Identification et validation fonctionnelle de gènes candidats contrôlant la composition de la cuticule chez le fruit de tomate

Johann Petit

▶ **To cite this version:**

Johann Petit. Identification et validation fonctionnelle de gènes candidats contrôlant la composition de la cuticule chez le fruit de tomate. Sciences agricoles. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR15225 . tel-00966997

HAL Id: tel-00966997

https://theses.hal.science/tel-00966997

Submitted on 27 Mar 2014

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.

Université de Bordeaux I

Année 2013

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Biologie Végétale

THESE DE DOCTORAT

Par

Johann PETIT

Identification et validation fonctionnelle de gènes candidats contrôlant la composition de la cuticule chez le fruit de tomate

Présentée et soutenue publiquement

le 17 décembre 2013

Membres du jury :

Président	**M. BESSOULE Jean Jacques**, Directeur de Recherche (CNRS Bordeaux)
Rapporteurs	**M. ZOUINE Mohammed**, Maître de Conférences (INRA Toulouse)
	M. MARION Didier, Directeur de Recherche (INRA Nantes)
Examinateurs	**Mme BAKAN Bénédicte**, Chargée de Recherche (INRA Nantes)
	M. CHEVALIER Christian, Directeur de Recherche (INRA Bordeaux)
	M. GEVAUDANT Frédéric, Maître de Conférences (INRA Bordeaux)
Directeur de thèse	**M. ROTHAN Christophe**, Directeur de Recherche (INRA Bordeaux)

Résumé

La cuticule, une matrice lipidique extracellulaire constituée de cires et d'un squelette de cutine, est la barrière de défense la plus externe des plantes face à leur environnement. Elle intervient dans de nombreuses propriétés agronomiques comme la conservation post récolte, les propriétés mécaniques ou bien l'aspect du fruit, dont la brillance. Afin d'isoler des mutants de cuticule, le criblage d'une collection de mutants EMS de tomate a été entrepris, en se basant sur la brillance des fruits, conduisant à la sélection de 24 mutants. Chez ceux-ci, des analyses biochimiques ont montré de fortes variations de charge et de composition de la cuticule, notamment chez les mutants de cutine. La caractérisation de 4 mutants remarquables a été entreprise afin d'identifier les mutations responsables des phénotypes de brillance. Le mutant le plus affecté, présentant une charge en cutine réduite de 85% par rapport au type sauvage, a révélé une mutation du gène *SlGDSL2* codant pour une acylhydrolase à motif GDSL, responsable de la polymérisation de la cutine. Afin d'étudier la formation et la régulation de la cutine, la suite du travail a consisté à obtenir et à caractériser des simples et des doubles mutants affectés dans la synthèse des monomères de cutine, le transport apoplastique et la polymérisation de la cutine.

Mots clés : tomate, mutants, EMS, brillance, cuticule, cutine, GDSL

Abstract

The cuticle, an extracellular lipid matrix consisting of waxes and of a cutin skeleton is the outermost plants protection barrier against their environment. The cuticle is involved in many agronomic traits such as post-harvest storage, biomechanical or fruit appearance properties like surface brightness. In order to isolate cuticle mutants, the screening of an EMS tomato mutants collection has been undertaken, based on fruit brightness, leading to the selection of 24 mutants. Biochemical analyzes have shown wide variations in cuticle loads and compositions, especially in cutin mutants. The characterization of 4 remarkable mutants was undertaken to identify the mutations responsible for brightness phenotypes. The most affected mutant shows a cutin load reduced by 85% compared to the wild type, and is due to a mutation in the *SlGDSL2* gene, encoding a GDSL-motive acylhydrolase enzyme, responsible for the cutin polymerization. In order to further study the cutin formation and regulation, the next work was to obtain and characterize single and double mutants affected in cutin monomer synthesis, apoplastic transport and cutin polymerization.

Keywords : tomato, mutants, EMS, brightness, cuticle, cutin, GDSL

Remerciements

Cette histoire se termine bien et ils vécurent heureux pendant très longtemps…

…

Voilà, c'est ça le sentiment de la page des remerciements, c'est de commencer le manuscrit par la fin. L'histoire de cette thèse qui se termine, elle s'est jouée ces 4 dernières années (mon master ayant servi de pré-doctorat)… mais elle s'est écrite il y a fort, fort, fort longtemps.

Nous sommes à une époque reculée où la France jouait au football et levait des trophées. Oui, c'est vrai, plus grand monde ne s'en souvient. Je faisais une manip' (je vous avais dit que ça faisait longtemps) dans le labo de Pierre Baldet par un bel été de 98, et très sérieusement Pierrot me dit que j'aurai du faire une thèse pour pleins de raisons. Ca m'a étonné, ça m'a fait réfléchir et j'ai gardé ça de côté…. pendant une décennie.
Puis est arrivé vers 2008 la fin de la plate forme transcriptome et l'heure des choix. Etrangement, la phrase de Pierre est ressortie du tiroir où je l'avais rangée, à côté d'une réplique du film Dune :

« *le dormeur doit se réveiller* ».

Un matin, en partant avec Christophe pour une réunion à Bordeaux 2, alors que je me demandais depuis 4 feux, 5 stops et 3 rond-points comment me lancer, c'est sorti tout seul : « Et si je faisais une thèse ? ». Et Christophe de répondre « OK ».

Dans les remerciements, la question est de savoir par qui commencer : le jury, mon directeur de thèse, mon père spirituel professionnel, le labo, les amis, mes parents, ma chérie ou la personne barbue tout de blanc vétu, qui regarde les gens avec bienveillance du haut d'un nuage cotonneux? Bon, je ne vais peut être pas ratisser aussi large mais après tout, cet ordre en vaut bien un autre.
Donc ….

Merci!

A mon jury de thèse, présidé par Jean-Jacques Bessoule et composé de Bénédicte Bakan, Mohammed Zouine, Didier Marion, Frédéric Gévaudant et Christian Chevalier. Merci d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et pour cette longue (…) mais très intéressante discussion lors de l'oral. Dominique Rolin m'avait dit que le but de l'oral de thèse, c'était de

prendre du plaisir et bien même si ça a pris un peu de temps à se dessiner, la mission fut accomplie.

A mon directeur de thèse, Christophe Rothan, qui en acceptant de m'encadrer lors de cette thèse, n'a pas imaginé une seule seconde à quel point ces 4 années allait se révéler un calvaire pour lui, avec un gars qui frappe toutes les 30 min à la porte de son bureau et en commençant sa phrase par « Tiens, je me demandais un truc… ». J'ai bien vu que parfois tu frôlais le hurlement primaire (revoir le sketch de Bigard), mais tu as tenu le choc, donc gloire à toi.

A Christian, mon « papa de travail » qui m'a pris sous sa coupe en 1996 lors d'un stage, dans un labo qui s'appelait alors « Station de Physiologie Végétale ». Tu m'as donné l'envie de faire ce métier et tu es l'artisan de mon retour en terres bordelaises en 2002. C'est pour moi un honneur et un bonheur de t'avoir eu dans mon jury de thèse. Dans les Christian's boys, je n'étais pas le plus précoce, mais c'est peut être comme le vin, faut poireauter pour que ça s'améliore ?
OK, ce n'est pas une règle absolue.

A ce labo de fous joyeux, qui fait que ce métier n'est pas un métier. Petite pensée pour la G2 team tout d'abord, « Conscience » Meuleu, Pierrot ou « l'homme dont seuls ses gènes se souviennent qu'il est forcément asiatique », Daniel qui cumule les surnoms « Just do it », DidJi, M'ssieur Vincent ou « the transversal man », Cécile qui me payera un sonotone pour ma retraite tant elle m'aura fracturé le tympan, mais aussi les p'tits nouveaux de l'équipe comme Lucie, JP et Joana. Je pense aussi à l'équipe G1 avec la fine équipe des Fred D & G, qui aurait pu lancer une marque de fringues et de parfums, on avait déjà le logo. En plus, on sait que Tata Fred touche sa bille en matière de mode, surtout pour les sacs à mains. Le « G one » compte également des personnages totalement inclassables comme Michel, qui possède toujours le brevet sur la fabrication des blagues « *à la Michel* » ou un ex G1, Julien « Pire au lit » (dixit sa femme sinon je ne me permettrais pas), un transformiste capable des pires outrages.

D&G
DELMAS & GEVAUDANT

Merci également au Laboratoire de Biogénèse Membranaire de Réné Lessire / JJ Bessoule, en particulier Jérôme Joubes et Frédéric Domergue pour leur aide durant mes travaux et pour leur décontraction et leur bonne humeur. J'ignorais qu'on pouvait faire de la biochimie des lipides sans finir dépressif, vous m'avez appris ça (entre autres).

J'ai bien sur une grosse pensée pour tous les anciens thésards, puisque c'est aussi eux qui m'ont donné envie de sauter le pas, je vais forcément en oublier mais par ordre chronologique, je dirais Carine, Jérôme, Fred D, Hug' ou l'enfer de la page blanche, Ana, le Drien, Fab + Loulou (c'est livré en package), Nico, Julyyyy, Lisa, Amélia, Grouik et pleins d'autres. Bon courage pour les suivants, en particulier Céline, que je viendrais voir tous les jours quand elle rédigera, juste histoire de me venger (gnark gnark) et Rémi, à qui je ferais « tic-tac » à partir de J-3 mois de sa soutenance. Le départ des thésards est un moment redouté par tous les permanents d'un labo car c'est toujours une page pleine de bons souvenirs qui se

tourne. On ne vous oublie pas et vous nous manquez. La technologie peut cependant servir de paliatif et Grouik nous initia à Viber. Un groupuscule d'activistes se faisant appelé « La Crampe dans les parages » sévit depuis, en disséquant les sujets les plus fondamentaux comme l'automobile, le sexe, le football ou la météo. Un recueil est en cours de préparation, mais aucun éditeur n'est emballé. C'est étrange.

Loulou, Fab, Grouik, vous garderez bien sur une place particulière et on sera longtemps nostalgique d'une époque où la dune du Pyla était compliquée à monter avec une glacière et où le Saint Julien millésimé passait très bien avec des pates au gruyère.

A mes parents, vous avez toujours été là même quand je n'en ramais pas une. Merci pour ça et pour tout le reste. Dans la famille, on ne s'épanche pas forcément mais on n'en pense pas moins, là est l'essentiel.

A ma chérie, Aline qui, un jour, sera reconnue à sa juste valeur et récompensée de la médaille du mérite national, puisqu'elle supporte depuis plus de 10 ans mon caractère de râleur, mes blagues lourdes, mon sens inné du bricolage, ma non-motivation pour l'organisation de quoi que ce soit, mes questions existentielles (pourquoi diable une mouche tourne-t-elle en rond au milieu d'une pièce ?), les rediffusions de tous les documentaires et films débiles sur les volcans, les cataclysmes, les météorites ou les extra terrestres, et surtout, ma passion immodérée pour l'automobile de collection, avec son lot d'heures passées sur mon site web, mes voyages coûteux et les innombrables discussions avec d'autres fous furieux, sur des numéros de chassis de Bugatti dont tout le monde se moque, ou bien s'il est raisonnable de recarrosser une Ferrari 350 Canam en 330 P4, alors que la voiture a du palmares. Hein, vous en pensez quoi, vous ? Elle, rien.

Merci ma chérie, merci à mon p'tit bout de chou Paul, j'aime ma vie et vous y êtes pour beaucoup.

Et maintenant, comme dirait un prince célèbre, « en route vers de nouvelles aventures » !

Abréviations

ABA	Acide abscissique
ABCG	Transporteur à ATP Binding Cassette, sous famille G
ACP	Acyl carrier protein
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AGO	Argonaute
AGP	Arabinogalacturonan rich protein
AP2/ERBP	Apetala2 domain/ ethylene response binding protein
ATP	Adénosine tri phosphate
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy
BC	Back cross
BDG	Bodyguard
BIFC	Bimolecular fluorescence complementation
Br	Breaker
BSA	Bulked Segregant Analysis
BSTFA-TMS	N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide) : trimethylchlorosilane
cd	Cutin deficient
Cer	Eceriferum
CFL1	Curly flag leaf1
CL	Cuticle layer
CNG	Centre national de génotypage
CoA	Co enzyme A
CP	Cuticle proper
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
CYP450	Cytochrome P450 oxydase
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DCA	Dicarboxylic acid
DCL	Dicer-like
DCR	Defective in cuticular ridges
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
ECR	Enoyl CoA reductase
EMS	Ethyl methanesulfonate
ESEM	Environmental scanning electron microscope
EST	Expressed Sequence Tag
FAE	Fatty acid elongase
FAR	Fatty acid reductase
FAS	Fatty acid synthase
FAT	Fatty acid thioesterase
FAO	Food and agriculture organization
FDH	Fiddlehead
FFA	Free fatty acid
GDSL	Lipase hydrolase à motif glycine-aspartate-sérine-leucine

GFP	Green fluorescent protein
GPAT	Glycerol-3-phosphate-acyl-transferase
GRP	Glycin rich protein
HCD	β-hydroxyacyl-CoA dehydratase
HDG	Homeodomain glabrous
HD ZIP IV	Homeodomain-leucine zipper IV transcription factor
HEN1	Hua enhancer 1
HRGP	Hydroxyprolin rich glycoprotein
HTH	Hothead
InDel	Insertion/deletion polymorphism
JAA	Jour après anthèse
KAS	3-ketoacyl-ACP-synthase
KCS	β-ketoacyl-CoA-synthase
KCR	β-ketoacyl-CoA-reductase
KO	Knock-out
LACS	Long chain acyl-CoA synthase
LCR	Lacerata
LOD	Logarithm of odds
LTP	Lipid transfer protein
LTPG	Glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein
MAH	Mid chain alcane hydroxylase
MCS	Membrane contact site
MG	Mature green
MHG	Mono(10,16-dihydroxyhexadecanoyl)glycerol
MMDB	Micro-Tom mutant database
MP	Membrane plasmique
NBD	Nucleotide binding domain
NGS	Next generation sequencing
nsLTP	Non specific lipid transfer protein
OCL1	Outer cell layer 1
OE	Over expressor
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Polygalacturonase
PLAM	Plastid endoplasmic reticulum associated membranes
PME	Pectin methyl esterase
PRP	Prolin rich protein
p/v	Poids à volume
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
QTL	Quantitative trait locus
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RDR1	RNA-dependant RNA polymerase1
RE	Reticulum endoplasmique
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RMN	Résonance magnétique nucléaire

RNAi	RNA interference
RR	Red ripe
SIA	Substances insolubles à l'alcool
SIFT	Sorting intolerant from tolerant
SGS	Suppressor of gene silencing3
SGN	Solanacae genomics network
SHN	Shine
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSR	Simple sequence repeats
STR	Short tandem repeats
T-DNA	Transfer DNA
TGRC	Tomato genetics resource center
TILLING	Targeting induced local lesions in genomes
TMD	Trans membrane domain
UA	Unité arbitraire
VLC	Very long chain
VLCFA	Very long chain fatty acid
v/v	Volume à volume
WBC	White Brown Complex
WDL	Wilted dwarf and lethal1
WIN	Wax Inducer
WGS	Whole Genome Sequencing
WRI	Wrinkled1
WSD	Wax synthase diacylglycerol acyltransferase
WVa106	West Virginia 106
WXP1	Wax producer1
WT	Wild type

Figures et tables

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : Exemple de fruits de diverses Solanacées

Figure 2 : Paramètres économiques de la production mondiale et française de tomates.

Figure 3 : Comparaison de l'architecture des parties aériennes et des bouquets de plantes de tomate à croissance indéterminée et déterminée.

Figure 4 : Coupe longitudinale d'une fleur de tomate montrant les différentes structures.

Figure 5 : Illustration de fleurs de *Solanum lycopersicum* et de *Solanum peruvianum*.

Figure 6 : Coupe transversale d'un fruit de tomate cerise (*Solanum lycopersicum* Mill. Var. *cerasiformae*).

Figure 7 : Illustration du réseau vasculaire périphérique.

Figure 8: Le développement du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiformae*).

Figure 9 : Composition du fruit de tomate.

Figure 10 : Arbre phylogénétique simplifié comprenant 23 espèces appartenant au groupe *Solanum*.

Figure 12 : Colonisation du milieu terrestre par les plantes.

Figure 13 : Structure cuticulaire des plantes supérieures.

Figure 14 : Localisation des couches « cuticular layer » (CL) et « cuticle proper » (CP) de la cuticule de plantes supérieures.

Figure 15 : Illustration de la transition entre la paroi cellulaire et la cuticule dans les cellules épidermiques.

Figure 16 : Analyse des composés majoritaires des cires cuticulaires.

Figure 17: Illustration de la variété morphologique des cires épicuticulaires chez des plantes supérieures.

Figure 18 : Composition en chaînes aliphatiques, composés cycliques et composés non identifiés des cires épicuticulaires et intracuticulaires de plantes supérieures

Figure 19 : Exemple de structure polymérique de la cutine.

Figure 20 : Illustration du dépôt de subérine dans les cellules de l'endoderme d'une racine.

Figure 21 : Structure de la paroi cellulaire composée de la lamelle moyenne, de la paroi primaire et facultativement, de la paroi secondaire.

Figure 22 : Représentation tri dimensionnelle de l'architecture pariétale et des différents composants de la paroi végétale.

Figure 23 : Représentation schématique des liaisons entre les composants de la paroi pour former une structure rigide.

Figure 24 : Rôle de la paroi dans la morphogénèse cellulaire.

Figure 25 : Illustration de la croissance de la surface cellulaire.

Figure 26 : Représentation schématique de l'orientation des microfibrilles de cellulose néo-synthétisées, déterminant la direction de l'expansion cellulaire.

Figure 27 : Représentation schématique d'une coupe transversale de limbe d'une feuille de dicotylédone.

Figure 28 : Implication des cires cuticulaires dans la résistance à la dessiccation.

Figure 29 : Implication de la cutine dans la résistance à la dessiccation chez le mutant *cyp86a2-1* d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure 30 : Représentation schématique des feuilles fusionnées et structure cuticulaire typique.

Figure 31 : Plantes d'*Arabidopsis* présentant des phénotypes de fusion d'organes.

Figure 32 : Phénotype d'une plante d'*Arabidopsis* transformée avec une cutinase fongique.

Figure 33 : Morphologie des fleurs de *Solanum lycopersicum* de type Micro-Tom sauvage (WT) et du mutant *slcer6*.

Figure 34 : Illustration de l'effet lotus.

Figure 35 : Observation en microscopie électronique d'appressorium et d'adhésion appréssoriale de *Magnaporthe grisea*.

Figure 36 : Induction des mécanismes de défense de la plante par des monomères de cutine sur des cultures de cellules de pomme de terre.

Figure 37 : Induction de la transcription du gène *LIPK* codant pour une protéine kinase de *Colletotrichum trifolii* par des lipides.

Figure 38 : Représentation simplifiée de la décomposition du rayonnement lumineux à travers la cuticule.

Figure 39 : Représentation schématique d'une cellule et des différentes zones de production d'acétyl-coA.

Figure 40 : Vue d'ensemble de la synthèse des acides gras dans les plastes.

Figure 41 : Rôle des thioestérases et devenir des acides gras libres.

Figure 42 : Modes de transport hypothétiques des lipides entre membranes plastidiales et Réticulum Endoplasmique (ER) dans les plantes.

Figure 43 : Zones de contact entre chloroplaste et Réticulum Endoplasmique (RE).

Figure 44 : Le complexe Fatty Acid Elongase (FAE) synthétise les Very Long Chain fatty Acid (VLCFA), de plus de 20 atomes de carbone, par des cycles répétés d'addition de 2 carbones.

Figure 45 : Voie de synthèse simplifiée des composés cireux chez *Arabidopsis thaliana*, avec la voie des alcools primaires et la voies des alcanes.

Figure 46 : Réactions simplifiées possibles catalysées par les enzymes LACS, GPZAT et CYP86A dans la voie de biosynthèse des polyesters de lipides.

Figure 47 : Réactions potentielles permettant d'obtenir les différents monomères de cutine retrouvés chez la tomate.

Figure 48 : Analyse de la cutine de transformants *gpat4*, *gpat5*, *gpat8* et *cyp86a1* d'*Arabidopsis*.

Figure 49 : Représentation schématique d'un transporteur de type ABC et de son fonctionnement.

Figure 50 : Illustration de la structure d'un non specific LTP et d'un GPI-anchored LTP.

Figure 51 : Illustration des voies potentielles de transport des composés cuticulaires.

Figure 52 : Représentation schématique de la protéine GDSL2 de *S. lycopersicum*.

Figure 53 : Modèle proposé d'activité acyltransférase de la protéine SlGDSL2.

Figure 54 : Représentation schématique de la structure polymérique de la cutine.

Figure 55 : Régulation de la biosynthèse cuticulaire.

Figure 56 : Modèle illustrant les rôles de RDR1 et SGS3, composants de la machinerie de RNA-silencing, dans la régulation de la biosynthèse des cires.

Figure 57 : Représentation simplifiée de l'étape de détection de mutation par digestion enzymatique lors d'une stratégie Targeting-Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING).

Figure 58 : Illustration des conséquences d'une déficience cuticulaire sur les propriétés agronomiques du fruit de tomate.

Table 1 : Les six types structuraux de cuticule

Table 2 : Principales classes d'acyl-lipides rencontrées dans les cires cuticulaires et structure générique des composés

Table 3 : Principaux composants des monomères de cutine en C_{16} et C_{18}

Table 4 : Composition des monomères de cutine chez le fruit de *Solanum lycopersicum* var. Ailsa Craig au cours de 3 stades de développement.

Table 5 : Comparaison de l'abondance des monomères communs entrant dans la composition de la cutine et de la subérine.

Table 6: Exemple de perméance (P) de l'eau dans des parois végétales cutinisées.

Table 7 : Gènes reliés à la cuticule exprimés préférentiellement dans l'exocarpe de tomate.

Chapitre 2 : Résultats et discussion

Partie I

Figure 1. Strategy used for the selection of the fruit brightness tomato mutants through the Microtom Mutant Data Base (MMDB) tool.

Figure 2. Total wax load in fruit cuticle from wild type and selected tomato mutants.

Figure 3. Total cutin load in fruit cuticle from wild type and selected tomato mutants.

Figure 4. Hierarchical Clustering Analysis (HCA) plot of the two first principal components showing the 24 mutants and wild type (WT) analyzed for cutin composition of fruit cuticle.

Figure 5. The surface and cuticle from wild type (WT) and selected *glossy* and *dull* mutants fruits at Red Ripe stage.

Figure 6. Cuticle properties of the *glossy* P15C12 cutin-deficient mutant.

Figure 7. Mapping of the P15C12 *glossy* mutant and characterization of the mutation.

Table I. Wax composition of fruit cuticle from wild type and selected tomato mutants.

Table II. Cutin monomer composition of fruit cuticle from wild type and selected tomato mutants.

Table III. Summary of the major locus identified for fruit brightness mutant P15C12 on chromosome 11 between markers 11289_715 and 10722_814.

Supplemental figure S1. Comparison of the fruit brightness of mutants that showed the most extreme wax and cutin compositions.

Supplemental figure S2. Variables factor map for cutin components, after a centered PCA analysis.

Supplemental figure S3. Individual factor map after Principal Component Analysis (PCA) of the wax and cutin compositions.

Supplemental figure S4. Variables factor map for wax and cutin components, after a centered PCA analysis.

Supplemental figure S5. Photograph of fruits from the P26E8 mutant showing suberin deposition at the distal end of the fruit.

Supplemental figure S6. Microscopic observation of fresh pealed outer epidermis from Red Ripe fruit.

Supplemental Figure S7. Phenotyping the F2 progeny from the cross M82d x P15C12.

Supplemental Figure S8. Nucleotide sequences of the primers used in this study.

Supplemental Table S1. Comparison of the plant and fruit brightness data obtained from the MMDB database and from the subsequent observation of the 40 selected families grown in the greenhouse.

Supplemental Table S2. Mean density of fruit epidermal cells in the indicated mutants.

Partie II

Figure 59 : Comparaison de la dessiccation des fruits de Micro-Tom WT et de P17F12.

Figure 60 : Analyse de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cutine sur de la cuticule de fruits de tomate au stade RR, chez Micro-Tom WT et le mutant P17F12.

Figure 61 : Illustration des différences morphologiques entre les fleurs d'une plante Micro-Tom WT et du mutant P17F12.

Figure 62 : Illustration des différences morphologiques entre les fleurs d'une plante Micro-Tom WT et du mutant P17F12.

Figure 63 : Charge totale en cires et en cutine de fruits Micro-Tom WT et du mutant P30B6, au cours du développement.

Figure 64 : Observations de la surface et de la cuticule de fruits Red Ripe de Micro-Tom WT et du mutant P30B6.

Figure 65 : Analyse de la résistance à la dessiccation et du niveau de perméabilité de fruits de tomate Micro-Tom WT et P30B6.

Figure 66 : Analyse de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cutine sur de la cuticule de fruits de tomate au stade RR, chez Micro-Tom WT et le mutant P30B6.

Figure 67 : Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6.

Figure 68 : Evaluation de la perméabilité réalisée sur des fruits de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6.

Figure 69 : Mesures de dessiccation réalisées sur des fruits RR de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6.

Figure 70 : Analyse de la largeur des cadres de cutine et de la charge en cutine par GC-MS sur cuticule isolée.

Figure 71 : Mesures de la largeur des cadres de cutine réalisées sur les fruits des plantes de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6.

Figure 72 : Représentation schématique des chromosomes de la tomate avec le positionnement des 68 marqueurs SNP.

Figure 73 : Charge totale en cires et en cutine de la cutine de fruits Micro-Tom WT et de P23F12, au cours du développement.

Figure 74 : Analyse de la résistance à la dessiccation et du niveau de perméabilité de fruits de tomate Micro-Tom WT et P23F12.

Figure 75 : Analyse de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cutine dans des cellules épidermiques de fruits WT et P23F12, au stade 20 DPA.

Figure 76 : Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P23F12.

Figure 77 : Evaluation de la perméabilité réalisée sur des fruits de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P23F12.

Figure 78 : Mesures de dessiccation réalisées sur des fruits RR de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P23F12.

Figure 79 : Mesures de la largeur des cadres de cutine réalisées sur les fruits des plantes de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P23F12.

Figure 80 : Représentation schématique des chromosomes de la tomate avec le positionnement des 49 marqueurs SNP.

Figure 81 : Représentation schématique du chromosome N°9 de la tomate. A. Positionnement des 12 marqueurs SNP utilisées lors de l'analyse QTL par MapMaker QTL.

Figure 82 : Niveau d'expression de *CYP71B35* chez Micro-Tom.

Figure 83 : Niveau d'expression du gène *CYP71B35* dans l'épiderme de fruits au stade MG du Micro-Tom WT et du mutant P23F12.

Figure 84 : Phénotypage de la population F2 issue du croisement entre Micro-Tom WT et le mutant P23F12.

