic cuticle formation via a signalling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAF-SHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development* 140:770-779
113. Denay G, Creff A, Moussu S et al (2014) Endosperm breakdown in Arabidopsis requires heterodimers of the basic helix-loop-helix proteins ZHOUP1 and INDUCER OF CBP EXPRESSION 1. *Development* 141:1222-1227
114. Shirakawa M, Ueda H, Nagano AJ et al (2014) FAMA Is an Essential Component for the Differentiation of Two Distinct Cell Types, Myrosin Cells and Guard Cells, in Arabidopsis. *Plant Cell* 26:4039-4052
115. Kanaoka MM, Pillitteri LJ, Fujii H et al (2008) SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to arabidopsis stomatal differentiation. *Plant Cell* 20:1775-1785
116. Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S et al (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes Dev* 17:1043-1054
117. Lee BH, Henderson DA, Zhu JK (2005) The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* 17:3155-3175
118. Miura K, Jin JB, Lee J et al (2007) SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 19:1403-1414
119. Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y (2008) 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. *Plant J* 54:30-42
120. Waters A, Creff A, Goodrich J et al (2013) "What we've got here is failure to communicate": Zou mutants and endosperm cell death in seed development. *Plant Signal Behav* 8:e24368
121. Pu CX, Ma Y, Wang J et al (2012) Crinkly4 receptor-like kinase is required to maintain the interlocking of the palea and lemma, and fertility in rice, by promoting epidermal cell differentiation. *Plant J* 70:940-953
122. Becraft PW, Stinard PS, McCarty DR (1996) CRINKLY4: A TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science* 273:1406-1409
123. Gifford ML, Robertson FC, Soares DC et al (2005) ARABIDOPSIS CRINKLY4 function, internalization, and turnover are dependent on the extracellular crinkly repeat domain. *Plant Cell* 17:1154-1166

124. Tanaka H, Watanabe M, Sasabe M et al (2007) Novel receptor-like kinase ALE2 controls shoot development by specifying epidermis in Arabidopsis. *Development* 134:1643-1652
125. Tanaka T, Tanaka H, Machida C et al (2004) A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in Arabidopsis. *Plant J* 37:139-146
126. Moussu S, San-Bento R, Galletti R et al (2013) Embryonic cuticle establishment: the great (apoplastic) divide. *Plant Signal Behav* 8:e27491.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications avec comité de lecture

Haslam T. M., Haslam R., Thoraval D., Pascal S., **Delude C.**, Domergue F., Mañas Fernández A., Beaudoin F., Napier J. A., Kunst L. and Joubès J. (2015) CER2-LIKE proteins have unique biochemical and physiological functions in very-long-chain fatty acid elongation. **Plant Physiol.**, 167(3):682-692.

Vishwanath S. J., **Delude C.**, Domergue F. and Rowland O. (2015) Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier. **Plant Cell Rep.**, 34(4):573-586.

Delude C., Fouillen L., Bhar P., De Silva N., Pascal S., Kosma D., Joubès J., Rowland O. and Domergue F. (2016) Primary alcohols are major components of suberized root tissues of Arabidopsis in the form of alkyl hydroxycinnamates (*Manuscript in preparation*)

Chapitre de livre

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), Springer (Subcellular Biochemistry) *In press*

Communications orales

C. Delude, L. Fouillen, S. Pascal, P. Bhar, D. K. Kosma, J. Joubès and O. Rowland, F. Domergue - “New insight into Arabidopsis suberin composition and content “ - International Symposium on Plant Apoplastic Diffusion Barriers, 2-4 September 2015, Nantes, France.

C. Delude, L. Fouillen, S. Pascal, P. Bhar, D. K. Kosma, J. Joubès and O. Rowland, F. Domergue - “ Arabidopsis root suberin is associated with high amounts of alkyl hydroxycinnamates” - 7th European Symposium on Plant Lipids, 6-8 July 2015, Harpenden, England.

Communications affichées

Delude C., Fouillen L., Pascal S., Bhar P., Joubès J., Rowland O. and Domergue F. -"Suberin is a major sink for fatty acyl-chains in Arabidopsis roots" - 21th International Symposium on Plant Lipids, 6-11 July 2014, Guelph, Canada.

Delude C. and Domergue F. - “The transport of suberin precursors in Arabidopsis : ATP-Binding Cassette Transporters and Lipid Transfer Protein as candidates” - 8^{ième} Congrès Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biologie Végétale, 25-27 June 2014, Tours, France.

La subérine chez *Arabidopsis thaliana* : mécanismes d'export et contribution des alcools gras.

Résumé

Chez les plantes, la subérine est un biopolymère constitué de composés aliphatiques et aromatiques déposés au niveau de la paroi des cellules de plusieurs tissus comme l'endoderme et le périderme des racines ou encore le manteau des graines. La subérine forme une barrière hydrophobe permettant entre autres de contrôler les flux d'eau et de solutés, et de protéger la plante de stress environnementaux comme la sécheresse ou les pathogènes. Grâce à des analyses en LC-MS/MS et en GC-MS, nous avons pu montrer que la majorité des alcools gras présents dans la fraction soluble de racines d'*Arabidopsis thaliana* est sous forme d'alkyl caféates et d'alkyl coumarates. De plus, nous avons montré que ces cires associées au polymère de subérine sont présentes dès les premiers stades du développement de la racine. Une étude de la distribution des chaînes acyles des racines nous a permis de mettre en évidence la contribution majeure des alcools gras dans la composition de la subérine ainsi que l'importance de la subérine dans le métabolisme lipidique des racines. Afin d'identifier des acteurs impliqués dans l'export des précurseurs de la subérine vers l'espace extracellulaire, nous avons mené une approche de génétique inverse en utilisant des lignées mutées pour des gènes codant notamment pour des ABCG transporteurs co-exprimés avec des gènes connus pour participer à la biosynthèse de la subérine. Les résultats de ces analyses ont confirmé que le processus d'export fait intervenir plusieurs protéines pouvant avoir des fonctions redondantes et ont suggéré l'implication d'un nouveau transporteur dans l'export des précurseurs de subérine.

Mots clés : Subérine, *Arabidopsis*, racine, alcools gras, alkyl hydroxycinnamates, cires, transport, ABCG transporteurs.

Export mechanisms and fatty alcohols importance in *Arabidopsis thaliana* suberin :

Abstract

In plants, suberin is a complex biopolymer made of aliphatic and aromatic compounds. It is deposited in the cell wall of tissues such as the endoderm and the periderm of roots or the coat of the seeds. Suberin forms a hydrophobic barrier controlling the flow of water and solutes, and protecting the plant from environmental stresses such as drought or pathogens. Through LC-MS/MS and GC-MS analyses, we have shown that the majority of the fatty alcohols present in the soluble fraction of *Arabidopsis* roots is in the form of alkyl caffeates and alkyl coumarates. Such waxes, most probably associated with the suberin polymer, are already detected at early stages of root development. A study of the distribution of all acyl chains present in roots allowed us to highlight the major contribution of fatty alcohols in the composition of suberin and the importance of suberin in the global lipid metabolism of the roots. To identify proteins involved in the export of suberin precursors to the extracellular space, we conducted a reverse genetic approach using lines mutated in genes coding for several ABCG transporters which were co-expressed with genes known to participate in the biosynthesis of suberin. The results of these analyses confirmed that the export process involves several proteins that can have redundant functions, and supported the involvement of a new transporter in the export of the suberin precursors.

Key words : Suberin, *Arabidopsis*, root, fatty alcohols, alkyl hydroxycinnamates, wax, transport, ABCG transporters.