Table 8 : Résultats de l'analyse QTL par MapMaker et MapMaker QTL pour la population F2 M82 dwarf x P30B6.

Table 9 : Résultats de l'analyse QTL par MapMaker et MapMaker QTL pour la population F2 M82 dwarf x P23F12.

Chapitre 3 : Perspectives

Figure 85 : Positionnement des mutations sur la séquence génomique de *SlGDSL2*.

Figure 86 : Analyses phénotypiques et biochimiques préliminaires des mutants P4H12 et P5B12, au stade RR.

Figure 87 : Analyse de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cutine, à partir de cellules épidermiques de fruits de tomate à 20 JAA.

Figure 88 : Positionnement des mutations sur la séquence génomique de *SlnsLTP2*.

Figure 89 : Analyses phénotypiques préliminaires des mutants atteints au niveau du gène *SlnsLTP2*, appartenant aux familles P6B8, P9E12, P48E10 et P2F2.

Figure 90 : Positionnement de la mutation sur la séquence génomique et codante de *SlCYP86A69*.

Figure 91 : Caractérisation de la cuticule du mutant *Slcyp86a69*.

Figure 92 : Analyses phénotypiques préliminaires au stade BC1 F2 du mutant *Slcyp86a69*.

Figure 93 : Analyses phénotypiques préliminaires du double mutant *nsltp2* x *Slcyp86a69*.

Figure 94 : Analyses phénotypiques préliminaires du double mutant *Slcyp86a69* x *gdsl2-b*.

Figure 95 : Analyses phénotypiques préliminaires du double mutant *nsltp2* P48E10 x *gdsl2-b*.

Figure 96 : Analyses phénotypiques préliminaires du double mutant *nsltp2* P6B8 x *gdsl2-b*.

Table 10 : Série allélique du gène *SlGDSL2* issue de l'analyse de 6912 familles M2 de la collection Micro-Tom EMS.

Table 11 : Série allélique du gène *SlnsLTP2* issue de l'analyse de 7296 familles M2 de la collection Micro-Tom EMS.

Table 12 : Effet de la mutation affectant la famille P26E4 au niveau du gène *SlCYP86A69*, au niveau nucléotidique et protéique.

Table 13: Liste des monomères de cutine isolés enzymatiquement après dépolymérisation, avec leurs concentrations respectives.

Conclusions générales

Figure 97 : Exemple de fruits de tomate affectés au niveau de leur aspect de surface identifiés dans la collection EMS Micro-Tom Bordeaux.

Matériel et méthodes

Table 14 : Liste des marqueurs de type SNP entre M82 et Micro-Tom (Shirasawa *et al*, 2010) sélectionnés pour les études de cartographie.

Table 15: Séquences des amorces utilisées pour le crible de la collection Micro-Tom EMS, pour les gènes *SlnsLTP2* et *SlGDSL2*.

Table 16: Numéros d'accessions et informations sur les séquences des amorces utilisées en RTPCR Quantitative. Les numéros d'accessions sont indexés dans les bases de données du SOL Genomics Network (http://www.sgn.cornell.edu) et du TAIR Arabidospsis Information Resource (http://www.arabidpsis.org).

Table 17: Séquences des amorces utilisées pour l'analyse du taux d'expression du gène *SlCYP71B35*

Table 18: Séquences des amorces utilisées pour l'analyse de l'ADN génomique de *SlCYP71B35* et *SlCYP86A69.*

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction 1

1. La tomate 1
1.1 Historique 1
1.2 Importance économique 2
1.3 Importance nutritionnelle 3
1.4 La tomate, plante modèle des fruits charnus 3
1.5. Développement du plant et du fruit de tomate 4
1.5.1. Schéma développemental du plant de tomate 4
1.5.2. Structure et développement du fruit de tomate 5
1.5.2.1 Structure de la fleur 5
1.5.2.2 Structure du fruit 5
1.5.2.3 Développement du fruit de tomate 6
1.6 Caractères de qualité du fruit 9
1.6.1. Spécificité des filières 9
1.6.2 Composition du fruit et qualités organoleptiques 10
1.6.3 Outils d'amélioration de la qualité des fruits 11

2. La cuticule 13
2.1 Un élément clé de la colonisation du milieu terrestre par les plantes 13
2.2 Organisation et composition de la cuticule 14
2.2.1 Cires 15
2.2.2 Cutine 17
2.2.3 Cutane 18
2.2.4 Subérine 18
2.2.5 L'autre matrice extracellulaire : la paroi 19
2.2.5.1 Nature de la paroi 19
2.2.5.2 Composition 20
2.3 Fonctions biologiques des matrices extracellulaires 22
2.3.1 Paroi 22
2.3.1.1 Rigidité cellulaire et structure de la plante 22
2.3.1.2 Développement et croissance cellulaire 22
2.3.1.3. Maturation du fruit 23
2.3.1.4 Production de molécules signales 24
2.3.2 Cuticule 24
2.3.2.1 Limitation des pertes en eau et solutés 25
2.3.2.2 Organogénèse 26
2.3.2.3 « Effet lotus » 28
2.3.2.4 Barrières contre les pathogènes et les ravageurs 28
2.3.2.5. Production de molécules signales 30
2.3.2.6 Propriétés optiques et protection contre les UV 31
2.3.2.7 Propriétés biomécaniques du fruit 31
2.4 Biosynthèse de la cuticule 33
2.4.1 Acétyl-CoA 33
2.4.2 Synthèse des acides gras 33
2.4.2.1 Localisation 33
2.4.2.2 Cycle de synthèse itératif 34
2.4.2.2 Fin du cycle 35
2.4.2.3 Export 35
2.4.3 Synthèse des cires cuticulaires 36
2.4.3.1 Complexe d'élongation 37

2.4.3.2 Modifications des chaînes aliphatiques 38
2.4.4 Synthèse des monomères de cutine 39
2.4.4.1 Acyl activation 39
2.4.4.2 Hydroxylation 40
2.4.4.3 Estérification à un glycérol 40
2.4.5 Transports des composés cuticulaires 41
2.4.5.1 Export des cires 42
2.4.5.2 Export des monomères de cutine 42
2.4.6. Polymérisation de la cutine 43
2.4.7 Régulation de la biosynthèse cuticulaire 44
2.4.7.1 Régulation hormonale et environnementale. 44
2.4.7.2 Facteurs de transcription 45
2.4.7.3 Régulations post-transcriptionnelles 46

3. Recherche de mutations 47
3.1 Collections de mutants 48
3.2 Génétique inverse 49
3.3 Génétique directe et cartographie 50

Chapitre 2 : Résultats & discussion 56

Partie I
L'analyse de mutants de tomate affectés au niveau de la brillance du fruit révèle des mutants avec un déficit en cutine, des mutants riches en cutine et un nouvel allèle hypormophique de *GDSL Lipase.* 56

Chapitre 2 : Résultats & discussion 92

Partie II 92

Etude de 3 mutants cuticulaires remarquables issus du criblage de la collection EMS Micro-Tom 92

1. Mutant P17F12 92
1.1 Analyse de la résistance à la dessiccation 93
1.2 Analyse de l'expression des gènes cuticulaires chez P17F12 94
1.3 Analyses morphologiques des fleurs et des fruits de P17F12 98

2. Mutant P30B6 99
2.1 Cinétique d'accumulation des composés cuticulaires au cours du développement 99
2.2 Caractérisation cytologique de P30B6 101
2.3 Propriétés de la cuticule du mutant P30B6 102
2.3.1 Résistance à la dessiccation 102
2.3.2 Perméabilité cuticulaire 102
2.4 Analyse de l'expression des gènes cuticulaires 103
2.5 Cartographie de la mutation 105
2.5.1 Phénotypage de la brillance 105
2.5.2 Phénotypage de la perméabilité 106
2.5.3 Résistance à la dessiccation 106
2.5.4 Largeur des cadres de cutine 107
2.5.5 Analyse Quantitative Trait Loci (QTL) de la population F2 M82 dwarf x P30B6 108

3. Mutant P23F12 **108**
3.1 Cinétique d'accumulation des composés cuticulaires au cours du développement 109
3.2 Propriétés de la cuticule du mutant P23F12 110
3.2.1 Résistance à la dessiccation 110
3.2.2 Perméabilité cuticulaire 111
3.3 Analyse de l'expression des gènes cuticulaires 111
3.4 Cartographie de la mutation 113
3.4.1 Phénotypage de la brillance 113
3.4.2 Phénotypage de la perméabilité 113
3.4.3 Résistance à la dessiccation 114
3.4.4 Largeur des cadres de cutine 114
3.4.5 Analyse Quantitative Trait Loci (QTL) de la population F2 M82 dwarf x P23F12 115
3.5 Approche gène candidat - QTL 116
3.5.1 Analyse de la séquence de *CYP71B35* 117
3.5.2 Analyse de l'expression de *CYP71B35* 118
3.5.3 Recherche d'une mutation nucléotidique en *cis* 118
3.6 Approche Next Generation Sequencing (NGS) - Mapping 118

4. Conclusions sur l'étude des mutants cuticulaires **120**
4.1 Choix des caractères phénotypiques liés à la cuticule 120
4.2 Approche combinée cartographie génétique/ gène candidat-QTL 122

Chapitre 3 : Perspectives **124**

Mise en place d'un réseau de mutants pour étudier les relations entre biosynthèse et transport de la cuticule chez le fruit de tomate **124**

1. Recherche de mutants alléliques SlGDSL2 **126**
1.1 Détection de mutants *SlGDSL2* dans la collection Micro-Tom EMS 126
1.2 Analyses préliminaires 127

2. Lien potentiel entre cutine synthase et transporteur de lipide ? **128**

3. Recherche de mutants alléliques SlnsLTP2 **129**
3.1 Détection de mutants *SlnsLTP2* dans la collection Micro-Tom EMS 130
3.2 Analyses phénotypiques au stade BC1 F2 131

4. Mutant *Slcyp86a69* **131**
4.1 Caractérisation du mutant *Slcyp86a69* 131
4.2 Analyses phénotypiques au stade BC1 F2 132

5. Création de double mutants **133**
5.1 Double mutant « synthèse RE + transport » 133
5.2 Double mutant « synthèse RE + polymérisation » 134
5.3 Double mutant « transport + polymérisation » 134
5.4 Double mutants non identifiés 135

Conclusions générales **137**

Matériel et méthodes **140**
1. Matériel végétal 140
2. Cartographie 140
3. Caractérisation de la brillance 141

4. Mesures de la résistance à la dessiccation 141
5. Mesures de la perméabilité cuticulaire 142
6. Analyses des cires cuticulaires 142
7. Analyses des monomères de cutine 142
8. Microscopie optique 143
9. Observation de la surface de l'épiderme par microscopie électronique à balayage de type environnemental (ESEM) 144
10. Recherche de mutants Micro-Tom par Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) 144
11. Analyses en Reverse Transcription PCR Quantitative 145
12. Analyse de séquences génomiques 146
13. NGS-Mapping 146
14. Spectroscopie Fourier Transform infrared (FTIR) 147

Références bibliographiques 148

Chapitre 1

Introduction

Figure 1 : Exemple de fruits de diverses Solanacées. A. tomate (*Solanum lycopersicum*) ; B. belladone (*Atropa belladonna*, crédit photo GFDL Jeantosti); C. mandragore (*Mandragora officinarum,* crédit photo H. Kresse).

Chapitre 1 : Introduction

1. La tomate

1.1 Historique

La tomate est une solanacée, vaste famille de plantes dicotylédones regroupant des plantes herbacées, des arbres, des arbustes ou des lianes. Les solanacées comprennent près de 98 genres et 2700 espèces, occupant une grande diversité de morphologie, d'écologie et d'habitat puisqu'à l'exception de l'Antarctique, ses membres sont présents sur tous les continents. Cependant, c'est en Amérique du Sud et en Amérique Centrale que l'on rencontre le plus grand nombre d'espèces, aussi bien alimentaires (pomme de terre, tomate, aubergine ou piments) qu'ornementales (pétunia, *Schizanthus*, *Salpiglossis*, datura…). Certaines espèces, riches en alcaloïdes, sont mondialement connues pour leurs usages médicinaux, leurs effets psychotropes ou pour leur toxicité : belladone, morelle, brugmansia, datura, mandragore ou encore, le tabac. Pratiquement toutes les formes cultivées de tomate appartiennent à l'espèce *Solanum Lycopersicum* et les espèces sauvages apparentées proviennent des Andes péruviennes sur une région couvrant la Colombie, l'Equateur, le Pérou, la Bolivie et le Chili. La tomate cerise «*Solanum lycopersicum* var. *cerasiformae»* est la sous-espèce qui paraît la plus proche de la forme ancestrale de la tomate cultivée ; elle pousse à l'état sauvage dans toute l'Amérique du Sud. Cependant, le centre de domestication de la tomate semble avoir été identifié au Mexique où les fruits montrent une grande variété de forme, de taille et de couleur (Hobson et Grierson, 1993). Le nom même de la tomate est hérité de ses origines amérindiennes puisque l'étymologie du terme tomate vient d'un dialecte apparenté aux aztèques, le nahuatl, qui désignait le fruit de la tomatille (*Physalis ixocarpa*) en tant que *tomatl*.

Cette appartenance à la famille des solanacées explique qu'au XVIème siècle, quand les conquistadores ramenèrent des graines de tomate en Europe, cette plante fut cantonnée à un rôle ornemental et même lié au monde de la sorcellerie. En effet, la tomate fut d'abord appelée pomme d'or (certaines variétés portaient des fruits de couleur jaune) ou pomme d'amour de par sa ressemblance avec ses cousines la mandragore (à laquelle on prête des vertus aphrodisiaques) ou la belladone (toxique) (figure 1). Elle fut aussi appelée « pomme malsaine », peut être en raison de la forte odeur exhalée par les tiges, les feuilles et les fruits. En 1753, le naturaliste suédois Carl Von Linné, fondateur du système moderne de la nomenclature binomiale, rebaptise la tomate en *Solanum lycopersicon*, du grec *Lycos* (loup) et du latin *persica* (pêche), la pêche de loup. Progressivement, la tomate va acquérir un

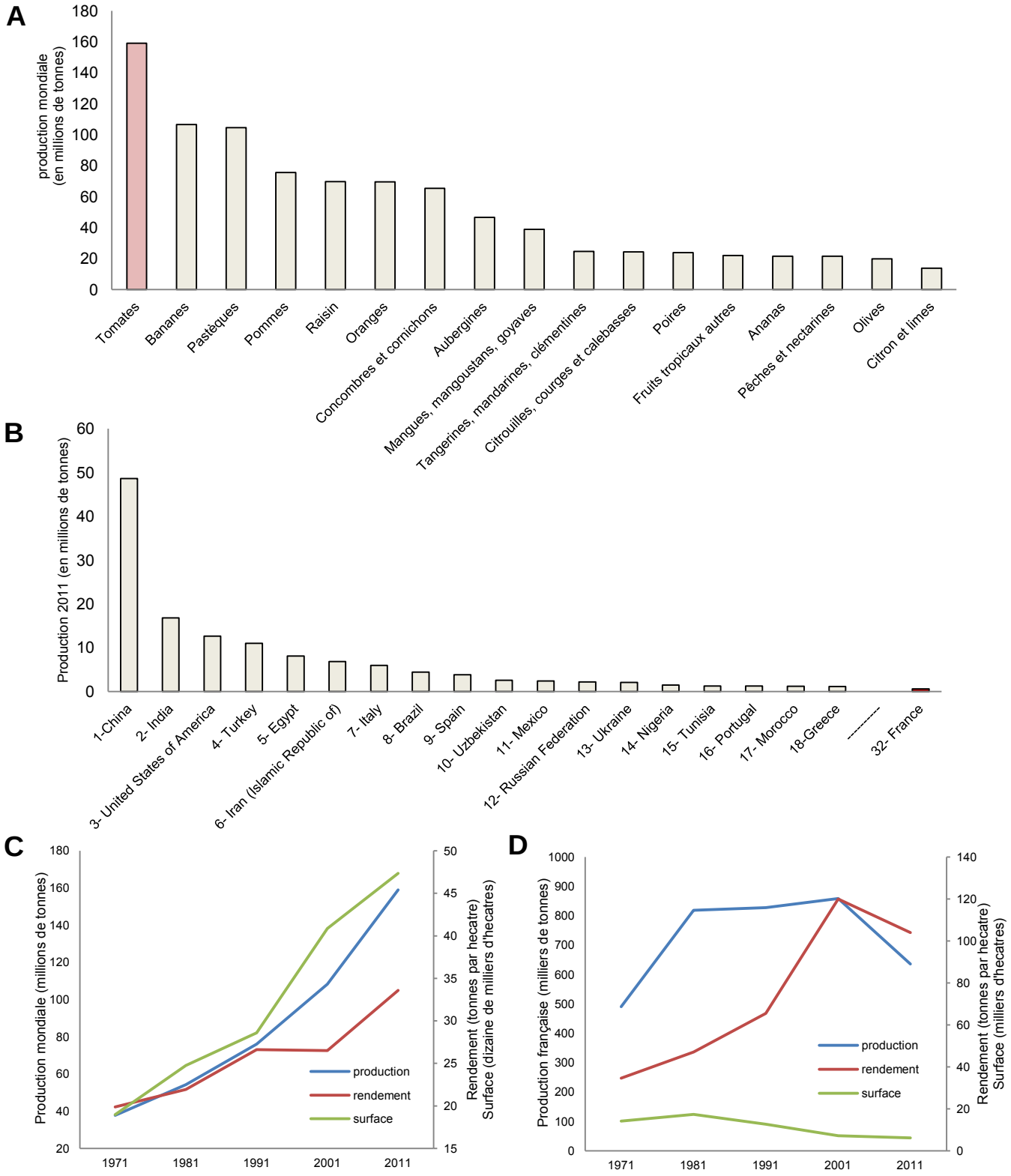


Figure 2 : Paramètres économiques de la production mondiale et française de tomates. A. Production mondiale des principaux fruits ou groupes de fruits en 2011, exprimée en millions de tonnes. B. Classement mondial des pays producteurs de tomates en 2011 (production en millions de tonnes). C et D. Evolution de la production de tomate, du rendement moyen et de la superficie cultivées dédiées sur les 40 dernières années, dans C. le monde et D. en France. Les données sont issues de la section statistique de la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT : http://www.fao.org/statistics/fr/)

caractère comestible et ce n'est qu'au bout de 250 ans qu'elle va apparaitre dans la catégorie « plante potagère » du catalogue Vilmorin-Andrieux (1778). A partir du XIXème siècle, la culture de la tomate sort d'Italie pour s'implanter en Europe du Nord (Pays-Bas, Belgique), dans les pays du Maghreb, en Egypte (qui assurera dès 1880 l'exportation des tomates hors saisons en Europe) et en Amérique du Nord par les colons anglais.

1.2 Importance économique

La figure 2 présente les paramètres économiques relatifs à la production mondiale de tomate. La production en 2011 s'élevait à plus de 159 millions de tonnes, ce qui la place au 1er rang en termes de production fruitière (figure 2A), devant la banane (106 millions de tonnes) et la pastèque (104 millions de tonnes). Le raisin et l'orange ne se classent que 5 et 6ème avec des productions similaires aux alentours de 69,6 millions de tonnes. Environ la moitié de la production de tomate est destinée au marché de frais, l'autre moitié aux industries de transformation (sauce, coulis, ketchup…etc.). Le principal producteur de tomate est la Chine (figure 2B) avec 48,5 millions de tonnes par an, suivie loin derrière par l'Inde (16,8 millions de tonnes) et les Etats-Unis (12,6 millions de tonnes). La France est un pays producteur de moindre importance avec une production annuelle de 635000 tonnes en 2011, ce qui la classe au 32ème rang mondial. La production mondiale ne cesse d'augmenter et double tous les 10 ans, de façon constante depuis 40 ans (figure 2C). L'amélioration des rendements permet d'expliquer une partie de cette augmentation, même si une stagnation a été observée entre 1991 et 2001. Cependant, la surface agricole dédiée à la culture de la tomate a doublé également tous les 10 ans, ce qui a permis d'assurer la progression de la production mondiale. Il est intéressant de comparer cette évolution globale à celle de la filière française (figure 2D). On y observe depuis une dizaine d'années une baisse de la production moyenne, couplée à un arrêt de l'augmentation des rendements et une baisse des surfaces dédiées. Cette évolution pourrait faire penser à une baisse de la demande des consommateurs mais qui n'est pas traduite par une baisse des importations, stabilisées à 500000 tonnes par an depuis plusieurs années. Il semble que les producteurs français de tomates s'adaptent plutôt à la concurrence en misant sur des filières à plus hautes valeurs ajoutées (agriculture biologique, variétés anciennes, filières de proximité par exemples). L'importation de tomate concerne en partie le secteur de la transformation, la tomate étant au premier rang des légumes transformés par l'industrie agro-alimentaire en France. Cependant, le marché de frais reste très porteur puisque la consommation augmente régulièrement tous les ans, elle a doublé en France au cours des 30 dernières années. Si on considère la consommation en kg par habitant et par an, ce sont les populations du bassin méditerranéen qui en consomment le plus. Un français en consomme en moyenne 25 kg par an, occupant ainsi la douzième position au niveau de l'Europe, loin derrière les Grecs dont la

consommation annuelle est de 135 kg (FAO, 2006). A l'heure actuelle, le fruit de tomate occupe une part de plus de 20 % dans la consommation de légumes frais de la population française, mettant en lumière son impact nutritionnel.

1.3 Importance nutritionnelle

Dans la nutrition humaine, il est reconnu qu'une alimentation variée et riche en fruits et légumes frais permet de diminuer les risques de maladies cardiovasculaires et de cancers (Giovannucci, 1999; Hall *et al.*, 2008). Conscient des enjeux associés au domaine de la santé publique, l'Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé (INPES) a mis en place en 2001 le Programme National Nutrition Santé (PNNS) dont les mesures, qui concernent les habitudes alimentaires de la population, visent à encourager la consommation des produits frais. Selon cette étude, 7 % à 31 % des cancers pourraient être évités par une consommation quotidienne d'au moins 400 g de fruits et de légumes (http://www.sante.gouv.fr). La valeur calorifique de la tomate est relativement faible, environ 20 calories pour 100 g, elle est pauvre en lipides, exempte de cholestérol, et l'eau représente environ 94% de sa matière fraîche. La tomate est riche en provitamine A (β-carotène), vitamine C et surtout en lycopène, antioxydant le plus actif des caroténoïdes alimentaires (Agarwal et Rao, 2000), qui donne sa couleur rouge à la tomate mûre.

1.4 La tomate, plante modèle des fruits charnus

L'intérêt porté à la tomate n'est pas réduit à son aspect commercial. En effet, elle est considérée comme une plante modèle pour l'étude du développement des fruits charnus. Les processus associés au développement du fruit et son mûrissement sont très différents d'un point de vue génétique et métabolique de ceux décrits chez la plante modèle *Arabidospis thaliana*. La culture de la tomate peut s'effectuer en enceinte climatique où elle peut se développer et produire des fruits toute l'année ; elle fournit un matériel biologique important (feuilles, fruits, racines…) et son cycle de développement est aux alentours de 120 jours. De nombreuses données, des ressources génétiques, moléculaires et biochimiques sont disponibles et accessibles à la communauté scientifique. De plus, l'existence d'un réseau scientifique structuré autour des solanacées, le SOL Genomics Network (http://solgenomics.net), regroupant 23 pays du monde entier, permet de centraliser et de mettre à disposition de la communauté une immense quantité d'informations scientifiques : cartes génétiques et marqueurs, gènes, phénotypes, voies enzymatiques et depuis le 31 mai 2012, le génome annoté de *Solanum lycopersicum* (Tomato Genome Consortium, 2012). Ce génome diploïde a une taille de 900 Mb, et comprend 35000 gènes environ répartis sur 12 chromosomes. L'évolution des technologies d'analyses à grande échelle (transcriptome, métabolome, protéome…etc) combinée au développement d'outils d'intégration des données

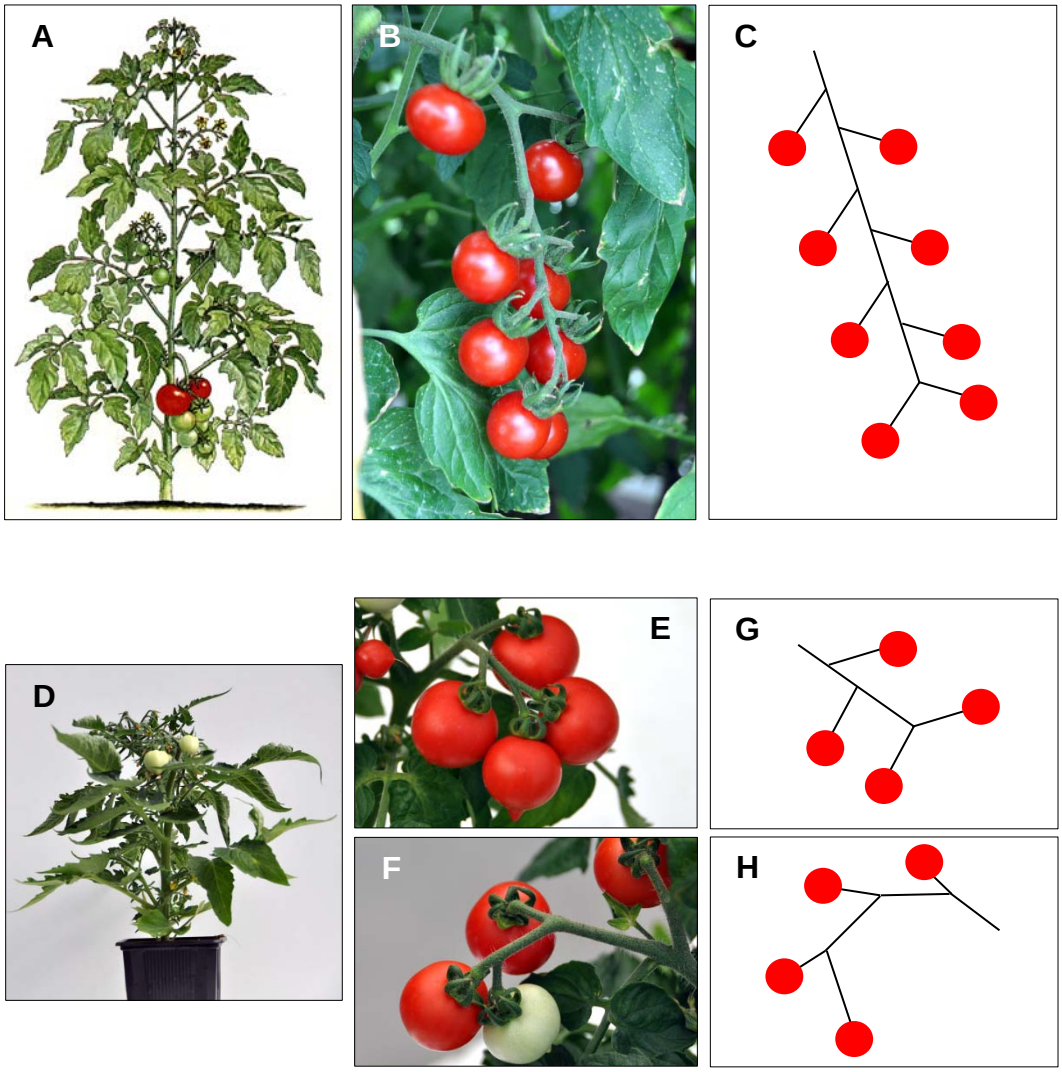


Figure 3 : Comparaison de l'architecture des parties aériennes et des bouquets de plantes de tomate à croissance indéterminée et déterminée. (A, B, C) Plante à croissance déterminée, exemple de *Solanum lycopersicum cerasiformae Mill. West Virginia 106 (WVa106).* (D, E, F, G, H) Plante à croissance déterminée, exemple de *Solanum lycopersicum* type Microtom. Représentation de la partie aérienne de la plante de tomate WVa106 (A) et illustration de celle de Microtom (D). Illustration des bouquets (B, E, F) et représentation de leurs architectures (C, G, H).

peut permettre d'explorer les relations fines existant entre gènes et métabolites par exemple, de prédire des corrélations et *in fine*, d'identifier de nouveaux gènes.

1.5. Développement du plant et du fruit de tomate

1.5.1. Schéma développemental du plant de tomate

La tomate est une plante herbacée dont le développement végétatif se caractérise par une architecture sympodiale. Ce modèle spécialisé de croissance latérale induit une limitation du méristème apical qui peut soit créer une inflorescence, soit avorter. La croissance se poursuit par un méristème latéral, lequel répète à son tour le même processus. La tige, résultant de méristèmes multiples, semble être continue mais pousse en fait en zigzags plus ou moins prononcés.

Il existe 2 types de variétés de tomate, classés suivant leur modèle de croissance, en fonction du schéma de développement de la tige principale.

On parle de plante à croissance déterminée ou indéterminée (figure 3). Chez les variétés indéterminées, l'extension de la tige est continue et consiste en une série de tiges latérales terminées par une inflorescence, permettant une floraison pendant toute la vie de la plante. La phase végétative, pendant laquelle 6 à 8 feuilles sont initiées, correspond à la période qui précède l'initiation de la première inflorescence. Des facteurs tels que de fortes intensités lumineuses, de faibles densités de plantation ou des concentrations en CO2 élevées peuvent concourir à une augmentation de la production d'assimilats, saccharose notamment. La durée de la phase végétative peut s'en trouver alors réduite et le nombre de feuilles initiées à cette période augmenté (Dieleman et Heuvelink, 1992). Suite à la transformation de l'apex en inflorescence, un bourgeon latéral se développe alors à l'aisselle de la dernière feuille, repoussant l'inflorescence vers le côté. Après l'initiation de 3 ou 4 feuilles, la tige latérale se termine à son tour par une inflorescence et un nouvel axe latéral assure à nouveau le développement de la tige (Calvert, 1965). En ce qui concerne la structure des inflorescences, chez la tomate cerise WVa 106, les rameaux forment une grappe et alternent régulièrement, dans un même plan (figure 3B et 3C). On parle de cyme unipare en éventail.

Chez une variété déterminée telle que Micro-Tom, l'extension de la tige se termine au moment de l'initiation de la première inflorescence. Des tiges axillaires se développent alors de manière à former une plante de type buisson. La floraison est concentrée sur une période limitée suivie d'une période de croissance des fruits. Les inflorescences sont en grappe mais peuvent être de 2 types chez la variété Micro-Tom, soit une cyme unipare en éventail (figure 3E et 3G), soit une cyme unipare scorpioïde (figure 3F et 3H), modèle caractérisé par un

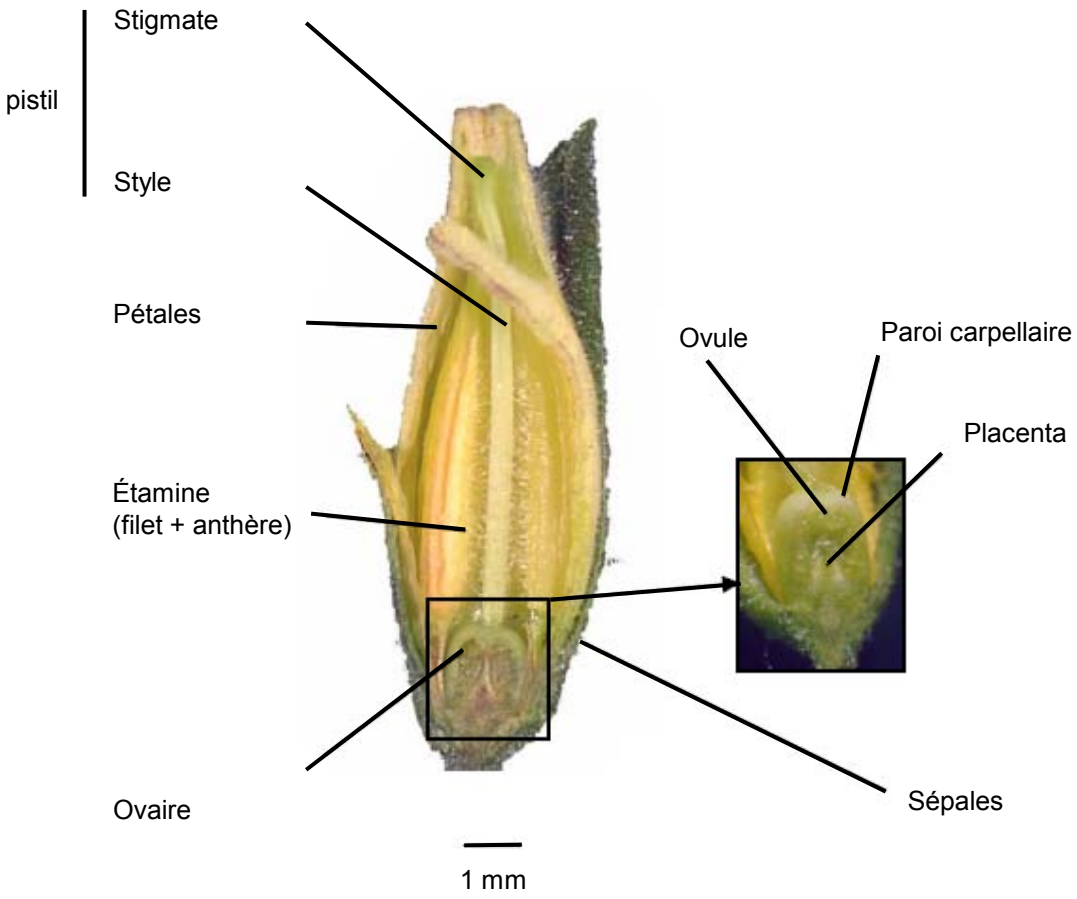


Figure 4 : Coupe longitudinale d'une fleur de tomate montrant les différentes structures telles que l'ovaire, les étamines, le pistil, les pétales et les sépales.

Figure 5 : Illustration de fleurs de *Solanum lycopersicum* et de *Solanum peruvianum*. La longueur du style très différente entre ces 2 espèces de tomate peut être associée à des comportements reproducteurs différents.

développement des rameaux dans un même plan et du même côté. La cyme unipare s'enroule alors en spirale.

1.5.2. Structure et développement du fruit de tomate

Suite à « l'induction florale », c'est à dire la conversion du méristème végétatif en méristème inflorescentiel, une grappe est mise en place, constituée de 6 à 10 méristèmes floraux.

1.5.2.1 Structure de la fleur

Les pièces florales de la tomate sont organisées en groupes d'organes disposés en rayons autour d'un axe central, le pédicelle. Ces groupes d'organes sont appelés verticilles. Le périanthe correspond aux 2 premiers verticilles, constitués des organes stériles : le calice comprend les 5 sépales et la corolle, les 5 pétales. Le troisième verticille est l'androcée, composé des 5 étamines, eux-mêmes constitués d'un filet supportant l'anthère (figure 4). Un pistil, formé généralement de 2 carpelles soudés, et renfermant l'ovaire forme le gynécée, le quatrième verticille. L'ovaire contient les ovules, hermétiquement enfermés sous une paroi carpellaire, typique des angiospermes.

Les tomates cultivées sont le plus généralement autogames. Cette autogamie est la conséquence de la morphologie de la fleur, présentant un pistil court, enfermé dans le cône staminal, avec une déhiscence introrse des anthères, c'est-à-dire vers l'intérieur de la fleur. Cette autogamie n'est pas stricte chez la tomate puisque certaines variétés anciennes présentent des diversités de morphologie assez marquées, autorisant des fécondations extérieures (figure 5). Après la fécondation, l'ovaire va évoluer pour donner naissance au fruit.

1.5.2.2 Structure du fruit

Le fruit de tomate est composé du péricarpe (peau et partie charnue) et de la pulpe (placenta et graines) qui renferme les graines (figure 6).

Le péricarpe provient de la différenciation des parois carpellaires de l'ovaire. Il peut être divisé en péricarpe externe, péricarpe radial ou « septum » (qui divise le fruit en plusieurs locules) et péricarpe interne ou « columelle ». Le péricarpe externe est constitué de l'épicarpe (peau du fruit), du mésocarpe (partie charnue) et de l'endocarpe qui délimite les locules. L'épicarpe est composé d'une couche externe, l'épiderme, recouverte en surface d'une cuticule lipidique, et de 2 à 4 couches internes de cellules, l'hypoderme.

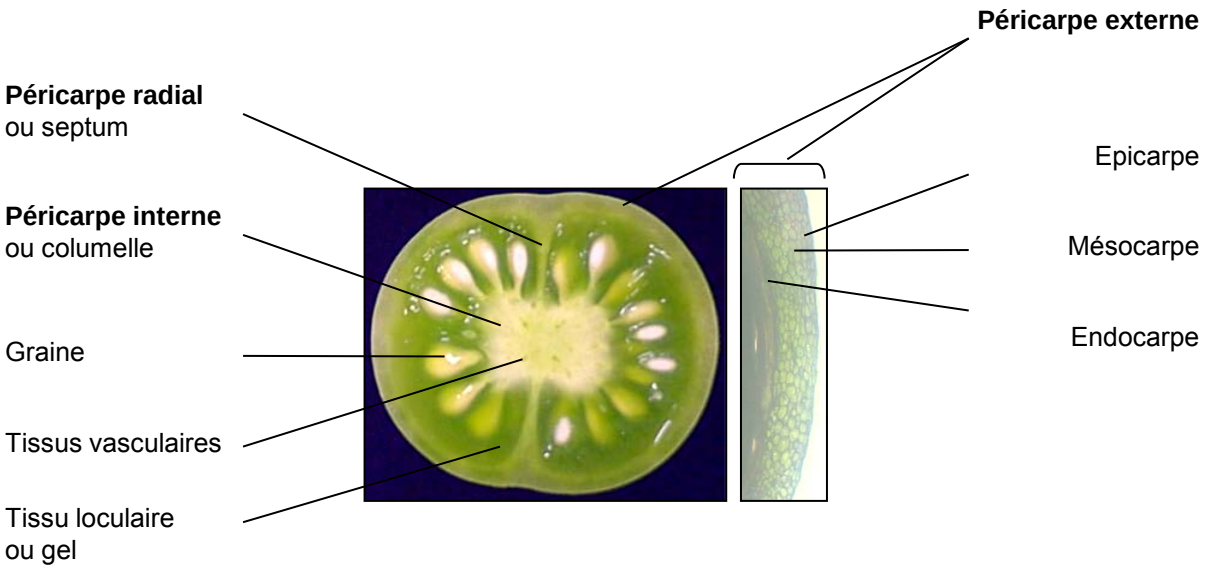


Figure 6 : Coupe transversale d'un fruit de tomate cerise (*Solanum lycopersicum* Mill. Var. *cerasiformae*). Les différents tissus du fruit sont indiqués : péricarpe externe (épicarpe, mésocarpe, endocarpe), péricarpe radial ou septum, péricarpe interne ou columelle, cavités loculaires contenant les graines et le gel.

Figure 7 : Illustration du réseau vasculaire périphérique, observable chez le mutant Colourless non-ripening (Cnr) qui présente une perte d'adhésion cellulaire dans le péricarpe. (d'après G. Seymour, Université de Warwick).

Le placenta, à partir duquel se développent les ovules, évolue et s'étend dans les locules. Dans le fruit immature, le placenta est ferme et compact puis progressivement, à partir du stade Mature Green (MG), les parois des cellules placentaires sont dégradées. Le tissu loculaire devient alors gélatineux et homogène (on le désigne sous le terme de gel) et il finit par remplir la cavité loculaire. Les ovules fécondés vont évoluer pour donner naissance aux graines dans lesquelles va se former l'embryon.

Les tissus vasculaires s'organisent en 2 réseaux distincts. Le premier part du pédicelle à travers le péricarpe externe de manière plus ou moins parallèle à la périphérie du fruit (figure 7), le second passe à travers la columelle et le péricarpe interne pour se diriger vers les graines.

1.5.2.3 Développement du fruit de tomate

Dans des conditions de cultures optimales, la mesure du diamètre du fruit au cours du développement de la tomate décrit une sigmoïde (figure 8B) et l'organogénèse du fruit peut être divisée en quatre phases successives (Gillaspy *et al*., 1993) (figure 8A). Après la fécondation de l'ovaire, le fruit présente une phase de croissance lente durant laquelle l'activité mitotique dans l'ovaire est intense (phase de division), puis une phase de croissance rapide qui correspond à l'expansion des cellules du fruit (phase d'expansion) et enfin, une phase finale de croissance lente qui correspond aux modifications biochimiques et physiologiques du mûrissement. Suite à la mise à fruit, les 2 premières phases de croissance sont regroupées sous le terme de développement précoce du fruit de tomate. La fécondation des ovules, ainsi que le développement des embryons, assureraient le déclenchement et le maintien des processus de développement du fruit en induisant de multiples signalisations hormonales (Gillaspy *et al.*, 1993 ; Vriezen *et al.*, 2008). Au cours du mûrissement, et sous l'influence de l'éthylène, le fruit subit de nombreuses modifications biochimiques qui aboutissent à un fruit coloré et sucré.

La mise à fruit

Cette première étape correspond au développement de l'ovaire afin d'assurer une pollinisation efficace des ovules par le pollen de la fleur. Une fois ces tissus mis en place, la croissance de l'ovaire et des ovules cesse et la sénescence de ces structures survient si aucun évènement de pollinisation n'a lieu. En effet, la transformation de l'ovaire en fruit est directement liée à l'efficacité de la fécondation puisque les hormones qui serviront au développement du fruit sont produites par les seules graines viables. Si le taux de fécondation est trop faible, l'effet sur le fruit peut se traduire par une taille réduite ou un avortement.

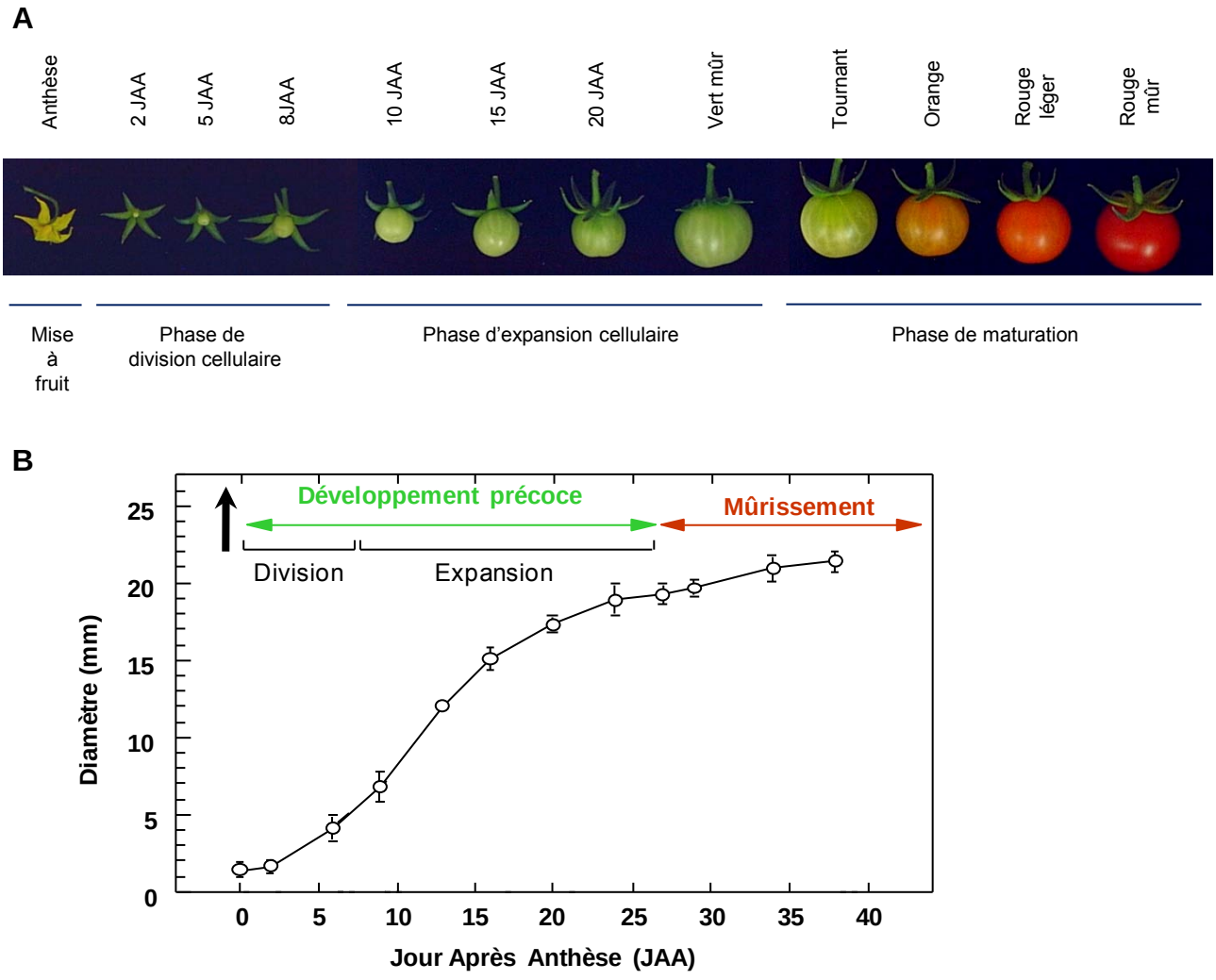


Figure 8: Le développement du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* var. cerasiformae*)*
A. Fleurs et fruits de tomate à différents stades de développement. JAA : jours après anthèse
B. Diamètre du fruit au cours des 3 phases de développement. La flèche verticale symbolise la mise à fruit.

La fécondation fait suite à la déhiscence des anthères et à la libération du pollen. Comme les tomates cultivées sont généralement autogames, la pollinisation et la fécondation sont très rapprochées et s'avèrent difficile à séparer dans le temps. L'ensemble de ces phénomènes est souvent regroupé sous le terme d'anthèse.

La phase de division cellulaire

La fécondation des ovules déclenche l'entrée dans une nouvelle phase de développement du fruit, la phase de **division cellulaire**. Elle se caractérise par une reprise intense des activités de division cellulaire, qui se poursuivent jusqu'à 7 à 10 jours après anthèse (JAA). Cependant ces divisions ne sont pas uniformes au sein du fruit. Dans les jours qui suivent l'anthèse (de 2 à 4 JAA), l'épiderme, le péricarpe et le placenta sont les premiers tissus à se développer par divisions cellulaires. Dans le péricarpe, les divisions en orientation périclinale (dont le plan de division est parallèle à la surface du fruit) entraînent l'augmentation du nombre de couches cellulaires, alors que les divisions anticlinales (perpendiculaires à la surface du fruit) augmentent le nombre de cellules par assises. Entre 4 et 6 JAA, la partie externe du péricarpe et le placenta restent des zones de divisions actives. A partir de 6 JAA, les divisions survenant au niveau de la couche externe du placenta donnent naissance au tissu loculaire qui commence ainsi à entourer les graines en formation. A partir de 10 JAA, seules les cellules de l'épiderme poursuivent leur divisions jusqu'au début du mûrissement pour supporter l'augmentation de volume considérable du fruit durant la phase d'expansion cellulaire (Joubès et Chevalier, 2000). Il semble que le développement des embryons et des graines, sources de facteurs hormonaux, contrôle la vitesse et le maintien des divisions dans le fruit (Varga et Bruinsma, 1986). L'activité mitotique dans l'ovaire serait donc conditionnée par le nombre d'ovules fécondés.

La phase d'expansion cellulaire

Les vagues successives de divisions cellulaires, avant et après anthèse, définissent la taille potentielle du fruit, mais c'est l'expansion des cellules entre 10 et 40 JAA qui en détermine la taille finale (Ho, 1996). Au cours du développement du fruit de nombreuses lignées de tomate, le diamètre des cellules du péricarpe passe de 10 à 350 µm, entrainant un accroissement du volume cellulaire d'un facteur supérieur à 30000 (Cheniclet *et al*., 2005). Cette croissance du volume cellulaire s'accompagne d'une forte augmentation de leur contenu en ADN nucléaire par polyploïdisation, souvent associé au phénomène de grandissement cellulaire (Joubès et Chevalier, 2000). La polyploïdisation résulte de la capacité d'une cellule à entrer dans un cycle d'endoréduplication de l'ADN constitué d'une alternance d'une phase S (synthèse d'ADN) et de phase G, en absence de mitose (Joubès et Chevalier, 2000). Le péricarpe et le tissu loculaire sont les 2 tissus qui présentent les taux

de polyploïdie les plus élevés et les surfaces cellulaires les plus importantes (Cheniclet *et al*., 2005). Dans les cellules qui composent ces tissus, les vacuoles occupent une grande partie du volume et constituent d'importants compartiments de stockage des métabolites. L'expansion des cellules fait intervenir des mécanismes assurant le relâchement des parois et la diminution du potentiel hydrique des cellules (Schopfer, 2006). L'assemblage de polymères de cellulose et d'hémicellulose qui composent la paroi des cellules végétales constitue le frein majeur contre l'expansion des cellules sous l'effet de la turgescence. Les mécanismes assurant le relâchement de cette structure jouent un rôle important dans le grandissement cellulaire et semblent gouvernées par des régulations hormonales (Català *et al*., 2000). Dans les fruits, le relâchement des parois s'accompagne d'une forte activité métabolique qui permet l'accumulation de sucres et d'acides organiques, la création d'un gradient de pression osmotique et une entrée d'eau massive assurant le grandissement. C'est pendant la phase d'expansion cellulaire que le fruit atteint sa vitesse de croissance et sa teneur en eau maximale : 5 à 7% de matière sèche contre 17% avant fécondation (Ho et Hewitt, 1986). A la fin de cette période, le fruit est au stade « Vert Mûr » et a quasiment atteint son diamètre et son poids définitifs.

La phase de maturation

Le mûrissement de la tomate est défini selon 5 stades : Breaker, Tournant, Orange, Rouge Léger et Rouge Mûr. La tomate est un fruit climactérique (du latin *climactericus*, qui signifie « qui va par échelons ») au même titre que l'abricot, la pêche, la prune, la pomme, la banane ou bien la mangue. Les fruits climactériques sont caractérisés par une augmentation de la vitesse de respiration dans les stades précoces du mûrissement. Cette « crise climactérique » est associée à un pic transitoire de production d'éthylène. Ce gaz va coordonner et accélérer *via* l'activation de ses récepteurs (*Le*ETR1 à 6), de multiples mécanismes aboutissant à un pic respiratoire, un changement radical dans la composition du fruit en sucres, acides organiques, caroténoïdes, chlorophylles, une dégradation des parois cellulaires, ainsi que la synthèse de composés volatiles (Alexander et Grierson, 2002). Le mûrissement du fruit est initié après la maturation des graines, lorsque le fruit a quasiment atteint sa taille finale. Ces changements physiologiques et biochimiques aboutissent à un fruit mûr, aux attributs organoleptiques attractifs pour le consommateur. D'un point de vue agronomique, le fruit de tomate devient alors plus fragile vis-à-vis des agressions extérieures. Les modifications majeures du mûrissement sont les suivantes (Hobson et Grierson, 1993) :

- **Couleur :** les chloroplastes sont transformés en chromoplastes, avec dégradation concomitante des chlorophylles et synthèse de caroténoïdes, en particulier le lycopène.
- **Goût :** l'acidité du fruit diminue suite à la dégradation de l'acide malique. Les teneurs en hexose augmentent sous l'effet de la dégradation des réserves d'amidon et par une importation massive dans le fruit au cours du développement. Les hexoses sont importés puis stockés dans la vacuole.
- **Arômes :** de nombreux composés aromatiques (esters, aldéhydes) sont synthétisés.
- **Texture :** la perte de fermeté du fruit résulte de la dégradation de certains des constituants des parois cellulaires (hémicelluloses, celluloses, pectines insolubles) et concorde avec une diminution de la résistance aux agents pathogènes.

1.6 Caractères de qualité du fruit

Le marché de la tomate a développé depuis de nombreuses années la « dessaisonalisation » avec les productions de serre et les importations qui supplantent les productions saisonnières de plein champ. La popularité croissante de la tomate a poussé les sélectionneurs à produire de nouveaux cultivars avec des rendements élevés, une plus grande résistance aux maladies et une meilleure qualité des fruits. L'amélioration de la qualité des fruits a toujours été un objectif des sélectionneurs, mais cette notion a évolué au gré des contingences et au fil des années, et diffère entre la tomate destinée au marché de frais et la tomate d'industrie.

1.6.1. Spécificité des filières

Les professionnels de l'industrie de transformation de la tomate ont toujours eu comme objectifs d'augmenter la teneur en matière sèche des fruits. Le fruit de tomate possède une faible teneur en matière sèche, qui varie généralement entre 5 et 7.5% du poids frais, et qui dépend de l'équilibre entre l'accumulation d'eau et d'assimilats (Ho, 1996). Le fruit de tomate étant principalement composé de sucres (50%), le taux de matière de sèche est directement relié à la teneur en sucres totaux. Les fruits qui accumulent préférentiellement du saccharose, comme les espèces sauvages, ont une plus forte teneur en matière sèche que les fruits qui accumulent des hexoses, comme les variétés domestiques (Klann *et al*., 1993).

Concernant le « marché de frais », différents aspects de la qualité des fruits ont été privilégiés entre les années 1950 et les années 2000. En réponse à une forte demande commerciale, les différents acteurs de la filière ont amélioré les pratiques culturales et les

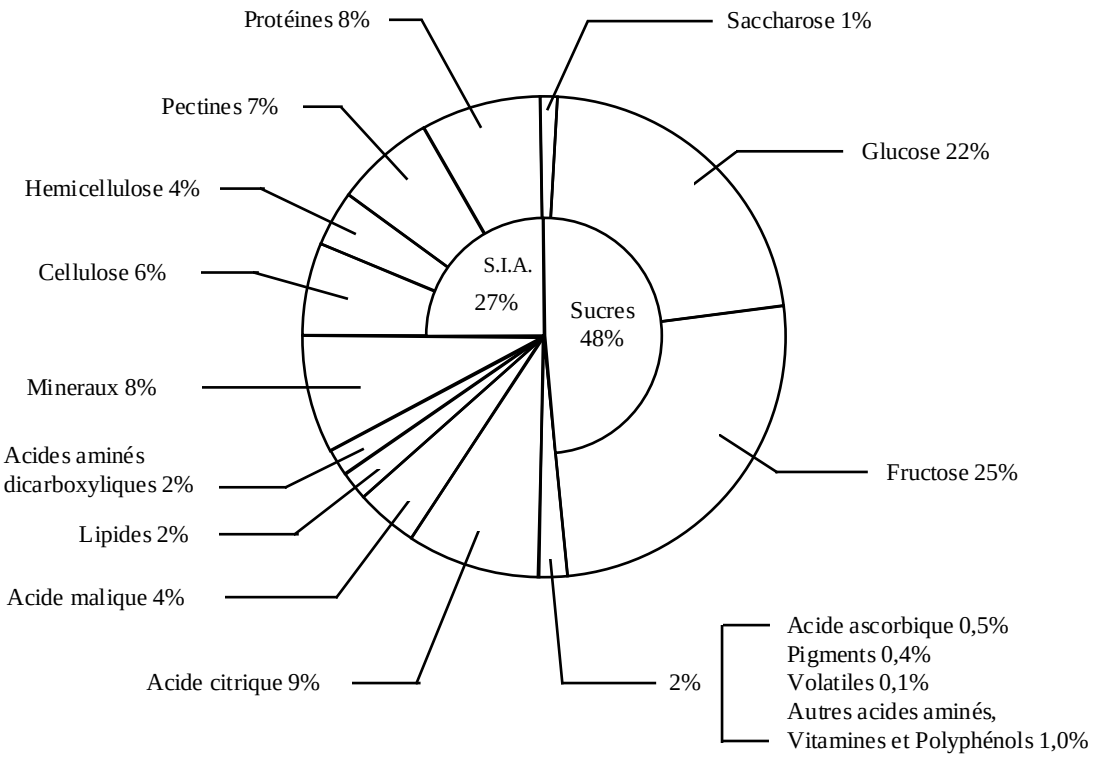


Figure 9 : Composition du fruit de tomate. Proportions des différents constituants de la matière sèche (% du poids sec total, Davies et Hobson, 1981). S.I.A. : substances insolubles à l'alcool

sélectionneurs ont eu comme premier objectif d'augmenter les rendements jusque dans les années 70. La deuxième cible des sélectionneurs, à partir des années 80, a été d'améliorer l'apparence du fruit, en particulier sa couleur et sa forme. La couleur du fruit de tomate dépend principalement de sa composition en carotènes : lycopène, β-carotène, phytofluène qui sont les pigments majeurs de la tomate (Hirota, 1974). Certains défauts du fruit comme la pourriture apicale (blossol-end rot), les défauts de coloration (blotchy ripening), les éclatements de fruits ou les fruits creux peuvent être causés par des désordres nutritionnels (Ho et Hewith, 1986). L'ajustement des conduites culturales et la sélection de génotypes moins sensibles à ces phénomènes a permis de réduire les pertes et d'obtenir des fruits à l'aspect plus homogène. Un autre axe de sélection a consisté à améliorer la fermeté et la durée de conservation des fruits. Ainsi, les variétés « long life » (dont les fruits fermes se conservent longtemps) se sont développées au détriment de la qualité gustative des fruits. C'est principalement de la structure des cellules que dépend la texture du fruit : l'état osmotique des cellules, leur taille, leur agencement, l'épaisseur des parois, la présence de grains d'amidon ou d'huile vont déterminer la structure ferme, juteuse, croquante, farineuse, crémeuse ou fibreuse du fruit (Harker *et al*, 1997). Ainsi, jusqu'au début des années 1990, les efforts portés sur l'amélioration des qualités structurelles et esthétiques de la tomate ont provoqué une érosion du goût de la tomate destinée au marché de frais. Le mécontentement des consommateurs face à la faible qualité gustative des tomates a poussé les sélectionneurs et les producteurs à s'intéresser aux qualités organoleptiques de la tomate.

1.6.2 Composition du fruit et qualités organoleptiques

La flaveur de la tomate, c'est-à-dire son goût (sucré, salé, amer, acide) et son arôme résulte de la présence et de l'interaction de différents composés chimiques.

Les **sucres** sont des composés majeurs du goût. Le contenu total en sucres d'un fruit de tomate se situe autour de 50% de la matière sèche, dont 25% de fructose et 22% de glucose (figure 9, Davies et Hobson, 1981). L'amidon est en quantité négligeable dans le fruit mûr et ne participe pas au goût sucré, mais il peut conférer une texture farineuse. La teneur en saccharose dépasse rarement 0.1% de la matière sèche chez la plupart des espèces cultivées. En revanche, chez certaines espèces sauvages le saccharose est le sucre majoritaire (Yelle *et al*., 1988). Parmi les sucres réducteurs, le fructose a un pouvoir édulcorant plus important que le glucose et contribue largement au goût sucré de la tomate.

Les **acides organiques** sont des composés importants dans la détermination de la flaveur puisqu'ils sont responsables de la saveur acide du fruit. Chez la tomate, ils représentent plus de 10% de la matière sèche. L'acide citrique est l'acide organique majoritaire dans la tomate (60% des acides organiques totaux), suivi de l'acide malique (4%)

qui a pourtant un effet plus grand que l'acide citrique sur le goût acide du fruit (Davies et Hobson, 1981).

Les **acides aminés** affectent la flaveur du fruit par leur propre goût et leur propriété d'exhausteurs de goût. Ils représentent 2 à 2.5% de la matière sèche de la tomate, l'acide glutamique étant la forme majoritaire (Kader *et al*., 1978).

Du point de vue de la teneur en **vitamines** et **minéraux**, la tomate est assez pauvre par rapport aux autres fruits et légumes. Les minéraux constituent seulement 8% de la matière sèche, les sels de potassium et de phosphore étant les sels majoritaires (Davies et Hobson, 1981). Leur effet sur le goût du fruit concerne principalement le pH et l'acidité titrable. Les sels ont, de plus, la propriété d'intensifier la saveur sucrée de la tomate. Les principales vitamines présentes dans la tomate sont les vitamines C et A. En plus de leur intérêt nutritionnel, les vitamines jouent un rôle important dans la qualité organoleptique en tant que précurseurs d'arômes, mais elles représentent moins de 1.5% de la matière sèche de la tomate (Davies et Hobson, 1981).

L'**arôme** naturel de la tomate résulte d'interactions complexes entre de nombreux composés présents dans le fruit. Plus de 400 composés aromatiques ont été identifiés chez la tomate (Petro-Turza, 1986). Il s'agit de molécules volatiles, présentes pour la plupart à l'état de trace, sensibles à la chaleur et qui appartiennent à des familles chimiques extrêmement diverses : sucres, acides aminés, acides gras, mais aussi vitamines et caroténoïdes.

1.6.3 Outils d'amélioration de la qualité des fruits

La culture de la tomate a pris son essor en Europe à partir du XIXème siècle et très rapidement, les premières variétés issues de la sélection de variants résultant de mutations ou de fécondations croisées sont apparues. En 1856, il n'y a que 7 variétés proposées aux maraîchers par le catalogue « plante potagère » de Vilmorin-Andrieux mais le début du XXème siècle va marquer l'avènement d'une période de recherche intense d'amélioration des caractères du fruit. Des instituts publics américains s'impliquent dans cette étape de sélection variétale, rapidement rejoints par des compagnies privées : le début des années 50 voit la mise sur le marché de plusieurs milliers de nouvelles variétés. Dès lors, apparaissent des variétés hybrides qui supplantent peu à peu les anciennes lignées fixées. Elles sont obtenues à partir de lignées homozygotes éloignées génétiquement et dont le croisement procure à la descendance une vigueur accrue face à un caractère donné, appelée vigueur hybride ou *hétérosis*.

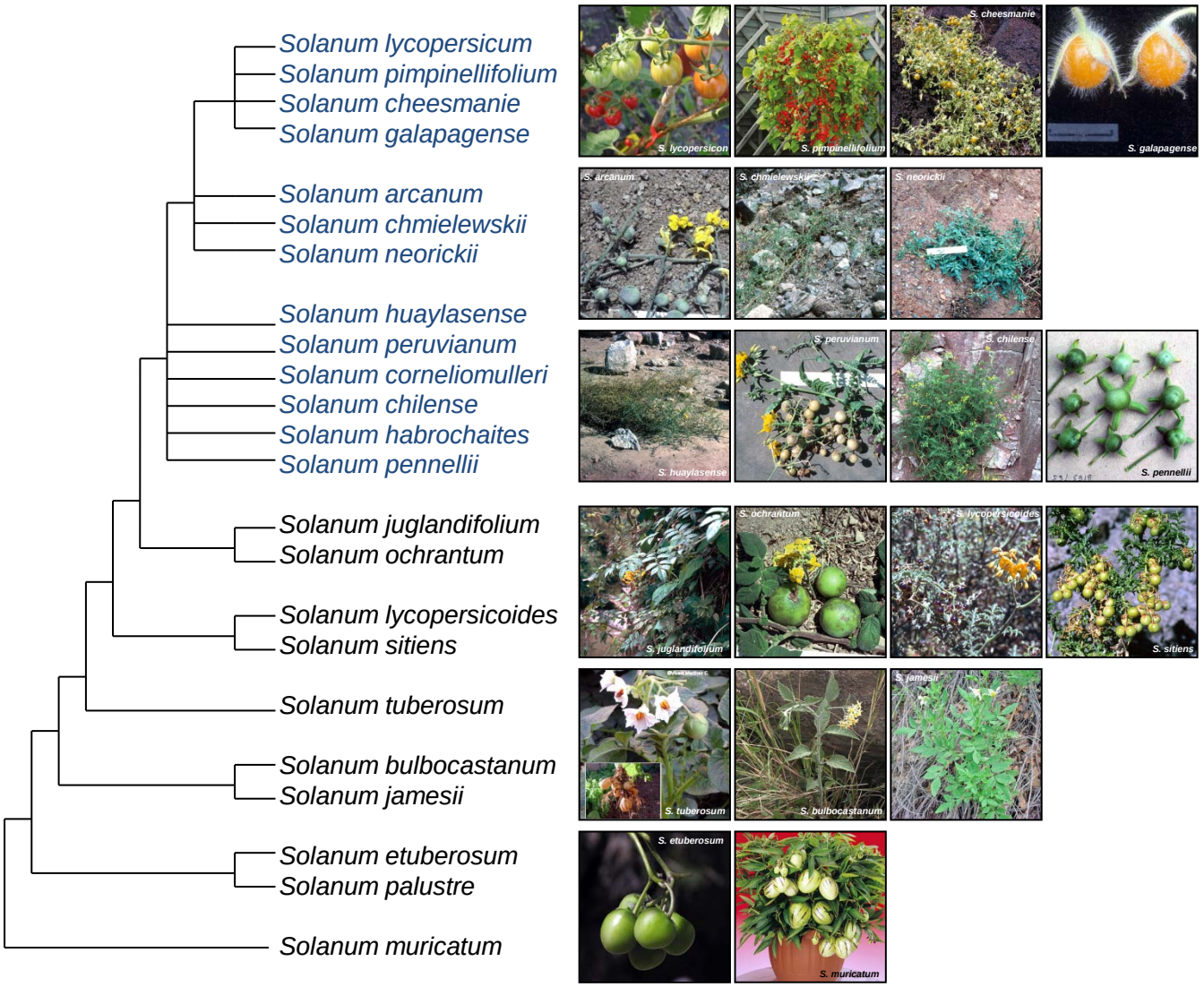


Figure 10 : Arbre phylogénétique simplifié comprenant 23 espèces appartenant au groupe *Solanum*. En bleu sont représentés les 13 espèces recensées de tomate. Adapté de Robertson et Labate, 2007; crédits photos : Alan Tyre, TGRC, ecrater.com, jardinpourvous.com)

Un des problèmes rencontrés par les sélectionneurs pour l'amélioration de la tomate est la perte de variabilité génétique des variétés cultivées. En effet, les appauvrissements en variabilité génétique sont liés à la domestication de la tomate *Solanum lycopersicum* var. *cerasiformae* au Mexique puis à la domestication de la tomate *Solanum lycopersicum* sur le continent européen, associés à une reproduction autogame. Une des clés pour pallier à ce phénomène est de recourir aux hybridations interspécifiques avec les espèces sauvages (figure 10) afin de créer de la variabilité. C'est dans le but de pallier cette lacune que le Professeur Charlie Rick a organisé des expéditions dans les Andes afin de collecter des espèces naturelles de tomates présentant des caractères génétiques alors introuvables dans les tomates domestiques. Ces efforts ont abouti à la création du « C. M. Rick Tomato Genetics Resource Center » (Davis, Etats-Unis, http://tgrc.ucdavis.edu) qui répertorie, stocke et distribue des graines provenant d'un large nombre d'espèces. A l'heure actuelle, plus de 75 000 accessions sont disponibles dans plus de 120 pays différents. La plupart de ces ressources ont été utilisées au cours de ces 20 dernières années par les sélectionneurs afin d'améliorer des caractères tels que la résistance aux maladies et la qualité des tomates (Robertson et Labate, 2007), en sélectionnant, au sein du génome de ces lignées, les régions contrôlant les caractères d'intérêts qualitatifs (gènes majeurs) ou quantitatifs (QTL). En effet, les variétés sauvages de tomate représentent une source de variabilité allélique utilisés notamment pour la construction de lignées d'introgressions (ILs pour « introgression lines »). Ces dernières sont constituées à partir de segments chromosomiques, issus des espèces sauvages, et insérés dans un fonds génétique constant. Il existe plusieurs collections d'ILs de *Solanum lycopersicum* qui intègrent le génome de *Solanum pennellii* (Eshed et Zamir, 1995), *Solanum pimpinellifolium* (Doganlar *et al.*, 2002), *Solanum habrochaites* (Monforte et Tanksley 2000) et *Solanum lycopersicoides* (Canady *et al.*, 2005). Ces ILs présentent de nombreux avantages pour la cartographie génétique et l'identification de gènes et/ou de QTL en vue de l'amélioration variétale (Zamir, 2001).

Après le rendement, l'apparence du fruit, la conservation et le goût, un des axes actuels des sélectionneurs est l'amélioration des qualités nutritionnelles. Pour le futur, le travail des sélectionneurs sera de proposer des variétés de plus en plus spécifiques des filières auxquelles les tomates sont destinées. Par exemple, des variétés présentant une accumulation plus précoce des sucres et des acides permettraient de s'adapter au système de production délocalisé, une peau plus fine est recherchée dans le marché de frais pour s'adapter au goût des consommateurs, notamment les enfants, et une peau plus rigide au contraire peut simplifier les procédés des industries de transformation en permettant une meilleure extraction de l'épiderme.

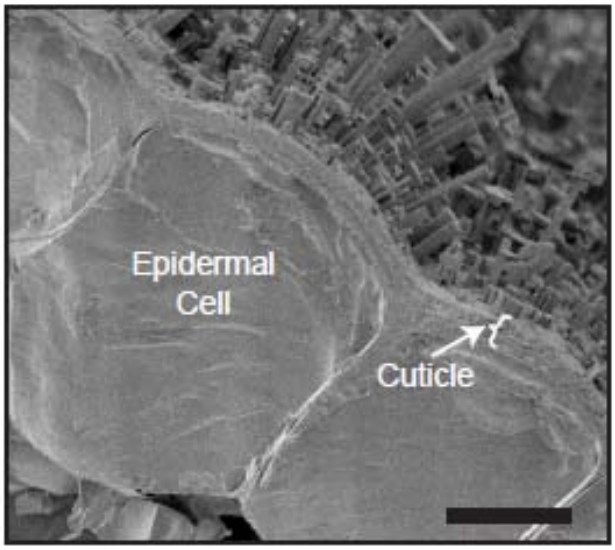


Figure 11 : Image en microscopie électronique à balayage de l'épiderme d'une feuille d'Arabidopsis, vue en coupe. Echelle : 5 µm (d'après Yeats et Rose, 2013).

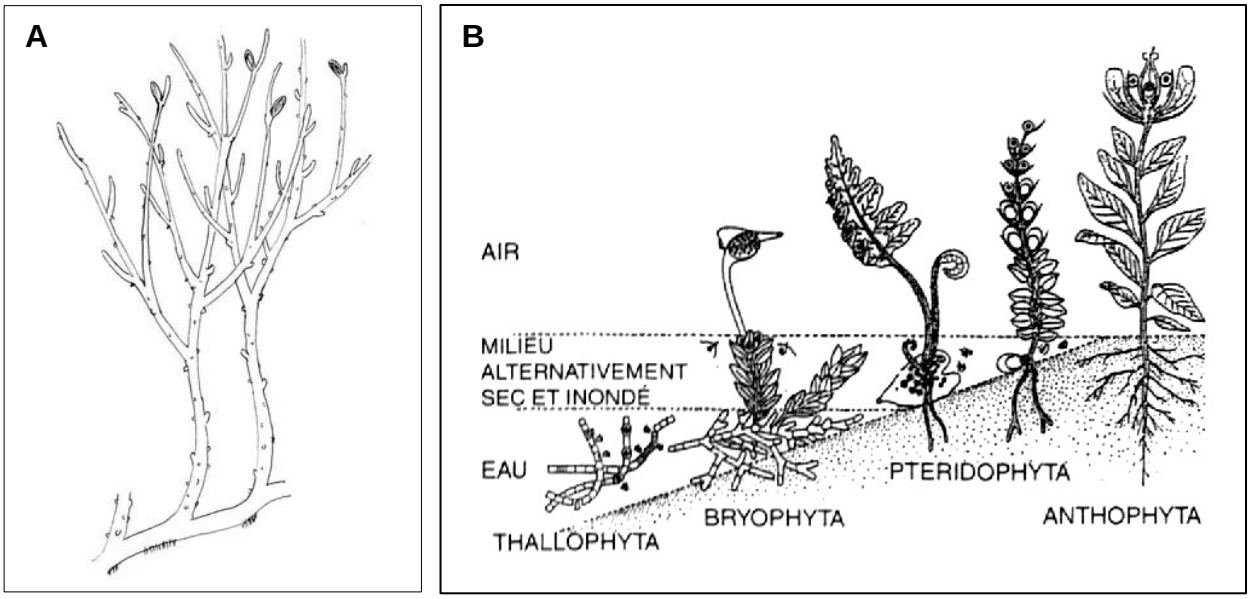


Figure 12 : Colonisation du milieu terrestre par les plantes. A Reconstruction of *Rhynia gwynne-vaughanii*, une des premières plantes à avoir synthétisé de la cuticule. B. Schéma évolutionnaire de la sortie des eaux par les plantes, des thallophytes exclusivement marins aux anthophytes exclusivement aériens, en passant par les bryophytes et pteridophytes, adaptés aux 2 milieux. D'après Kenrick et Crane, 1997, Réjean Genest.

Cette peau de tomate, et plus particulièrement sa partie la plus externe, appelée cuticule, se révèle être une cible de choix pour l'amélioration variétale. En effet, cette cuticule joue un rôle majeur dans un grand nombre de propriétés agronomiques. Elle intervient notamment dans l'aspect du fruit et plus particulièrement sur l'effet de brillance de la surface. La cuticule joue un rôle dans la résistance aux pathogènes et c'est aussi une barrière de défense contre les insectes et les champignons. La cuticule participe aussi aux propriétés de conservation post récolte, puisqu'elle permet de limiter la dessiccation. Enfin, elle joue un rôle dans l'aspect nutritionnel puisque la partie externe du fruit est la plus riche en vitamines du fruit (M. Alhagdow, thèse université de Bordeaux II, 2006). La cuticule apparait donc comme un facteur majeur pouvant jouer sur la qualité finale du fruit de tomate.

2. La cuticule

2.1 Un élément clé de la colonisation du milieu terrestre par les plantes

La cuticule, du latin *cuticula*, signifiant « peau fine », désigne un film lipidique translucide situé à l'interface entre la plante et son environnement aérien. Il ne s'agit pas d'une couche cellulaire mais bien d'une matrice extracellulaire continue. La cuticule est présente au niveau de la face extérieure des cellules épidermiques des organes aériens de toutes les plantes vasculaires, et seules les cellules épidermiques ont la capacité de synthétiser les composés lipidiques nécessaires à son élaboration (figure 11). La cuticule joue un rôle majeur dans l'adaptation des plantes, dans la réponse aux stress mais elle semble aussi fortement impliquée dans le développement, principalement en régulant la morphologie des cellules épidermiques.

D'un point de vue paléo-botanique, l'apparition de la cuticule chez les plantes semble coïncider avec la colonisation du milieu terrestre (Edwards *et al*., 1996). En effet, les plus vieux fragments fossilisés de cuticule de plante sont datés d'environ 425 millions d'années, à une période comprise entre la fin du Silurien et le début du Dévonien. Cette cuticule recouvrait les sporanges de rhyniophytes, un des premiers ancêtres des plantes vasculaires, pionnier dans la conquête du milieu terrestre (figure 12A). Le milieu aérien s'avère excessivement contraignant pour les plantes puisque dans l'air, elles sont exposées à des conditions atmosphériques instables, une gravité forte que le milieu marin atténuait considérablement et un dessèchement très rapide. Cependant, le gros atout du milieu aérien réside dans un spectre lumineux large, propice aux activités photosynthétiques, qui a conduit le règne végétal à risquer une «sortie des eaux » (figure 12B), selon une chronologie rigoureuse. Sans racine, ni tige, ni feuille, les algues se sont développées dans l'eau. Puis les mousses se sont progressivement émancipées du milieu liquide pour s'adapter à un milieu alternativement sec et humide. Pour cela, ils ont développé des racines et des tissus

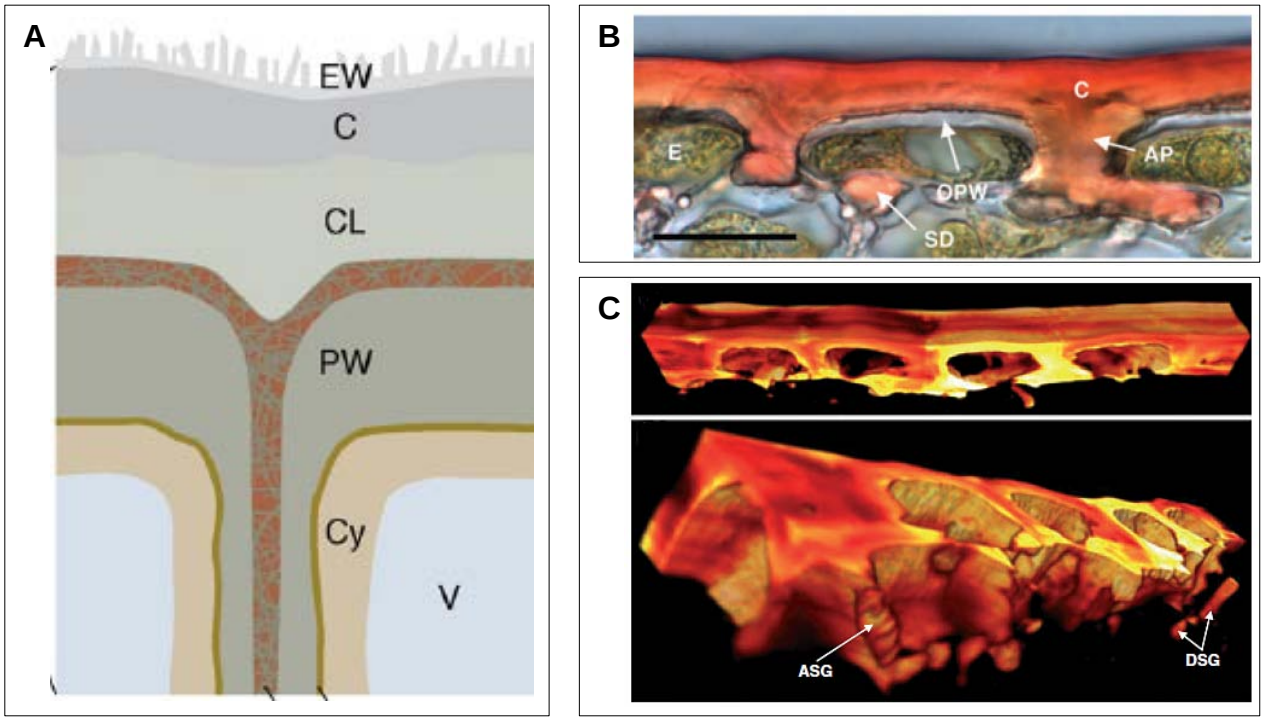


Figure 13 : Structure cuticulaire des plantes supérieures. A. Représentation schématique de la déposition de la cutine, exemple d'une feuille. Les cristaux de cires en surface ne sont pas systématiques. B.Observations au microscope photonique d'une cryosection de péricarpe de fruit de tomate cultivar M82, après coloration au rouge Soudan IV. C.Ultrastructure tridimensionnelle de la cuticule de tomate M82 générée par le programme Volocity. AP, anticlinal peg ; ASG, attached sub-epidermal globule ; C, cuticle ; CL, cuticular layer ; Cy : cytoplasme ; DSG, detached sub-epidermal globule ; E, epidermal cell ; EW, epicuticular waxes ; OPW, outer pericilinal wall ; PW, primary cell wall ; SD, sub epidermal deposit ; V, vacuole. Scale bar = 20 µm. D'après Buda *et al*., 2009 ; Pollard *et al.*, 2008.

conducteurs de sève pour irriguer les parties aériennes. À mesure que les espaces terrestres sont investis, des organes et des tissus se spécialisent. Les hépatites tapissent le substrat humide pour maximiser l'absorption. Pour réduire les pertes d'eau et résister aux UV, les épidermes se recouvrent d'une membrane lipidique étanche : la cuticule.

Les évolutions suivantes conduisent à l'élaboration des plantes supérieures : les stomates apparaissent pour régulariser le passage des molécules gazeuses, l'édification verticale d'une plante requiert une conduction active de l'eau et des nutriments par des vaisseaux ainsi que des tissus de soutien en lignine. La pollinisation et fécondation se feront par le vent et plus tard par les insectes.

2.2 Organisation et composition de la cuticule

La plupart des cellules de l'épiderme des parties aériennes des plantes supérieures (et quelques bryophytes) sont recouvertes par la cuticule, une structure extracellulaire continue uniquement interrompue au niveau des stomates et des pores. Cette matrice peut apparaître sous forme lamellaire, réticulaire ou amorphe. La cuticule varie largement dans sa composition, son épaisseur (de 0,02 à 200 µm) et sa structure en fonction de l'espèce végétale, de l'organe de la plante et du stade de développement (Jeffree, 1996). Néanmoins, chez la majorité des plantes, elle est formée par un bioplymère flexible appelé **cutine** (Kolattukudy, 1981) et par un mélange complexe de **cires** (figure 13A). La cutine est un polyester composé de différents acides gras hydroxylés en C_{16} et C_{18} inter-estérifiés et de glycérol. Les cires sont un mélange de molécules aliphatiques à très longues chaînes de carbone et peuvent être soit déposées à la surface de la cuticule, elles sont alors désignées sous le terme de cires épicuticulaires, soit imbriquées dans le polymère de cutine, on parle alors de cires intracuticulaires. La cuticule peut également être composée d'un matériel insoluble et non hydrolysable, le cutane, parfois considéré comme un composant de la cutine (Kolattukudy, 1996).

La cuticule est généralement plus épaisse au dessus des parois anticlinales des cellules épidermiques et forme souvent des structures en forme de pied, entre les cellules épidermiques adjacentes (figure 13B). Des dépôts isolés de cuticule sont parfois observés sous l'assise de cellules épidermiques (figure 13B) et suivant les espèces ou variétés végétales considérées, une fine couche cuticulaire peut être observée au niveau de la face interne des cellules épidermiques, qui se retrouvent par conséquent intégralement englobées dans la matrice lipidique (figure 13C). Des observations en microscopie électroniques montrent qu'il existe un niveau de complexité supplémentaire entre les parois cellulaires (voir chapitre 2.2.5) et la cuticule, permettant de discriminer différents niveaux d'organisation. Ainsi, la couche contigüe à la paroi est appelée « cuticle layer » (figure 13A et

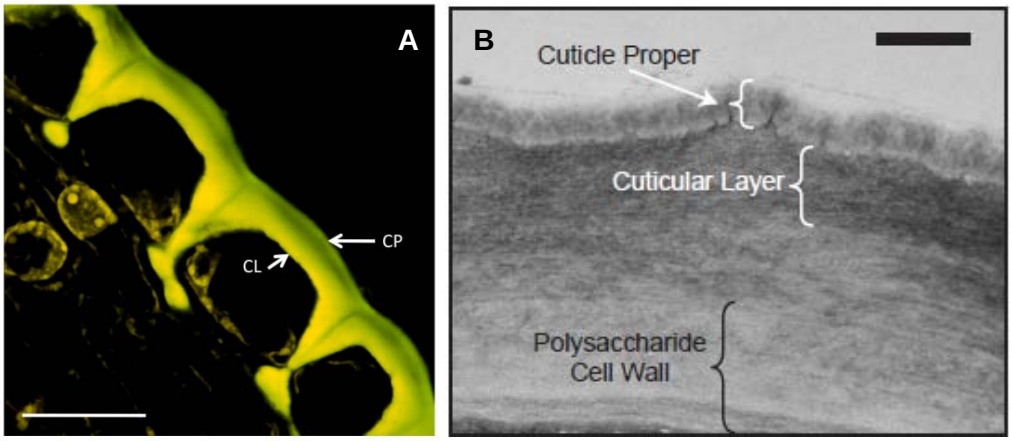


Figure 14 : Localisation des couches « cuticular layer » (CL) et « cuticle proper » (CP) de la cuticule de plantes supérieures. A. Coloration à l'auramine O d'une coupe de cuticule de tomate à 20 JAA. Echelle : 20 mm (d'après Girard *et al*., 2012) ; B. Microscopie électronique à transmission de la cuticule et des parois de cellules épidermiques de tiges d'*Arabidopsis*. Echelle : 500 nm (d'après Yeats et Rose, 2013).

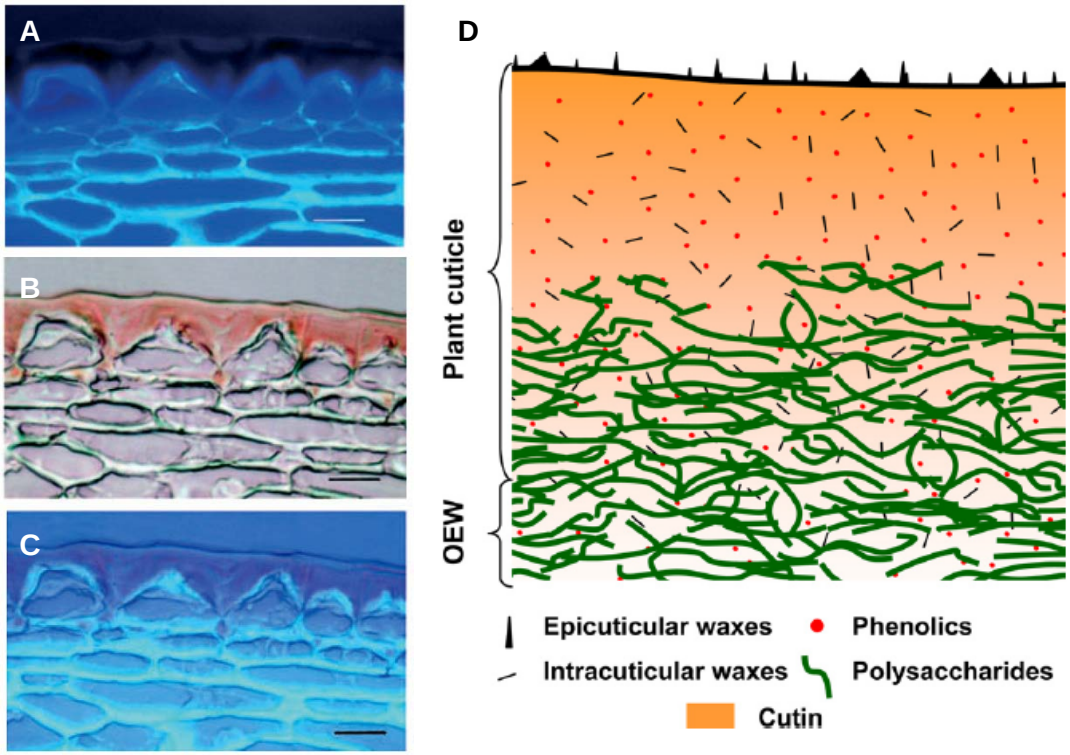


Figure 15 : Illustration de la transition entre la paroi cellulaire et la cuticule dans les cellules épidermiques. A, B, C. Photographies en microscopie optique d'épiderme de fruit de tomate au stade MG, avec A. visualisation des polysaccharides après coloration au calcofluor ; B. coloration de la cuticule au Rouge Soudan IV et C. combinaison des images A et B (échelle = 20 µm). D. Schéma d'une coupe transversale de plante terrestre représentant la localisation des différents composants. OEW : Outer Epidermal Wall. D'après Dominguez *et al*., 2011.

14) et se compose de cires intracuticulaires, de cutine et de polysaccharides, semblant ponter la cuticule et la paroi. La couche plus externe est appelée « cuticle proper » et n'est composée que de cutine et de cires intra et épicuticulaires. Chez la tomate, la distinction entre « cuticle layer » et « cuticle proper » est délicate (figure 14) et l'existence d'une sectorisation claire entre paroi cellulaire et cuticule est même remise en cause puisqu'un gradient entre les composants pariétaux et cuticulaires semblent exister (figure 15, Dominguez *et al*., 2011). Ainsi, la connexion entre les matrices extracellulaires semble beaucoup plus complexe qu'une simple succession de couche de natures différentes, avec des polysaccharides pariétaux et des lipides cuticulaires qui ne sont pas spécifiques de territoires stricts.

De plus, les différences de composition de cires et de cutine au sein de la cuticule vont entraîner la formation d'ultra structures variées, observables en microscopie électronique à transmission. A partir de ces observations, une nomenclature des types de cuticule a été définie en fonction des structures lamellaires, réticulées ou amorphes observées au niveau des régions internes ou externes de la membrane cuticulaire (Holloway, 1982a ; Jeffree, 1996) (table 1).

2.2.1 Cires

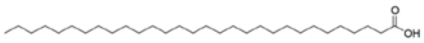
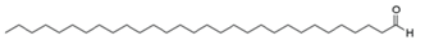
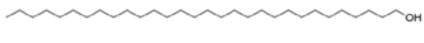
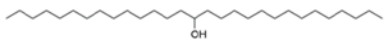
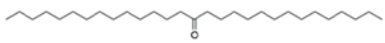
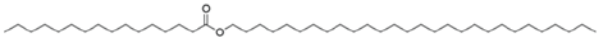
Les cires sont un terme générique regroupant l'ensemble des composés solubles dans un solvant organique. Elles représentent 20 à 60% de la masse totale de la cuticule (Samuels *et al*., 2008) et recouvrent un large spectre de molécules qui, outre les composés aliphatiques à longues chaînes de carbone (de 20 à 40 atomes de carbone) comprend également des métabolites secondaires comme les triterpénoïdes (Riederer et Marstadter, 1996), les phénylpropanoïdes (Nawrath, 2006) et les flavonoïdes.

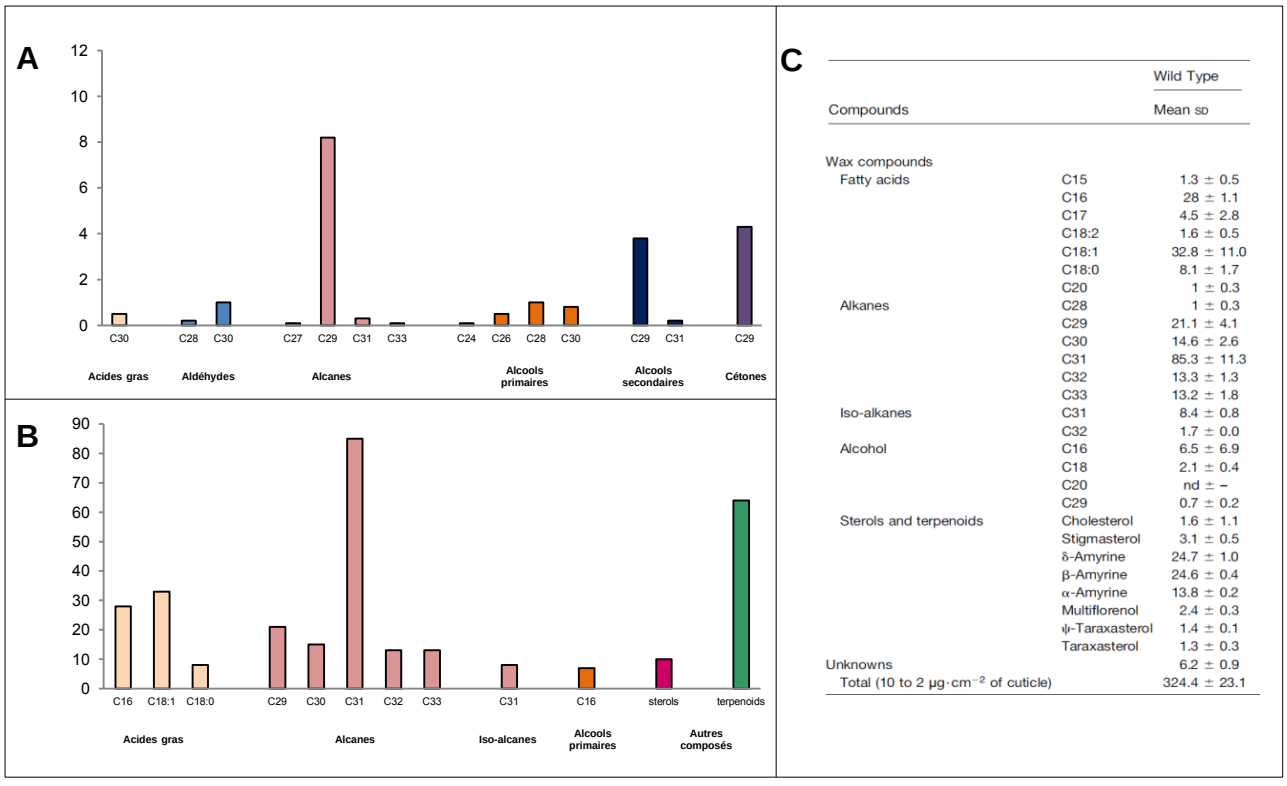
Les principales classes de composants de cires cuticulaires végétales sont des n-alcanes avec des chaînes comprises entre C_{21} et C_{35}, avec leurs homologues iso et ante-iso en faible quantité, des alcools primaires en C_{22}-C_{40}, des acides gras en C_{20}-C_{35}, des aldéhydes en C_{24}-C_{36}, des alcools secondaires en C_{21}-C_{35}, des cétones en C_{21}-C_{35}, des β-dicétones en C_{22}-C_{36} et des n-acyl esters en C_{36}-C_{60} (table 2) (Baker, 1982 ; Waltson, 1990). La composition des cires cuticulaires varie drastiquement entre les espèces avec des composés majoritaires qui peuvent être soit des hydrocarbones (55% des cires totales) chez *Brassica napus*, des β-dicétones (55%) chez *Eucalyptus globulus*, des triterpenoïdes (35%) chez *Fragaria ananassa* ou bien des alcools primaires (90%) chez *Hordeum vulgare* (d'après Baker et Hunt, 1986). L'analyse des cires cuticulaires des feuilles de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* montre une composition majoritaire en alcanes (C29 principalement, et

Table 1 : Les six types structuraux de cuticule (adapté de Holloway, 1982a ; Jeffree, 2006)

Type	Description	Exemples
1	Région externe poly-lamellée, bien séparée de la région interne, principalement réticulée	Feuilles d'*Agave americana* et *Clivia miniata*
2	Région externe faiblement lamellée fusionnant progressivement avec la région interne, principalement réticulée	Feuilles d'*Hedera helix* et *Ficus elastica*
3	Région externe amorphe, région interne principalement réticulée	Feuilles de *Plantago major*, *Picea abies*, *Citrus limon* et *Quercus velutina*
4	Toutes les régions réticulées	Feuilles d'*Hydrangea macrophylla*, fruit de *Solanum lycopersicon*
5	Toutes les régions lamellées	Feuilles de *Beta vulgaris* et *Taraxacum officinale*
6	Principalement amorphes	Feuilles de *Potamogeton crispus* et *Brassica oleracea* var *gemmifera*

Table 2 : Principales classes d'acyl-lipides rencontrées dans les cires cuticulaires et structure générique des composés (d'après Yeats et Rose, 2013).

Class of acyl lipid cuticular wax	Generic structure
Fatty acid	
Aldehyde	
Primary alcohol	
Secondary alcohol	
Alkane	
Ketone	
Wax ester	



C

Compounds		Wild Type Mean ± SD
Wax compounds		
Fatty acids	C15	1.3 ± 0.5
	C16	28 ± 1.1
	C17	4.5 ± 2.8
	C18:2	1.6 ± 0.5
	C18:1	32.8 ± 11.0
	C18:0	8.1 ± 1.7
	C20	1 ± 0.3
Alkanes	C28	1 ± 0.3
	C29	21.1 ± 4.1
	C30	14.6 ± 2.6
	C31	85.3 ± 11.3
	C32	13.3 ± 1.3
	C33	13.2 ± 1.8
Iso-alkanes	C31	8.4 ± 0.8
	C32	1.7 ± 0.0
Alcohol	C16	6.5 ± 6.9
	C18	2.1 ± 0.4
	C20	nd ± –
	C29	0.7 ± 0.2
Sterols and terpenoids	Cholesterol	1.6 ± 1.1
	Stigmasterol	3.1 ± 0.5
	δ-Amyrine	24.7 ± 1.0
	β-Amyrine	24.6 ± 0.4
	α-Amyrine	13.8 ± 0.2
	Multiflorenol	2.4 ± 0.3
	ψ-Taraxasterol	1.4 ± 0.1
	Taraxasterol	1.3 ± 0.3
Unknowns		6.2 ± 0.9
Total (10 to 2 µg·cm^{-2} of cuticle)		324.4 ± 23.1

Figure 16 : Analyse des composés majoritaires des cires cuticulaires. A. tige d'A. *thaliana* écotype *Landsberg erecta* (d'après Rowland *et al*., 2006) B. fruits au stade Red Ripe de S. *lycopersicon* var. *cerasiformae* WVa106 (d'après Girard *et al*., 2012), exprimés en µg par cm². C. Composition détaillée des cires cuticulaires de fruits au stade Red Ripe, de S. *lycopersicum* var. *cerasiformae* WVa106, exprimée en µg par cm² (d'après Girard *et al*., 2012)

des alcanes minoritaires en C27, C31 et C33), en cétone (C29), en alcools secondaires (C29 et un peu de C31), en alcools primaires (C24, C26, C28 et C30), d'aldéhydes (C28 et C30) et des acides gras (C30) (figure 16A). Si on considère les cires du fruit de *Solanum lycopersicum* (figure 16B), il est intéressant de noter des résultats très éloignés, même si le composé majoritaire est toujours un alcane (mais en C31 cette fois, avec du C29, C30, C32 et C33). Les cires de tomate sont composées aussi d'iso-alcanes (C31), d'alcools primaires (C16), d'acides gras (C16, C18 :1, C18 :0) mais les cétones et les alcools secondaires ne sont pas détectés. La tomate est riche en stérols (cholestérol, stigmastérol, multiflorénol, taraxastérol) mais surtout en terpénoïdes de type α, β et δ-Amyrine (figure 16C).

La composition des cires est tout aussi variable en fonction de facteurs exogènes et endogènes, tels que la température, la lumière (Shepherd *et al.*, 1995 ; Jenks *et al*., 2002), l'érosion par le vent et la pluie, qui peut modifier les quantités et les densités de cires (Baker et Hunt., 1986), ainsi que la concentration en dioxyde de carbone et d'ozone dans l'air (Percy *et al*., 2002).

Cette grande diversité chimique entraîne une grande variabilité dans la morphologie des cires épicuticulaires qui peuvent s'organiser en structures cristallines aux formes très variées (figure 17) telles que tubules et dendrites (*Brassica napus*), plaquettes (*Pisum sativum*, *Fragaria ananassa*) (Baker et Hunt, 1986), des rubans torsadés (*Kalanchoë daigremontiana*) ou au contraire ne pas former de cristaux cireux et se présenter sous forme de film amorphe (fruit de *Solanum lycopersicum*) (Buschhaus et Jetter, 2011).

De plus, l'analyse comparée des cires intra et épicuticulaires montre de grandes différences de composition entre les cires de surface et les cires internes de la cuticule (figure18) (Buschhaus et Jetter, 2011). Les profils lipidiques des cires épi et intra cuticulaires apparaissent excessivement divergents entre plantes supérieures et même entre tissus. Cependant, une tendance semble se dégager de ces analyses qui suggèrent que les cires épicuticulaires sont composées majoritairement de molécules aliphatiques et d'une part minoritaire de composés cycliques, alors que les cires intracuticulaires montrent des profils plus variables, avec des quantités de composés cycliques opposées. Ces différences de composition biochimique suggèrent des rôles différents entre les cires épi et intracuticulaires, notamment au niveau des propriétés de protections des tissus contre les pertes en eau non stomatales. Il a été montré qu'une augmentation de la quantité de composés cycliques (triterpénoïdes de type β-amyrine) au niveau des cires intracuticulaires perturbait significativement l'efficacité de résistance à la transpiration (Buschhaus et Jetter, 2012). De plus, le fait d'enlever les cires épicuticulaires, pourtant riches en composés aliphatiques modifie assez peu la résistance à la dessiccation (Vogg *et al*., 2004). Il semblerait ainsi que

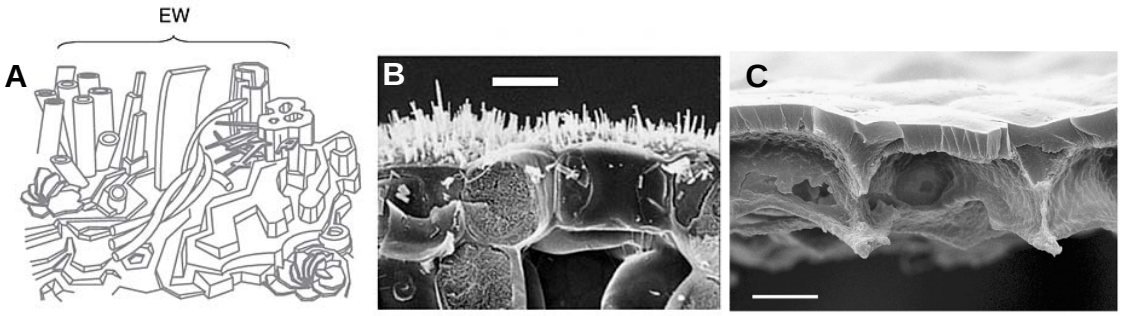


Figure 17: Illustration de la variété morphologique des cires épicuticulaires chez des plantes supérieures. A. Représentation schématique des différentes formes cristallines des cires épicuticulaires. Observations au microscope électronique à balayage de coupes transversales de feuilles après cryofracture de *Brassica oleracera* cv. *Fribor* (B) (d'après Shepherd et Griffith, 2006) et de péricarpe de fruit de *Solanum lycopersicum* cv. *Roma* au stade Mature Green (C). Echelle : 10 µm (d'après Bargel et Neinhuis, 2005).

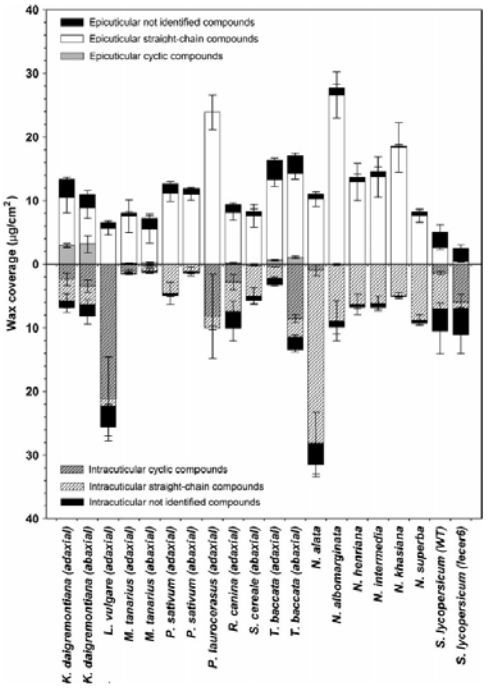
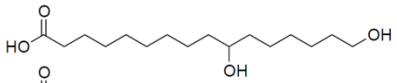
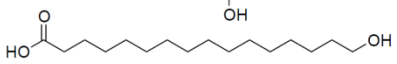
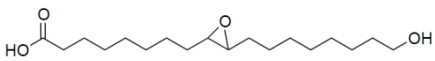
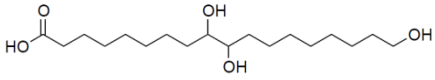
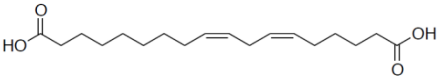
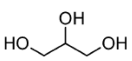


Figure 18 : Composition en chaînes aliphatiques, composés cycliques et composés non identifiés des cires épicuticulaires et intracuticulaires de plantes supérieures, exprimées en µg par cm². Les échantillons sont des surfaces de feuilles abaxiales ou adaxiales, les zones glissantes de *Sarracenia* ou des fruits (d'après Buschhaus et Jetter, 2011)

Table 3 : Principaux composants des monomères de cutine en C_{16} et C_{18} (d'après Yeats et Rose, 2013).

Type de monomère	Structure générique
10,16-dihydroxypalmitate	
16-hydroxypalmitate	
9,10-epoxystearate	
9,10,18-trihydroxystearate	
octadeca-cis-6,cis-9-diene-1,18-dioate (*Arabidopsis* stems and leaves)	
glycérol	

ce soit la proportion entre triterpénoïdes et composés aliphatiques au niveau de la couche intracuticulaire qui soit un des éléments clés du maintien de l'étanchéité de la cuticule (Vogg *et al*., 2004 ; Leide *et al*., 2011 ; Parsons *et al*., 2012). Ces différences de composition à l'intérieur de la couche intracuticulaire se traduiraient par la formation de micro-domaines, cristallins ou amorphes suivant leur proportion en alcanes et triterpénoïdes, qui auraient des propriétés de transpiration cuticulaire différentes (Vogg *et al*., 2004, Casado et Herédia, 1999, Parsons *et al*., 2012). Les propriétés amphiphiles des triterpénoïdes pourraient leur permettre de jouer le rôle de surfactant entre les composés cuticulaires et pariétaux.

2.2.2 Cutine

La cutine est un polymère lipidique qui assure un rôle structurel et qui peut être assimilé au squelette de la cuticule. C'est un polyester d'acides gras hydroxylés dont les unités de base, les monomères de cutine, peuvent être caractérisés par dépolymérisation (Kolattukudy, 1981). Ces monomères sont classés en deux grandes classes : les monomères en C_{16} et les monomères en $C_{18.}$, chacune composée d'une large gamme de molécules. La composition ou le ratio entre les C_{16} et les C_{18} de la cutine varient suivant les espèces considérées, l'organe ou le stade de développement (Bargel *et al*., 2006).

Dans la majorité des cutines, le monomère de base est un acide gras ω-hydroxylé, dont le précurseur peut être soit de l'acide palmitique (C_{16}), soit de l'acide stéarique (C_{18}) (table 3). Cet acide gras peut présenter des substitutions oxygénées en milieu de chaîne carbonée (groupes hydroxy, epoxy et parfois α-diols). En général, les acides 9 ou 10,16-dihydroxypalmitique et 16-hydroxypalmitique sont les monomères de cutine en C_{16} majeurs alors que les acides 9,10,18-trihydroxystéarique et 9,10-epoxy,18-hydroxystéarique sont les monomères de cutine principaux en C_{18}. Les autres composés présents dans la cutine sont le glycérol (Graça *et al*., 2002) qui va intervenir dans la structure du monomère de cutine, des acides gras, des alcools gras, des aldéhydes, des cétones ou des dérivés phénoliques comme l'acide hydroxycinnamique (Nawrath, 2002). Bien qu'*Arabidopsis* soit largement utilisé comme plante modèle, l'analyse de la cutine de la tige a apporté des informations relativement atypiques au regard de ce qui est observé pour la plupart des plantes et de leurs organes aériens. En effet, si elle est composée d'acides 16-hydroxyhexadécanoïque et 9 ou 10,16-dihydroxyhexadécanoïque typiques des cutines végétales, elle est majoritairement composée d'acides gras dicarboxyliques comme les dérivés dioïques de l'acide palmitique (acide hexadécane-1,16 dioïque), de l'acide linoléique (acide octadécadiène-1,18 dioïque) et de l'acide oléique (acide octadécène-1,18 dioïque), décrit jusqu'ici comme des composants de subérine (Bonaventure *et al*., 2004). Chez le fruit de la tomate, la cutine présente une composition relativement simple où le 9 ou 10,16-

	Small Green (15-25 mm)	Mature Green (taille finale)	Red Ripe
Hexadecanoic acid	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.4	2.5 ± 1.5
16-OH hexadecanoic	14.8 ± 2.1	16.3 ± 0.9	31.9 ± 1.3
9(10),16-diOH hexadecanoic[a]	350.3 ± 40.0	901.3 ± 41.5	1007.8 ± 15.5
Hexadecane-1,16-dioic	1.1 ± 0.2	4.7 ± 1.7	11.8 ± 4.3
Octadecanoic acid	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	2.4 ± 2.0
18-OH octadecanoic	30.6 ± 4.9	101.8 ± 36.8	93.6 ± 2.7
9,18-diOH octadecanoic	3.7 ± 0.6	7.7 ± 0.6	17.7 ± 0.8
9,10,18-triOH octadecanoic	13.1 ± 2.8	4.0 ± 1.3	4.9 ± 0.9
9,10,18-triOH octadecenoic[b]	2.9 ± 0.3	2.8 ± 1.4	3.1 ± 0.5
p-Coumaric acid	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.3
m-Coumaric acid	6.0 ± 0.9	15.6 ± 3.3	31.9 ± 0.5
Total identifed	425.3 ± 38.2	1056.6 ± 86.0	1209.7 ± 9.0

Table 4 : Composition des monomères de cutine chez le fruit de *Solanum lycopersicum* var. Ailsa Craig au cours de 3 stades de développement. (d'après Kosma *et al*., 2010). Les valeurs moyennes sont présentées en µg.cm². a : contenu en isomère non déterminé ; b : double liaison non déterminée.

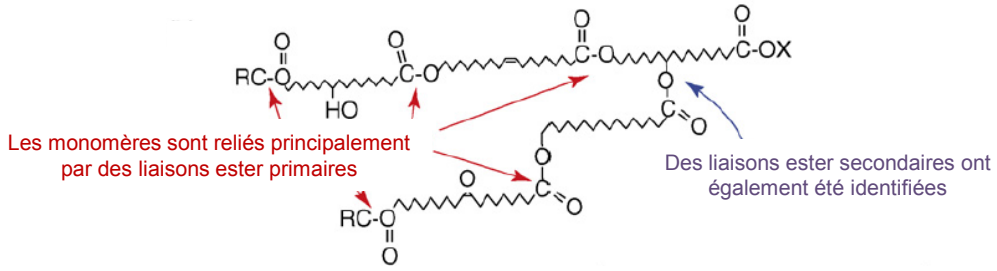


Figure 19 : Exemple de structure polymérique de la cutine. Des liaisons esters permettent d'établir des domaines linéaires ou branchés à partir de monomères en C_{16} ou C_{18} (d'après Pollard *et al*., 2008).

dihydroxypalmitate représente plus de 80% des monomères de cutine (table 4) (Kosma et al., 2010).

La structure polymérique de la cutine s'établie par l'estérification des groupements hydroxyl, entre les chaînes d'acides gras et un glycérol. Les groupements hydroxyl primaires permettent l'édification de structures linéaires alors que les groupements hydroxyl secondaires sont à l'origine de structures branchées, à l'origine d'un réseau tridimensionnel (figure 19) (Stark *et al*., 2000).

2.2.3 Cutane

Lors des analyses de la cuticule des plantes, il est apparu qu'après délipidation et hydrolyse alcaline persistait un résidu solide et amorphe, le cutane. Bien qu'absent dans le fruit de tomate, ce biopolymère peut être le principal constituant de la cuticule comme chez *Beta vulgaris* (Tegelaar *et al*., 1991) ou *Clivia miniata* où il représente 56% du poids secs de la cuticule (Villena et al., 2000). Des études sur les cutanes isolés d'*Agave americana* L. et *Clivia miniata* ont révélé qu'en plus de sa composition polysaccharidique proche de la paroi cellulaire, le cutane contient des parties aromatiques et aliphatiques (Tegelaar *et al*., 1991). Il est composé de chaînes alkyl liées par des liaisons éthers et par des liaisons carbone-carbone entre chaînes aliphatiques, avec des longueurs de chaînes variant de 22 à 34 atomes de carbone (Bargel *et al*., 2006). Le principal précurseur de la biosynthèse du cutane serait l'acide linoléique et dans une moindre mesure les acides palmitique et oléique (Pollard *et al*., 2008).

Les relations entre le cutane et la cutine semblent complexes et restent encore peu documentées de par la difficulté d'analyse du composé. Chez *Clivia miniata*, il a été montré que le cutane, dont les propriétés biomécaniques montrent une faible plasticité, est déposé tardivement sur la cutine, après que l'expansion cellulaire soit terminée (Schmidt *et al*., 1982). Le cutane pourrait jouer un rôle dans la structure fine de la cuticule mais rien n'est encore démontré.

2.2.4 Subérine

La subérine est un polymère extracellulaire qui est déposé en même temps que les cires dans différents tissus pendant la croissance de la plante et en fonction de l'espèce végétale. La subérine est présente de manière constitutive dans le périderme en croissance des tissus aériens et dans plusieurs tissus souterrains comme l'épiderme, l'hypoderme et le périderme des racines, où le dépôt de subérine s'effectue au niveau de la face interne de la paroi primaire (figure 20A). Elle peut être également présente au niveau de la zone d'abscission pendant le développement de la graine et dans les organes de sécrétion sous

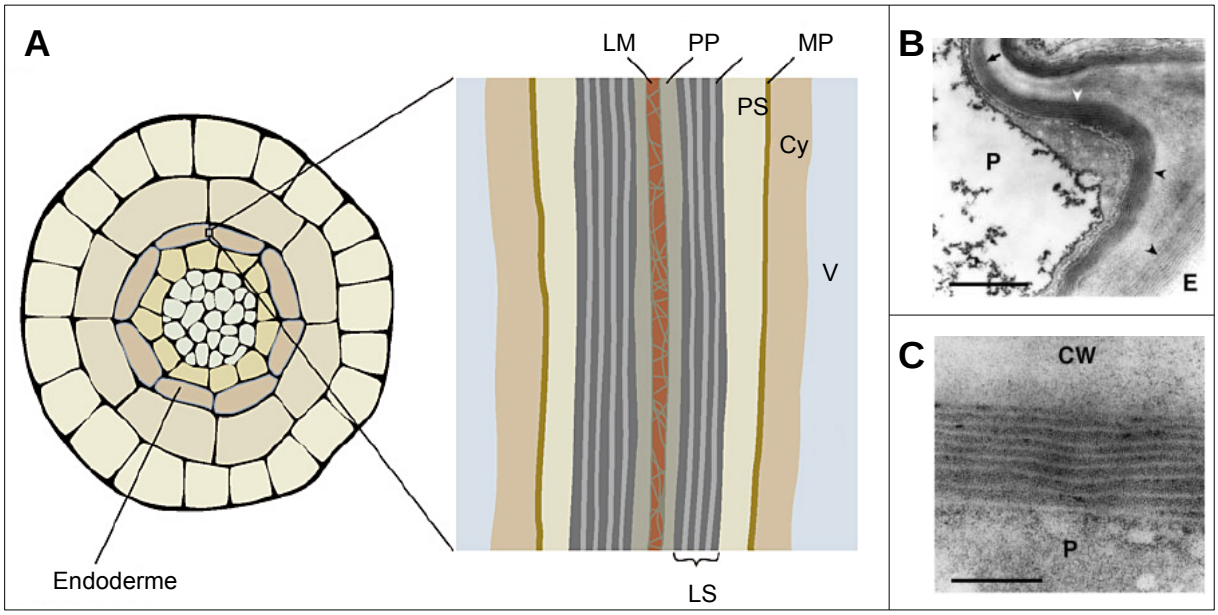


Figure 20 : Illustration du dépôt de subérine dans les cellules de l'endoderme d'une racine. A. Représentation schématique de la déposition de subérine. Deux cellules adjacentes, avec la lamelle moyenne (LM) entre leurs parois cellulaires primaires (PP) sont représentées. Le dépôt de lamelles de subérine (LS) s'effectue au niveau de la face interne de la paroi primaire de chaque cellule, le dépôt de lignine et de cellulose forme la paroi secondaire (PS), intercalée entre la lamelle de subérine et la membrane plasmique (MP). Cy : cytoplasme, V : vacuole. (D'après Pollard *et al*., 2008). B. Ultra structure de tissus racinaires subérisés d'*Arabidopsis thaliana*. Echelle : 500 nm. C. Grossissement de B, échelle : 100 nm. P. peridermal cell; E : endodermal cell; CW : cell wall. D'après Nawrath, 2002.

monomère	Abondance en % et monomères communs	
	cutine	subérine
Acides gras non substitués	**1 à 25%** $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$	**1 à 10%** $C_{18:0}$ à $C_{24:0}$
Acides gras ω-hydroxy	**1 à 32%** $C_{16:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$	**11 à 43%** $C_{18:1}$, $C_{16:0}$ à $C_{26:0}$
Acides α,ω-dicarboxyliques	**< 0.5%** sauf *Arabidopsis* > 50% $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$	**24 à 45%** $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{16:0}$ à $C_{26:0}$
Acides gras epoxy	**0 à 34%** $C_{18:0}$, $C_{18:1}$	**0 à 30%** $C_{18:0}$, $C_{18:1}$
Acides gras polyhydroxy	**16 à 92%** $C_{16:0}$, $C_{18:0}$	**1 à 2%** $C_{18:0}$
Acides polyhydroxy α,ω-dicarboxylique	**traces**	**0 à 8%** $C_{18:0}$
Alcan-1-ols et alcen-1-ols	**0 à 8%** $C_{16:0}$, $C_{18:1}$	**1 à 6%** $C_{18:0}$ à $C_{22:0}$
α,ω-alcanediols et α,ω-alcendiols	**0 à 5%** $C_{18:1}$	**0 à 3%** $C_{22:0}$
Glycerol	**0 à 14%**	**14 à 25%**
Phenols	**0 à 1%**	**0 à 10%**

Table 5 : Comparaison de l'abondance des monomères communs entrant dans la composition de la cutine et de la subérine. (D'après Pollard et al., 2008).

forme de fibres (Kolattukudy, 1981). La subérine est également déposée en réponse à des blessures ou à des attaques de pathogènes. Elle agit comme une barrière contre les pertes hydriques et comme protection contre l'invasion des pathogènes opportunistes (Nawrath, 2002).

Malgré les similarités structurales, fonctionnelles et biochimiques de la subérine avec la cutine, la subérine se caractérise par une composition différente (table 5). En microscopie électronique à transmission, la subérine apparaît comme une succession de lamelles transparentes et opaques aux électrons (figure 20B et C). Alors que la partie transparente a une épaisseur relativement constante, celle de la partie opaque est variable (Nawrath, 2002).

La subérine est considérée comme un hétéropolymère composé de parties aliphatiques et phénoliques qui se lieraient entre elles par des liaisons esters (Kolattukudy, 1981), formant des domaines polyaliphatiques et polyaromatiques. La dépolymérisation de la subérine libère des monomères d'acides hydroxycinnamiques (30% de la composition totale), des acides α-ω-dicarboxyliques ainsi que des acides feruliques, cinnamiques, p-coumariques et caféiques. La portion aliphatique du polymère est principalement composée d'acides gras ω-hydroxylés de 16 à 28 atomes de carbone, des acides gras α-ω-dicarboxyliques (C_{16} à C_{26}) et en quantités moindres des acides gras à très longues chaînes et des alcools gras (C_{18} à C_{30}). Le glycérol est un monomère majeur de la subérine (environ 20%) qui serait estérifié à un grand nombre de composés aliphatiques et aromatiques tels que des acides gras, des α-ω-diacides ou des acides feruliques (Moire *et al*., 1999 ; Graça et Pereira, 2000).

Quelques cires apparaissent également dans la subérine mais à la différence des cires cuticulaires, chimiquement distinctes des monomères de cutine, les cires associées à la subérine contiennent des composés proches des monomères de subérine. De plus, des relations métaboliques existent entre subérine et cires chez *Arabidospis* (Li et al., 2007b).

2.2.5 L'autre matrice extracellulaire : la paroi

2.2.5.1 Nature de la paroi

La paroi cellulaire est un squelette polymérique de la matrice extracellulaire, spécifique des végétaux. Elle présente une grande dynamique tant sur le plan de ses propriétés mécaniques que sur l'évolution de sa structure au cours du développement des organes végétaux. Des modifications de la structure de la paroi peuvent aussi avoir lieu en réponse à des stress biotiques et abiotiques.

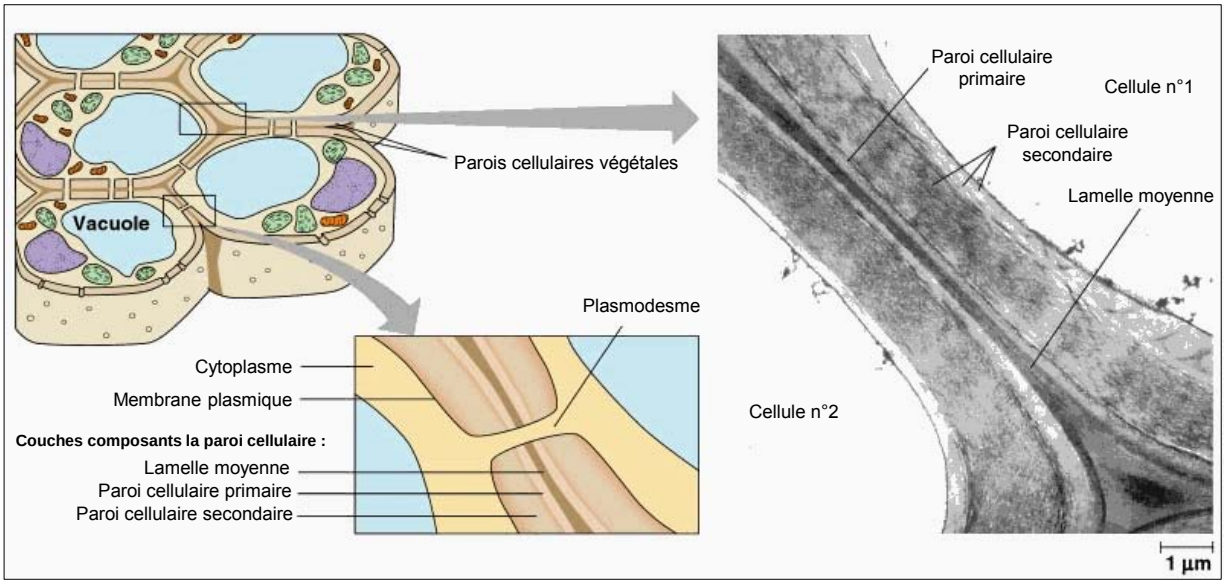


Figure 21 : Structure de la paroi cellulaire composée de la lamelle moyenne, de la paroi primaire et facultativement, de la paroi secondaire. Sur la représentation schématique de 2 cellules voisines, les parois cellulaires sont séparées mais le cytoplasme forme un continuum par le plasmodesme. L'observation en microscopie électronique à transmission montre des parois cellulaires séparant deux cellules voisines. D'après Pearson Education, Inc Benjamin Cummings.

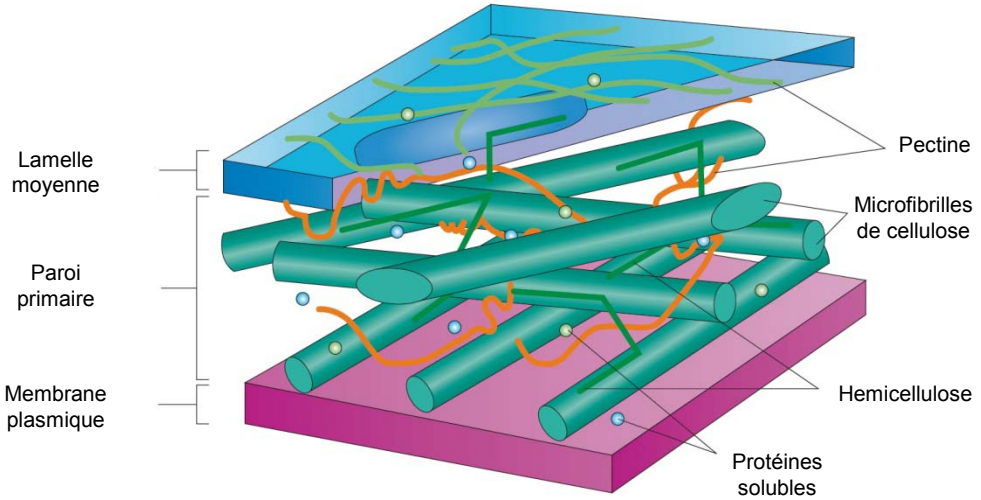


Figure 22 : Représentation tri dimensionnelle de l'architecture pariétale et des différents composants de la paroi végétale : microfibrilles de cellulose, hémicellulose, pectine et protéines solubles. La paroi cellulaire secondaire contient en plus de la lignine (d'après Sticklen, 2008).

Elle est composée d'une paroi cellulaire primaire, d'une lamelle moyenne, commune aux 2 cellules voisines et qui permet la cohésion entre les cellules et les tissus, et parfois d'une paroi secondaire (figure 21). Cette paroi secondaire est développée entre la membrane plasmique de la cellule et la paroi cellulaire primaire par certaines cellules ayant atteint leur taille définitive. La structure et la composition de cette paroi secondaire caractérisent le type cellulaire (Carpita et Mc Cann, 2000).

2.2.5.2 Composition

La paroi est un élément organisé de polysaccharides (celluloses, hémicelluloses et pectines), de protéines structurales et enzymatiques, ainsi que de substances aromatiques. On parle de paroi primaire pecto-cellulosique chez les dicotylédones puisque le réseau de fibrilles de cellulose et d'hémicellulose est maintenu par le ciment de pectines (Carpita et Gibeaut, 1993). Tous ces composants sont sécrétés par la cellule et assemblés en un réseau organisé, lié par des liaisons covalentes ou non.

La teneur de chaque composant est variable en fonction du tissu et de l'espèce considérée, mais des composés majoritaires sont systématiquement présents et organisés de façon semblable (figure 22).

La **cellulose** est le polysaccharide végétal le plus abondant puisqu'il représente entre 15 et 30% de la masse sèche des parois cellulaires primaires, et davantage encore pour les parois secondaires. La cellulose est un polymère de β-(1,4)-D-glucoses dont les chaînes s'associent entre elles par des liaisons hydrogènes, pour former des microfibrilles aux propriétés cristallines, pouvant atteindre plusieurs centaines de micromètres de long.

La **callose**, qui peut être produite en réponse à des blessures ou à des pathogènes, est peu abondante et est constituée d'un assemblage de β-(1,3)-D-glucoses, susceptible de former des dimères ou des trimères.

Les **hémicelluloses** principales dans les parois primaires sont les xyloglucanes (composé majoritaire chez les dicotylédones) et les glucuronoarabinoxylanes. Les xyloglucanes peuvent se lier par des liaisons hydrogènes aux microfibrilles de cellulose pour former un réseau et sont composés d'un squelette linéaire de β-(1,4)-D-glucanes sur lequel se greffent de nombreuses unités d'α-D-xylose, voire d'α-D-galactose (ou α-L-fucose chez Arabidopsis). La structure des glucuronoarabinoxylanes varie considérablement suivant les plantes considérées.

Les **pectines**, peuvent représenter jusqu'à un tiers des composants macromoléculaires des parois cellulaires et sont composées de polymères polysaccharidiques, principalement l'homogalacturonane et les rhamnogalacturonanes I et II.

Des **protéines structurales** et des **enzymes** composent aussi la paroi. Leurs natures sont très variables et ces protéines représentent moins de 10% de la masse pariétale. Elles sont pourtant essentielles au maintien et à la régulation des fonctions physiques et biologiques de la matrice extracellulaire de la plante. Les protéines structurales les plus répandues sont les glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGPs), les protéines riches en prolines (PRPs), les protéines riches en glycines (GRPs) et les protéines riches en arabinogalacturonanes (AGPs).

Les enzymes les plus rencontrées sont des glycosidases qui participent aux réarrangements pariétaux, des expansines qui participent à la régulation de la croissance cellulaire en permettant l'incorporation de nouveaux composants. Enfin, la famille des péroxydases, largement représentée, participe à la croissance pariétale en catalysant la formation de liaisons intermoléculaires.

Les parois cellulaires primaires peuvent aussi contenir des quantités significatives de **substances aromatiques** comme les acides hydroxycinnamiques, en particulier les acides feruliques et p-coumariques. Ces acides hydroxycinnamiques peuvent être réduits en hydroxycinnamol, un alcool précurseur de la lignine et autres structures ligneuses (Carpita et Mc Cann, 2000).

La **lignine** est définie comme un réseau hydrophobe complexe composé d'unités phénylpropanoïdes. La lignification est un processus complexe de différenciation tardive des parois cellulaires, concomitant avec l'apparition des parois cellulaires secondaires dans les tissus âgés. La lignine semble donc se limiter aux tissus ayant achevé leur croissance et, au contraire des autres composés phénoliques des parois, elle n'est pas considérée comme un constituant des parois cellulaires primaires des tissus en croissance. Cependant, la lignine a été mise en évidence dans des parois cellulaires primaires de coléoptile de maïs (Müsel *et al*., 1997) et dans des parois de tissus jeunes en conditions de stress, lors d'interactions avec des pathogènes fongiques ou suite à une blessure. De plus, il a été montré une surexpression significative des gènes impliqués dans la biosynthèse de la lignine chez des lignées de tomates résistantes à la bactérie du sol *Ralstonia solanacearum* (Ishihara *et al*., 2012).

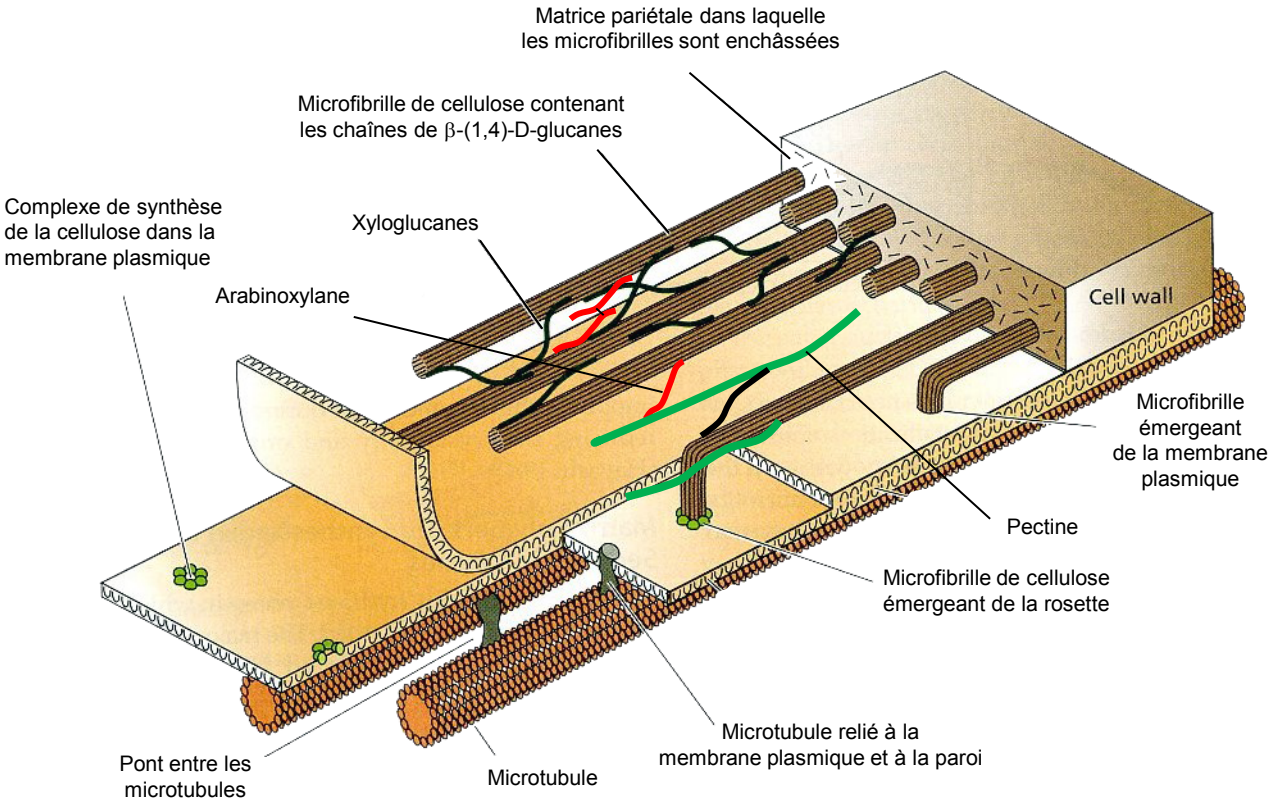


Figure 23 : Représentation schématique des liaisons entre les composants de la paroi pour former une structure rigide. Les hémicelluloses (xyloglucanes et arabinoxylanes) peuvent former un réseau primaire avec la cellulose et peuvent également se lier aux pectines. Celles-ci peuvent aussi se lier directement à la cellulose. (adapté de Gunning et Steer, 1996)

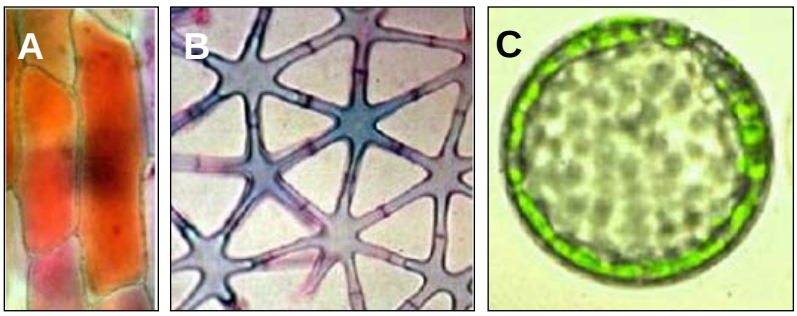


Figure 24 : Rôle de la paroi dans la morphogénèse cellulaire. A. cellules de pétales de *Tulipa sylvestris* (photo : J.P. Rubinstein) ; B. cellules étoilées de la moëlle de *Juncus maritimus* (photo : R. Prat) ; C. Protoplastes isolés à partir de parenchyme chlorophyllien de feuille d' *Allium porrum* (photo : J.P. Rubinstein).

2.3 Fonctions biologiques des matrices extracellulaires

2.3.1 Paroi

2.3.1.1 Rigidité cellulaire et structure de la plante

Les flux d'eaux internes à la cellule créent une pression hydrostatique qui doit être contre balancée par une force de résistance mécanique. Cette résistance est assurée par la paroi cellulaire végétale qui, grâce à sa composition en microfibrilles de cellulose, lignine, pectine et protéines structurales, va permettre à la matrice extracellulaire d'acquérir une rigidité cellulaire remarquable (figure 23) et jouer le rôle d'un exosquelette. Cette rigidité contrôlée va permettre de modeler la morphologie de la cellule en fonction des nécessités tissulaires (figure 24A et B) mais aussi la structure de la plante. Ce rôle dans la morphogenèse cellulaire peut être mis en évidence par une digestion enzymatique de la paroi, qui va entraîner un relâchement des contraintes de la cellule qui acquiert alors une forme sphérique (figure 24C).

La composition en cellulose est l'une des caractéristiques qui différencient les parois primaires des parois secondaires. En effet, la longueur des molécules de cellulose caractérisée par le degré de polymérisation varie en fonction de la nature de la paroi. La cellulose de la paroi primaire possède plusieurs centaines d'unités de glucose comparée à celle de la paroi secondaire, qui en compte près de 14000. L'augmentation du degré de polymérisation permettrait une rigidification de la structure (Sakurai, 1998). Certaines protéines de structures telles que les extensines et les protéines riches en proline PRPs , de par leur fort contenu en tyrosine, favoriseraient aussi le niveau de réticulation du réseau pariétal (Sakurai, 1998).

L'organisation de la paroi cellulaire, avec son réseau de pectine pontant la lamelle moyenne, permet une adhésion entre les cellules adjacentes et par conséquent, participe à la structuration des tissus. Cette contrainte sur le mouvement cellulaire va d'une part, autoriser une résistance mécanique élevée des tissus, ce qui va permettre une croissance des végétaux sur de grandes longueurs, et d'autre part dicter leur mode de développement (Cosgrove, 1985).

2.3.1.2 Développement et croissance cellulaire

Du fait de cette rigidité, les parois cellulaires agissent également comme un régulateur de la croissance cellulaire. Le réseau pectique, en limitant la porosité et l'accès des liaisons entre les composants des parois affecte négativement la croissance cellulaire. En effet, ce réseau gène l'accès des enzymes de digestion des parois cellulaires à leurs

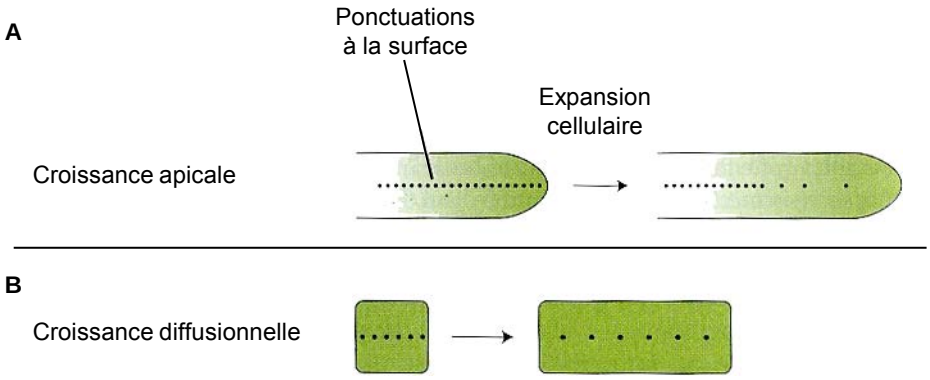


Figure 25 : Illustration de la croissance de la surface cellulaire. A. Croissance apicale : si des marques, par exemple des ponctuations, sont placées à la surface de la cellule, seules les marques situées à l'intérieur du dôme apical vont s'espacer. B. Croissance diffusionnelle : les distances entre toutes les marques vont s'espacer au fur et à mesures de la croissance de la cellule (d'après Cosgrove J., Plant Physioly 3rd Ed., ch.15).

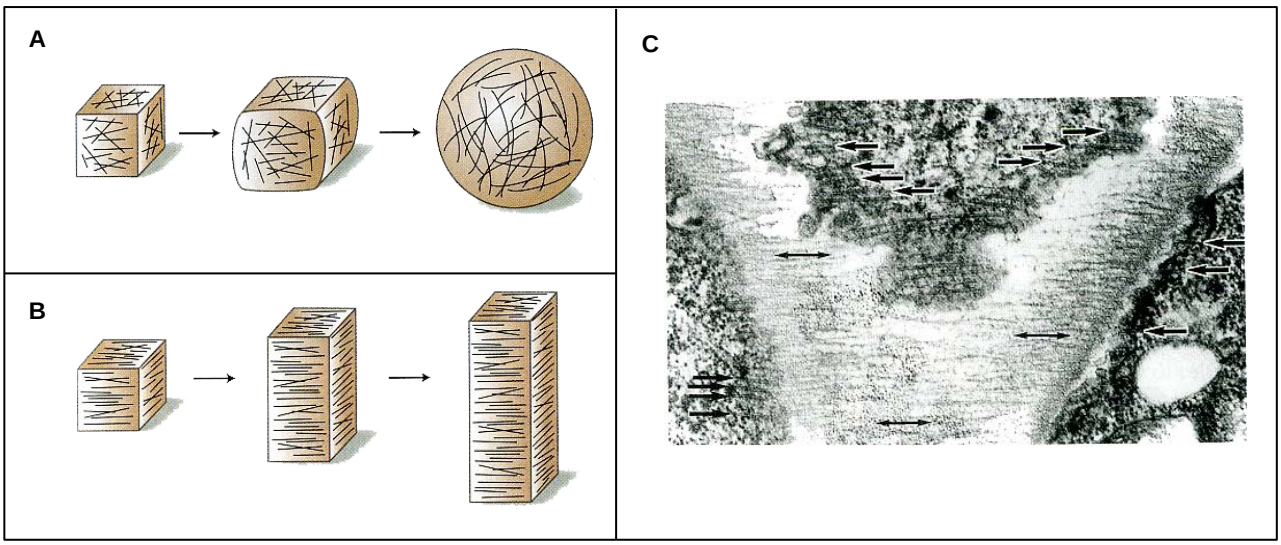


Figure 26 : Représentation schématique de l'orientation des microfibrilles de cellulose néo-synthétisées, déterminant la direction de l'expansion cellulaire. A. Paroi cellulaire renforcée par des microfibrilles de cellulose orientées aléatoirement, entraînant une croissance multidirectionnelle, aboutissant à une sphère. B. Microfibrilles de cellulose synthétisées dans la même orientation : la résistance mécanique induite par l'armature de cellulose va obliger la cellule à croître perpendiculairement à l'orientation des microfibrilles. C. Alignement des microfibrilles de cellulose observé en microscopie électronique dans l'extrémité d'une racine d'*Azolla filiculoides.* L'axe de la racine est vertical alors que les microfibrilles pariétales (flèche double) et les microtubules (flèche simple) sont alignés transversalement (photo : A. Hardham) (d'après Cosgrove J., Plant Physioly 3rd Ed., ch.15)

substrats glycosidiques. Ainsi, pour permettre la croissance, la cellule va devoir relâcher son réseau pariétal.

Suite à une stimulation hormonale *via* l'auxine, les pompes à protons membranaires sont activées provoquant la sécrétion d'ions H^+ dans l'espace pariétal. Cette acidification du milieu entraine une augmentation de la plasticité pariétale et favorise la production des expansines. Ces protéines s'intercaleraient entre les molécules de xyloglucane et les microfibrilles de cellulose et rompraient les liaisons hydrogènes, détendant ainsi le réseau et augmentant les distances entre les molécules. Cette augmentation de la plasticité pariétale soumise à la pression interne de turgescence permet à la cellule de croître. La paroi désormais en expansion voit de nouveaux polymères pariétaux synthétisés et sécrétés.

L'expansion pariétale peut être confinée à un dôme apical à une extrémité de la cellule, on parle alors de croissance en pointe ou croissance apicale (figure 25A) ou alors distribuée sur toute la surface de la cellule et on parle d'une croissance diffusionnelle (figure 25B). La plupart des cellules végétales sont de type diffusionnelle et le modèle apical n'est caractéristique que des poils absorbants racinaires ou du tube pollinique. Les trichomes et certaines fibres ont adopté un mode de croissance intermédiaire entre apical et diffusionnel. La pression de turgescence génère une force multidirectionnelle et il semble que ce soit l'orientation des microfibrilles de cellulose qui confère une directionnalité à la croissance (figure 26). Si la paroi cellulaire est renforcée par des microfibrilles de cellulose orientées aléatoirement, la cellule va croître de façon équivalente dans toutes les directions (figure 26A). Au contraire, quand la plupart des microfibrilles sont orientées parallèlement, la cellule va s'accroître perpendiculairement à l'orientation des microfibrilles, pour éviter les contraintes liées au renforcement par la cellulose (figure 26B). Ainsi, si l'orientation des microfibrilles est transversale, alors l'expansion sera longitudinale (figure 26C).

Lorsque l'expansion cellulaire s'arrête, de nombreuses modifications ont lieu au niveau de la paroi : réduction des processus de relâchement, augmentation de la réticulation, rigidification de la structure par des changements de composition (Cosgrove, 1997).

2.3.1.3. Maturation du fruit

Dans le contexte du fruit, la paroi évolue au cours du développement et subit de profonds changements du murissement du fruit. En effet, l'architecture de la paroi et la composition en polysaccharides sont progressivement modifiées, avec notamment des baisses drastiques de la quantité de galactose, moindre en arabinose, sous l'action des β-galactosidases et α-arabinosidases (Brummell et Harpster, 2001). Dans le même temps, la dépolymérisation des xyloglucanes débute et entraîne une réorganisation du réseau

hémicellulosique. Les 2 enzymes les plus importantes impliquées dans la dégradation des pectines au cours de la maturation sont la polygalacturonase (PG) et la pectine méthyl estérase (PME). Enfin, le ramollissement du fruit de tomate serait fortement affecté par la dérégulation des expansines qui facilitent l'accès des hémicellulases et pectinases aux parois cellulaires (Cosgrove, 2000).

La paroi intervient aussi sur la texture du fruit car l'adhésion cellulaire y joue un rôle déterminant. En effet, l'adhésion résulte de l'interaction entre la rigidité de la lamelle moyenne, la proportion de méats (espaces intercellulaires) et la répartition des plasmodesmes (Harker *et al*., 1997). Lors du mûrissement, la lamelle moyenne riche en pectine se dégrade sous l'action des activités PG et PME, entraînant une rupture de l'adhésion des cellules (Brummell et Harpster, 2001).

2.3.1.4 Production de molécules signales

Dans certains cas, des molécules dérivées de la paroi peuvent informer la cellule d'un changement des conditions environnementales ou de la présence de pathogènes. En effet, la dégradation de la paroi peut produire des fragments biologiques actifs de 10 à 15 résidus de long, appelés oligosaccharines. Ces résidus peuvent être impliqués dans des réponses développementales ou de défenses par leur action sur les stimulations de la synthèse des phytoalexine, d'éthylène, des protéines pathogen-related protein, comme les glucanases et chitinases, la production massive d'espèces réactives de l'oxygène, la dépolarisation des membranes ou des modifications sur le calcium cytoplasmique (John *et al*., 1997).

2.3.2 Cuticule

La cuticule végétale est principalement considérée comme une barrière solide empêchant les pertes en eau massives, permettant ainsi aux stomates d'effectuer un contrôle dynamique des échanges gazeux et de la transpiration. Cependant, en tant que constituant le plus externe des organes aériens des plantes, la cuticule a développé de nombreuses fonctions secondaires.

En effet, la cuticule est un constituant de l'épiderme et à ce titre, met en place les frontières physiques des organes lors du développement. Elle permet chez les espèces élaborant des cristaux de cires épicuticulaires de maintenir la surface propre pour exploiter au maximum le rayonnement lumineux. De plus, en tant qu'interface entre la plante et l'environnement, la cuticule est une barrière physique contre les ravageurs et les pathogènes. La cuticule joue aussi un rôle dans la protection contre les radiations UV et, en relation avec la paroi, intervient dans les propriétés biomécaniques des fruits.

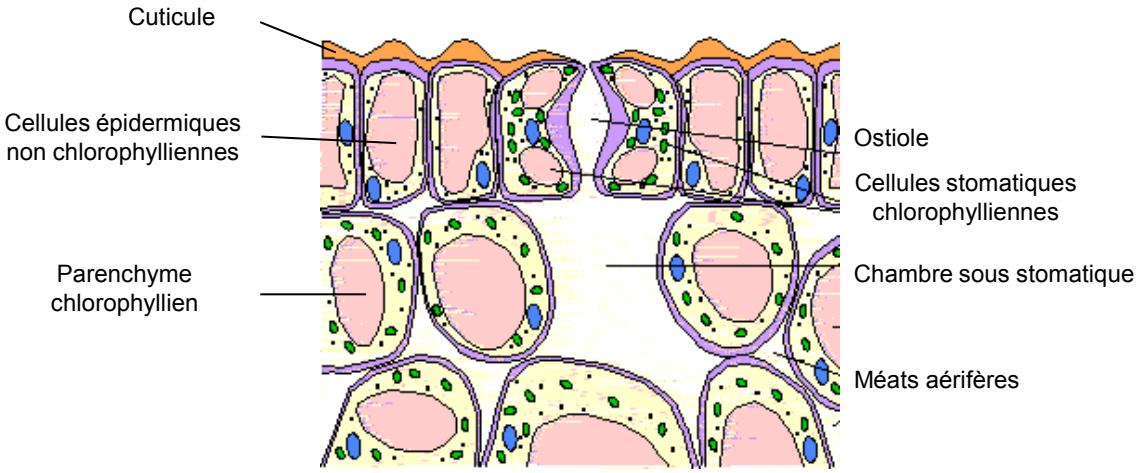


Figure 27 : Représentation schématique d'une coupe transversale de limbe d'une feuille de dicotylédone illustrant l'organisation d'un stomate, de la chambre sous stomatique aérifère et de la cuticule, en surface des cellules épidermiques (d'après R. Prat). L'étanchéité de la cuticule permet de restreindre les échanges gazeux aux zones stomatiques.

Species and organ	Sample	P [$m \cdot s^{-1}$]^a
Leaf		
Bitter orange (*Citrus aurantium*)	Isolated intact leaf cuticle with wax	8.3×10^{-10}
	Isolated wax-free leaf cuticle	1.6×10^{-7}
Common ivy (*Hedera helix*)	Isolated intact leaf cuticle with wax	1.0×10^{-10}
	Isolated wax-free leaf cuticle	2.7×10^{-8}

Table 6: Exemple de perméance (P) de l'eau dans des parois végétales cutinisées. D'après Schreiber, 2010.

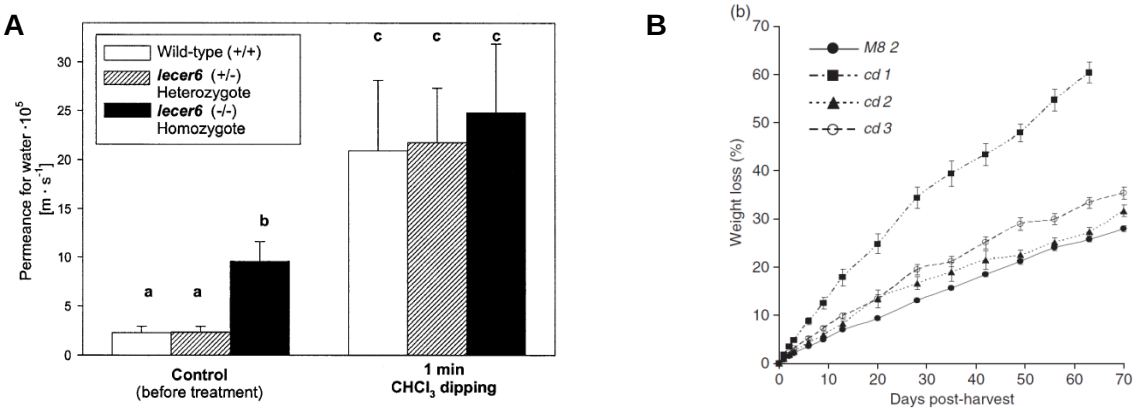


Figure 28 : Implication des cires cuticulaires dans la résistance à la dessiccation. A. Différences de perméance de la cuticule de fruits de tomate de type sauvage et du mutant *lecer6*, hétérozygote ou homozygote. L'élimination des cires par le chloroforme donne des perméances comparables entre WT et *lecer6*, démontrant le lien entre perméabilité et cires cuticulaires (Vogg *et al*, 2004). B. Analyse de la perte en eau par transpiration de fruits de tomate var. M82 et des mutants *cd1*, *cd2* et *cd3*. La réduction du taux de cutine chez ces mutants n'affecte pas significativement la perte d'eau (Issacson *et al*., 2009).

2.3.2.1 Limitation des pertes en eau et solutés

D'un point de vue physiologique, la première fonction proposée pour la cuticule est la limitation des pertes hydriques (Kerstiens, 1996 ; Riederer et Schreiber, 2001), avec pour corollaire d'éviter la diffusion vers le milieu extérieur des ions et des sucres. En effet, une des exigences principales de la vie terrestre est d'avoir le contrôle sur les relations hydriques. Afin de maintenir l'état de turgescence de ses cellules, la plante doit maintenir un équilibre entre les pertes en eau causée par la transpiration et l'entrée d'eau racinaire.

Le contrôle de la transpiration des feuilles, des tiges primaires, des fleurs et des fruits s'effectue par 2 composants : les stomates et la cuticule. Les stomates assurent le contrôle dynamique des échanges gazeux (figure 27) grâce à l'étanchéité des tissus aériens assurée par la cuticule. En effet, celle-ci réduit d'un facteur 60 la perméabilité des tissus par rapport aux stomates (Kerstiens, 1996). Lorsque les stomates sont fermés ou absent, comme à la surface d'un fruit de tomate, la régulation des échanges gazeux avec le milieu extérieur s'effectuerait *via* la cuticule. Afin de garantir une parfaite gestion de la transpiration cuticulaire, il semble qu'un système de régulation complexe existe entre stomates et cuticule, puisqu'une synthèse cuticulaire forte entraîne une diminution de la densité stomatique (Yang *et al.*, 2011).

De nombreuses études ont été menées pour caractériser la cuticule et notamment les facteurs influant les propriétés de résistance à la dessiccation. Des analyses comparatives entre des cuticules de différentes espèces n'ont pas montré de corrélations entre épaisseur de la cuticule et perméabilité (Riederer et Schreiber, 2001). Des mutants de cuticule ont mis en évidence des variations dans leur résistance à la dessiccation, aussi bien chez *Arabidopsis* que chez la tomate. Cependant, le niveau d'implication des constituants de la cuticule, cutine et cires, a donné lieu à de nombreuses conclusions divergentes.

Les cires jouent un rôle crucial dans le maintien de l'étanchéité, qui peut être quantifié en comparant la perméabilité entre des tissus à l'état natif et après extraction des cires. La mesure de perméance correspond au ratio entre l'aptitude de la cuticule à laisser passer de l'eau et son épaisseur. Cette perméance peut varier d'un facteur 100 voire 1000 suite à l'extraction des cires (table 6) (Schrieber, 2010). De plus, des études portant sur la réponse des plantes à un déficit en eau montrent que la production d'acide abscissique provoque d'une part la fermeture des stomates (Christmann *et al.*, 2006) et d'autre part entraîne de nombreux bouleversements métaboliques comme une augmentation de la synthèse des cires cuticulaires (Aharoni *et al*., 2004 ; Zhang *et al*., 2005 ; Kosma *et al*., 2009), mais pas de cutine. De plus, l'analyse de la transpiration cuticulaire chez le mutant de tomate *lecer6*, au contenu en cutine normal mais dont les cires présentent moins d'alcanes (Leide *et al*., 2007),

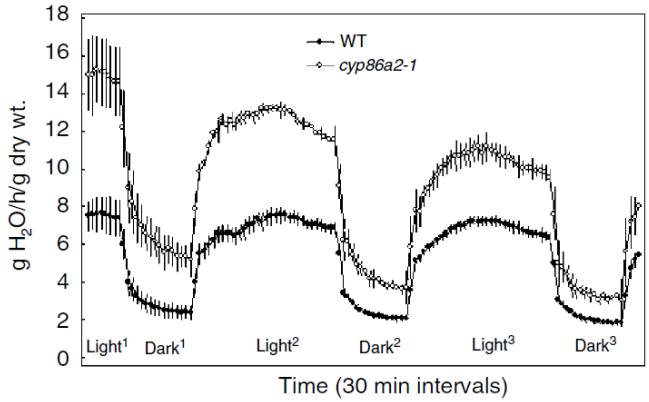


Figure 29 : Implication de la cutine dans la résistance à la dessiccation chez le mutant *cyp86a2-1* d'*Arabidopsis thaliana*. Le mutant de cutine *cyp86a2-1* montre un taux de transpiration supérieur au type sauvage. Les mesures de la transpiration ont été effectuées sur des plantes en cours de floraison, sur une photopériode de 16h de jour et 8h d'obscurité (Xiao *et al*., 2004).

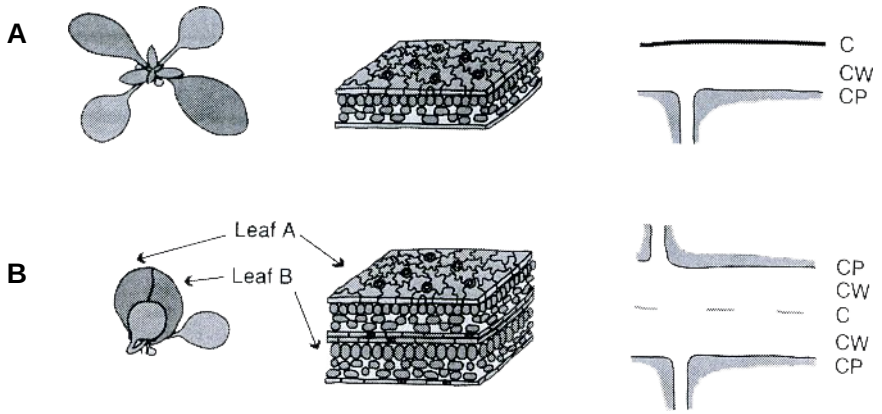


Figure 30 : Représentation schématique des feuilles fusionnées et structure cuticulaire typique. A. Plante avec cuticule normale. B. Plante avec cuticule déficiente et feuilles fusionnées. Diagramme schématique de la morphologie générale (gauche) ; section de feuille (centre) ; ultrastructure de la surface épidermique interne (droite). C : cuticule ;cw : paroi cellulaire ; cp : cytoplasme. (d'après Plant Physiology, 3rd Ed; Chapter 16)

montre une très forte perméabilité de la cuticule (Vogg *et al*., 2004) (figure 28A). Enfin, les mutants de tomate *cutin deficient 1* (*cd1*), *cd2* et *cd3* dont les fruits présentent des teneurs en cutine réduites sont relativement peu sensibles à la dessiccation (Isaacson *et al*., 2009) (figure 28B). Toutes ces données indiquent que les cires sont un élément majeur au maintien de l'étanchéité cuticulaire.

Cependant, certains travaux présentent la cutine comme un composant clé de la perméabilité de la cuticule. Le mutant *eibi1* identifié chez *Hordeum vulgare*, présente un contenu normal en cires mais une cutine réduite de 50%, qui se traduit par une sensibilité accrue à la dessiccation (Chen *et al.*, 2011). Le mutant d'*Arabidopsis thaliana permeable cuticle 1* (*pec1*) présente aussi une composition non altérée des cires cuticulaires mais une réduction de 40% des monomères de 10,16-dihydroxypalmitate, composant la cutine, conférant à ce mutant une cuticule très perméable (Bessire *et al*., 2011). Un autre mutant d'*Arabidopsis* déficient en cutine, atteint au niveau du gène CYP86A2-1, montre aussi une augmentation des pertes hydriques malgré une charge normale en cires (Xiao *et al.*, 2004) (figure 29). Enfin, pour comprendre le rôle de la composition cuticulaire sur la perte en eau, un croisement a été réalisé entre *Capsicum annuum* (PI1154) et *Capsicum chinense* (USDA162), respectivement peu résistant à la dessiccation post-récolte et très résistant, puis les cuticules et leurs propriétés ont été analysées sur une population F2. Cette étude a montré une absence de corrélation entre le taux de dessiccation et la quantité de cires de surface, alors qu'une corrélation positive existe entre le taux de dessiccation et la quantité de monomères de cutine en C_{16}. (Parsons *et al.*, 2012).

Ces études semblent démontrer d'une part que les compositions en cires ou en cutine ne sont pas à considérer séparément, et d'autres part, que le niveau de perméabilité de la barrière lipidique résulte d'une balance entre les différents constituants cuticulaires (composés aliphatiques, composés cycliques, polymères de cutine) (Parsons *et al.*, 2012) et leur structure tridimensionnelle.

2.3.2.2 Organogénèse

Comme les parois cellulaires, les assises cuticulaires ont un rôle dans le maintien de la structure de la plante. En effet, pendant le développement végétal, la cuticule joue un rôle vital dans la séparation des organes, en évitant leurs fusions. La fusion d'organe est un phénomène qui a lieu lors d'une perturbation de l'intégrité cuticulaire, qui se caractérise par une disparition de la cuticule dans la zone de contact, en plus de l'adhésion des parois cellulaires. La zone de fusion est souvent indiquée par 2 parois cellulaires polysaccharidiques adjacentes, sans cuticule visible séparant les 2 organes (figure 30). Les

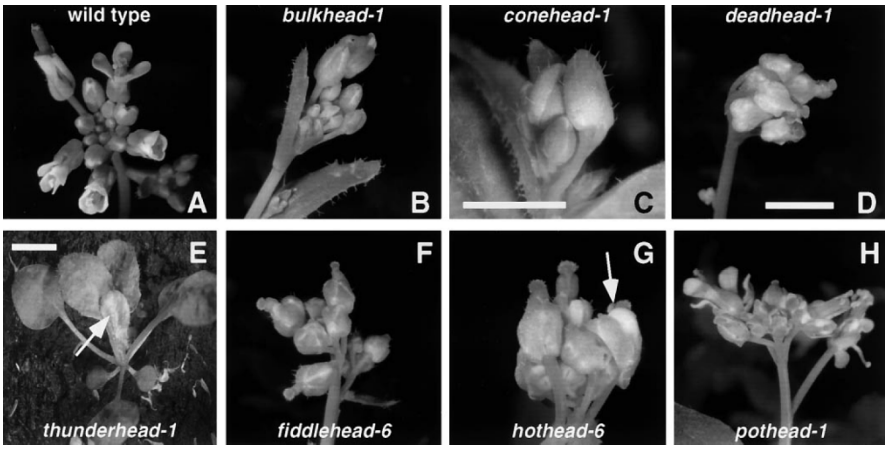


Figure 31 : Plantes d'*Arabidopsis* présentant des phénotypes de fusion d'organes. A. Inflorescence de type sauvage ; B-H : inflorescences de mutants EMS, B : *bulkhead* ; C : *conehead* ; D : *deadhead* ; E : *thunderhead* où un ensemble de feuilles fusionnées est indiqué par une flèche ; F : *fiddlehead* ; G : *hothead* , la flèche indique l'émergence de fleurs ; and H : *pothead*. Echelle : 1 cm (d'après Lolle *et al*., 1998)

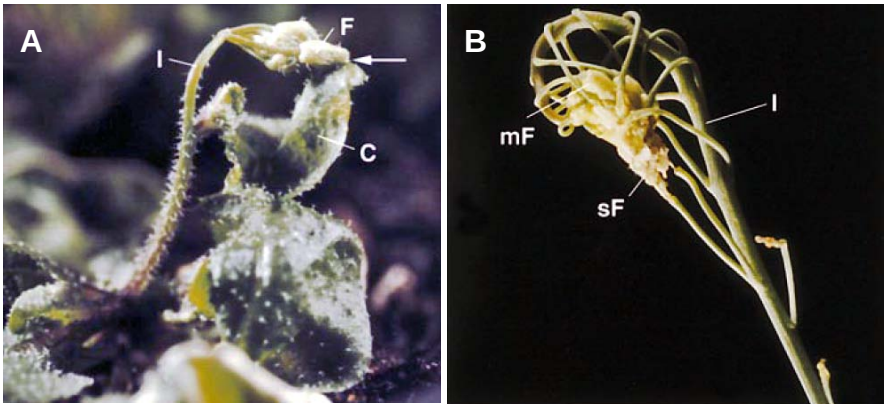


Figure 32 : Phénotype d'une plante d'*Arabidopsis* transformée avec une cutinase fongique. A : fusion entre l'inflorescence et la feuille cauline. B. Fusion multiple d'organes. I : inflorescence ; F : fleur ; C : feuille cauline, mF : fleur mature ; sF : fleur senescente (d'après Sieber *et a*l., 2000)

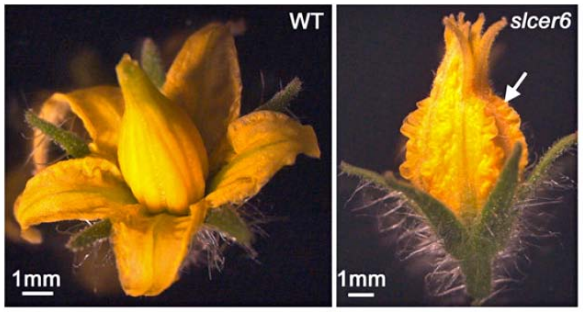


Figure 33 : Morphologie des fleurs de *Solanum lycopersicum* de type Micro-Tom sauvage (WT) et du mutant *slcer6*. Alors que la fleur du type sauvage est ouverte à l'anthèse, le mutant *slcer6* montre une fleur fusionnée. La flèche indique la suture entre les pétales chez le mutant (d'après Smirnova *et al*., 2013)

couches épidermiques fusionnées maintiennent cependant leurs identités (Sieber *et al*., 2000).

Un certain nombre de plantes présentant des phénotypes de fusions d'organes ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, obtenues généralement par mutagénèse (Fast Neutrons, rayons X, T-DNA mais principalement EMS, figure 31) (Lolle et al., 1998). La transgénèse a aussi été utilisée pour provoquer des fusions d'organes, avec des plantes d'*Arabidopsis* exprimant une cutinase fongique (Sieber et al., 2000) (figure 32). Il est intéressant de noter que la quasi-totalité des mutants de fusions *eceriferum* d'*Arabidopsis* ont tendance à relâcher leur chlorophylle (Lolle *et al*., 1998). Cette corrélation entre perméabilité à la chlorophylle et fusion d'organes chez les mutants *cer* suggérerait que ce changement de perméabilité jouerait un rôle dans l'acquisition de la compétence de fusionner chez les cellules épidermiques.

L'un des mutants d'*Arabidopsis* les mieux caractérisés présentant ces phénomènes de fusion d'organes est le mutant *fiddlehead* (Lolle et Cheung, 1993 ; Lolle *et al*., 1998 ; Yephremov *et al*,. 1999), qui présente des feuilles et des organes floraux fusionnés (figure 31 F). La protéine exprimée par le gène *FDH* est une β-ketoacyl-CoA synthase, impliquée dans la formation des acides gras à très longues chaînes (Pruitt *et al*., 2000). D'ailleurs, une mutation dans une β-ketoacyl-CoA synthase chez la tomate génère aussi des fusions d'organes mais localisées aux niveaux des organes reproducteurs uniquement (Smirnova *et al.*, 2013). En effet, le mutant *slcer6* présente un développement du tapetum anormal, ce qui provoque une fusion entre pétales (figure 33).

L'étude des mutants de fusion a fourni de nombreuses informations sur les voies de biosynthèse de la cuticule. Ainsi, les travaux menés sur le mutant *lacerata* (Wellesen *et al*., 2001) a montré que le gène *LCR* codait pour une protéine CYP86A8 de la famille des cytochromes P450, intervenant dans la ω-hydroxylation des acides gras. L'étude du mutant *hothead* (Kurdyukov *et al*., 2006b) a montré que la protéine HOTHEAD appartient à la famille des glucose-méthanol-choline oxydoréductase. Cependant, bien que HTH soit nécessaire à l'organisation de la cuticule (Krolikowski *et al*., 2003), sa fonction dans la biosynthèse de la cuticule n'a pas pu être définie précisément. Les analyses du mutant *wax2*/*yre* (Kurata *et al*., 2003 ; Tanaka *et al*., 2004), dont l'homologue chez le riz est le mutant *glossy1* (Hansen *et al*., 1997) a permis de suggérer que le gène *YORE-YORE* serait impliqué dans la synthèse des aldéhydes et des alcanes. L'étude des mutants *pasticcino3* et *gurke* (Faure *et al.*, 1998 ; Baud *et al*., 2004) a montré que le gène *ACC1* codait pour une acétyl-CoA carboxylase, responsable de la synthèse du malonyl-CoA dans les plastes, précurseur utilisé dans la synthèse des acides gras. Enfin, l'analyse du mutant *bodyguard* (*bdg*), qui présente des

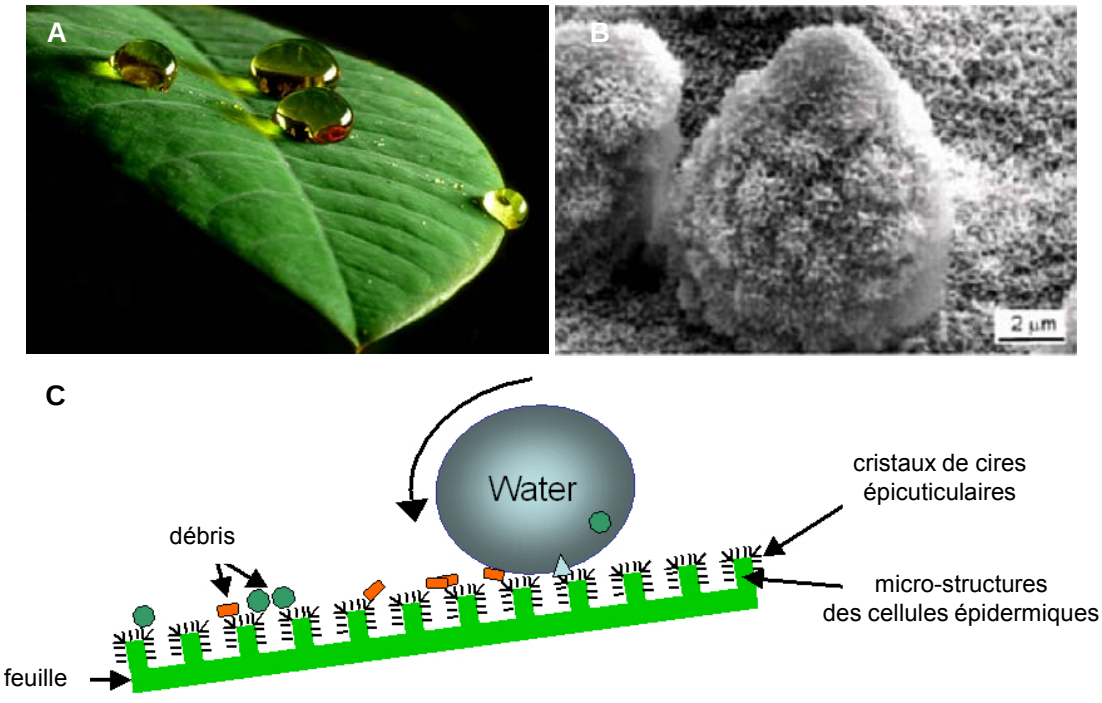


Figure 34 : Illustration de l'effet lotus. A. Feuille de *Camellia japonica* dont l'hydrophobicité entraîne un changement de conformation des gouttes d'eau, qui prennent des formes sphériques. La faible zone de contact en résultant diminue les forces de frottement statiques qui deviennent inférieures à la force de gravité, ce qui entraîne un décrochement de la goutte de la surface de la feuille (photo : furtureprospects). B. Photographie en microscopie électronique à balayage d'une microstructure épidermique d'une feuille de *L. nelumbo*. Les cristaux de cires épicuticulaires recouvrent la structure (d'après Bhushan, 2012). C. Représentation schématique de la structure d'une feuille de *L. nelumbo* et du mouvement d'une goutte d'eau à sa surface, permettant l'auto nettoyage des particules en contact avec les cires (d'après B. Poole).

fusions au niveau des organes en cours de développement, montre une désorganisation cuticulaire et une augmentation de la quantité de cires et de cutine (Kurdyukov *et al*., 2006a). La fonction de BDG reste encore à préciser mais sa localisation sur la partie externe de la paroi cellulaire, en relation avec la cuticule, ses effets sur la composition cuticulaire et la régulation de *BDG3*, proche homologue de *BDG*, par des facteurs de transcription clés de la biosynthèse cuticulaire (Shi *et al*., 2011), montrent que BODYGUARD est intimement liée à la formation du polymère de cutine.

2.3.2.3 « Effet lotus »

Une des propriétés fondamentales de la plupart des plantes est d'éliminer l'eau à la surface de leurs feuilles. L'eau, au contact de la cuticule hydrophobe, va former des gouttes qui vont glisser jusqu'au sol, permettant d'une part de ne pas faire stagner l'humidité en contact avec l'épiderme et ainsi éviter le développement de champignons, et d'autre part de collecter et de nettoyer les particules et les débris de la surface de la feuille. Ce mécanisme d'auto nettoyage est appelé « effet lotus », tirant son nom d'une caractéristique du *Lotus nelumbo*, dont la surface foliaire présente une morphologie particulière qui lui confère des qualités d'hydrophobicité remarquables (figure 34). Les cellules épidermiques de *L. nelumbo* forment un très grande nombre de microstructures, hérissées de cristaux de cires épicuticulaires. Ainsi, les gouttes d'eau en raison de leur tension superficielle élevée ont tendance à rétrécir leur surface et par conséquent à atteindre une forme sphérique. Les points de contact entre la feuille et l'eau vont être réduits jusqu'à ce que l'eau glisse à la surface par la gravité. Dans son mouvement, l'eau va se charger alors des spores et des poussières, permettant d'éviter les attaques de pathogènes, de ne pas perturber le fonctionnement des stomates et d'éliminer toute interférence entre le spectre lumineux et le système photosynthétique.

L'efficacité de ce système varie suivant les espèces et le développement des organes, mais il a été corrélé avec l'abondance de cristaux de cires épicuticulaires en surface. Les structures cristallines et leur nature hydrophobe repoussent l'eau et permet la formation d'une poche d'air sous la goutte (Barthlott et Neinhuis, 1997).

Les découvertes liées à cet effet, comme les surfaces à haut pouvoir d'hydrophobicité et les textures microscopiques, sont désormais employées dans des matériaux appelés « biomimétiques » (Bhushan, 2012).

2.3.2.4 Barrières contre les pathogènes et les ravageurs

La cuticule représente une barrière physique aux pathogènes, qui généralement ne peuvent entrer dans la plante que par les stomates, les zones de blessures ou bien par des

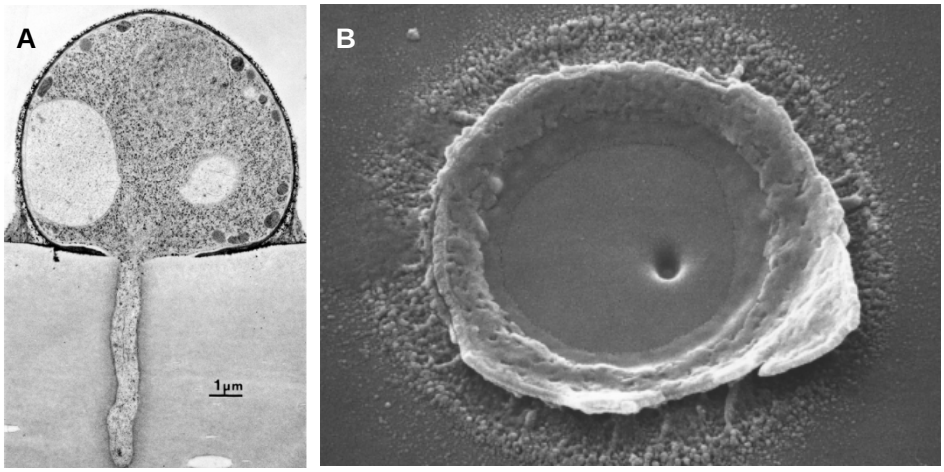


Figure 35 : Observation en microscopie électronique d'appressorium et d'adhésion appréssoriale de *Magnaporthe grisea*. A. Microphotographie d'un appressorium de *M. grisea* formé sur une membrane de cellophane, avec la pénétration du pied qui invagine le support. B. Microphotographie illustrant l'adhésion appréssoriale et la pénétration de *M. grisea* sur un support artificiel en Polytéréphtalate d'éthylène. L'appressorium de *M. grisea* a été découpé par sonication, laissant la base apprésoriale en place. On y distingue le pore de pénétration et le trou dans le support, provoqué par le pied de pénétration (d'après Deising *et al*., 2000).

vecteurs, tels les insectes qui peuvent percer *via* leur rostre la membrane cuticulaire. Cependant, certains pathogènes fongiques ont la faculté de créer une brèche dans la cuticule en utilisant de façon combinée une dégradation enzymatique et des ruptures mécaniques. Celles-ci sont souvent causées par la formation d'un appressorium, une structure en forme de pied qui va s'étendre et enfler dans les tissus via la pression de turgescence (Deising *et al.*, 2000) (figure 35). La rupture mécanique peut suffire pour pénétrer les cuticules les plus fines mais la plupart des pathogènes fongiques sécrètent des cutinases, une classe d'estérases non spécifiques qui peuvent hydrolyser le polyester de cutine et relâcher des monomères libres (Longhi et Cambillau, 1999). Ces monomères libres, qui deviennent alors des Damaged-Associated-Molecular-Patterns (DAMPs), peuvent jouer le rôle d'éliciteurs et ainsi provoquer une réponse de défense de la plante, comme la production de péroxyde d'hydrogène par exemple (Schweizer *et al*., 1996). Cependant, les mécanismes de perception de ces monomères libres par la plante demeurent encore inconnus (Boller et Felix, 2009).

Bien que la corrélation entre quantité de cutine et résistance aux pathogènes n'ait jamais été formellement démontrée, des mutants de cutine montrent des modifications nettes de leur résistance aux pathogènes, suggérant un rôle plus important de la cutine que les cires dans la formation d'une barrière à l'entrée des pathogènes. Chez la tomate, les mutants déficients en cutine *cd1*, *cd2* et *cd3* ont montré une susceptibilité accrue à l'infection à *Botrytis cinerea*, mais aussi aux microbes opportunistes (Isaacson *et al.*, 2009). De la même façon, il est intéressant de constater que les fruits du mutant déficient en cutine *Slcyp86a69* et du transformant RNAi *SlSHN3* montrent un niveau de sensibilité au champignon *Colletotrichum coccodes* accru en fonction de leur charge en cutine (Shi *et al*., 2013). A l'inverse, chez *Arabidopsis*, des mutants déficients en cutine et des plantes exprimant des cutinases fongiques ectopiques ont montré une résistance accrue à *B. cinerea* (Bessire *et al*., 2007 ; Chassot *et al.*, 2007 ; Tang *et al*., 2007 ; Bessire *et al.*, 2011). Dans ce cas de figure, il semblerait qu'une augmentation de la perméabilité cuticulaire entraîne une meilleure diffusion des éliciteurs induit par le pathogène, provoquant la production de composés antifongiques inhibiteurs de la croissance de *B. cinerea*. (Bessire *et al*., 2007).

Cependant, le mutant *lacs2* d'*A. thaliana* et les surexpresseurs de cutinase n'ont montré aucune altération de leur susceptibilité aux autres pathogènes (Bessire et al., 2007), et la mutation *lacs2* augmente même la susceptibilité à une souche normalement avirulente de *Pseudomonas syringae* (Tang et al., 2007). Ainsi, il est clair que la cutine joue un rôle majeur de barrière physique face aux pathogènes mais les mécanismes conduisant soit à une meilleure défense soit une susceptibilité accrue restent encore à approfondir.

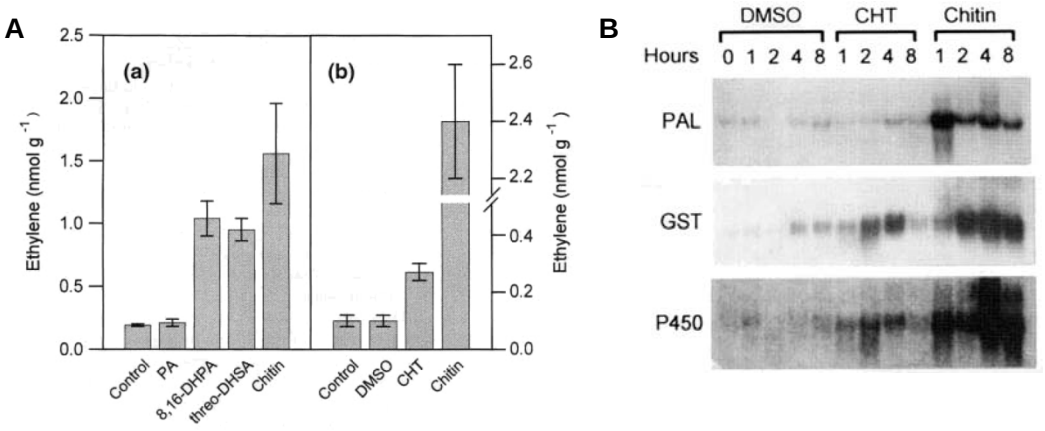


Figure 36 : Induction des mécanismes de défense de la plante par des monomères de cutine sur des cultures de cellules de pomme de terre. A. Stimulation de la production d'éthylène (hormone du stress) par des monomères de cutine et de la chitine. PA : acide palmitique; 8,16-DHPA : 8,16-dihydroxypalmitate ; threo-DHSA : threo-9,10-dihydroxystéarate ; CHT : hydrolysat de cutine de tomate; B. Accumulation d'ARNm liés aux mécanismes de défense. PAL : phenylalanine ammonia-lyase; GST : glutathione S-transférase ; P450 : homologue de cytochrome P450 (d'après Schweizer *et al*., 1996).

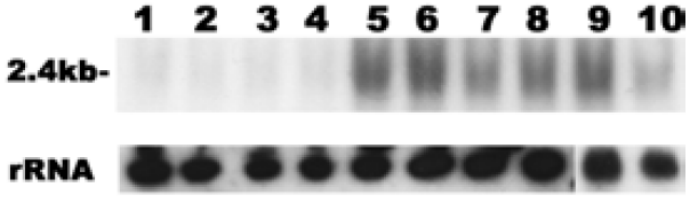


Figure 37 : Induction de la transcription du gène *LIPK* codant pour une protéine kinase de *Colletotrichum trifolii* par des lipides. ARN total de spores de C. trifolii traitées à l'eau (pistes 1 et 2); au 16-hydroxyhexadécanoate (pistes 3 et 4); à l'acide linoléique (pistes 5 et 6); à l'acide aleuritique (pistes 7 et 8) et au 8,16-dihydroxyhexadécanoate (pistes 9 et 10) (d'après Dickman *et al*., 2003)

Enfin, les cristaux de cires épicuticulaires jouent un rôle important dans les interactions plantes-insectes en formant une surface instable qui perturbe la fixation de l'insecte sur les tissus et son déplacement sur la surface des feuilles. Chez certaines plantes, il a été montré que les cristaux de cires se brisent sous les pattes des insectes, contaminant ainsi leur parties adhésives. L'insecte se retrouve alors dans l'impossibilité de progresser sur la surface de la plante (Borodich *et al.*, 2010). Cette stratégie a d'ailleurs été utilisée chez certaines plantes carnivores comme les sarracénies (*Nepenthes spp*.) pour piéger les insectes. La mise en place d'une surface interne glissante et couverte de cristaux de cires épicuticulaires empêchent les parties adhésives des insectes de fonctionner, les entraînant dans une urne contenant une solution enzymatique.

2.3.2.5. Production de molécules signales

De nombreuses études menées sur la relation entre la cuticule et les pathogènes a mis en évidence un niveau de complexité supplémentaire, suggérant que la cuticule n'est pas qu'une simple barrière physique entre la plante et son agresseur. En effet, si l'invasion d'un pathogène peut émettre des signaux induisant les mécanismes de défense de la plante (Schweizer *et al*., 1996) (figure 36), l'inverse est également possible puisque la cutine peut induire l'expression d'un ou plusieurs gènes chez les pathogènes de plantes. Ainsi, il a été montré que la cutine peut induire chez *Colletotrichum trifolii* l'expression d'une protéine kinase impliquée dans le développement de l'appressorium (Dickman *et al.*, 2003) (figure 37).

De plus, les cires pourraient agir comme un signal induisant la germination des spores ou la croissance des hyphes (Kolattukudy *et al.*, 1995). Il a été montré que la présence d'aldéhyde en C_{26} (*n*-hexacosanyl) dans les cires cuticulaires d'espèces de Poaceae pouvait induire *in vitro* la formation d'appressorium chez *Blumeria graminis* (Tsuba *et al.*, 2002 ; Hansjakob *et al*., 2010). Ces observations ont été corroborées par des études menées chez le mutant de maïs *glossy1* qui n'accumule pas d'aldéhyde au niveau des cires. La formation d'appressorium de *B. graminis* à la surface des feuilles de *glossy1* est considérablement réduite, mais peut être restaurée par l'application de *n*-hexacosanyl (Hansjakob *et al*., 2011). Un autre exemple d'interactions entre cires et pathogènes est l'absence de différenciation des spores de certaines rouilles fongiques sur les feuilles du mutant *irg1* (*inhibitor of rust tube germination 1*) de *Medicago truncatula*, due à la faible quantité d'alcools primaires présente dans les cires (Uppalapati *et al*., 2012).

Les connaissances sur les relations entre molécules et pathogènes, le rôle spécifiques de certaines classes de composés ou même les interactions avec l'architecture de la cuticule restent actuellement encore fragmentaires. La compréhension de ces

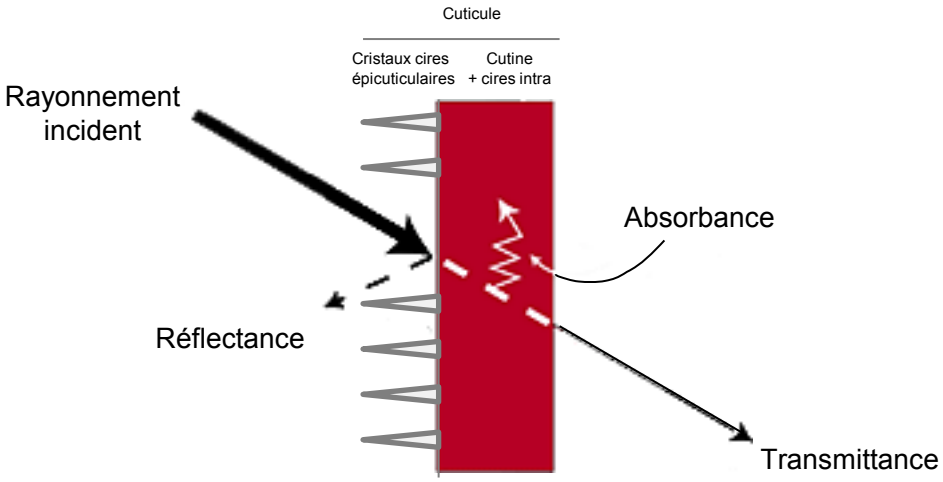


Figure 38 : Représentation simplifiée de la décomposition du rayonnement lumineux à travers la cuticule. Le rayonnement incident est en partie réfléchi par la surface (propriété de réflectance, régulée par la quantité de cristaux épicuticulaires) et en partie absorbé par le tissu (propriété d'absorbance), ce qui s'accompagne souvent d'un dégagement de chaleur. Le reste du rayonnement traverse le tissu (propriété de transmittance).

mécanismes permettra d'appréhender plus finement les structures de la cuticule et de préciser le mode d'action des pathogènes fongiques.

2.3.2.6 Propriétés optiques et protection contre les UV

Les plantes sont dépendantes du rayonnement lumineux pour assurer le fonctionnement de leur appareil photosynthétique mais doivent aussi se protéger des radiations ultraviolettes, notamment les UV-B. Cette portion de la lumière aux longueurs d'ondes très courtes peut en effet menacer la vie terrestre en endommageant l'ADN mais aussi l'appareil photosynthétique et les membranes lipidiques (Rozema *et al*., 1997). Les plantes ont donc mis en place des stratégies pour pouvoir filtrer les radiations UV-B sans pour autant trop compromettre leur efficacité photosynthétique. Pour cela, les cellules épidermiques synthétisent et stockent des pigments solubles, les flavonoïdes, dans leur vacuole. Des composés phénoliques sont également insérés dans les parois cellulaires polysaccharidiques et certaines molécules phénoliques lipophiles sont couplées de façon covalente à la cutine ou associées aux cires (Pfündel *et al*., 2006). De plus, si on considère les propriétés optiques du rayonnement lumineux et de la cuticule (figure 38), il a été montré sur des cuticules isolées de plusieurs espèces végétales que le spectre UV-B est filtré de façon performante et que le niveau de transmittance aux longueurs d'ondes plus élevées, efficaces pour la photosynthèse, reste assez élevé (Krauss *et al*., 1997).

Le niveau de réflectance et par conséquent de transmittance, serait régulé par la quantité de cristaux de cires épicuticulaires. Une étude montre que *Dudleya brittonnii* reflète jusqu'à 83% des UV-B grâce à ses cires mais cette valeur chute de façon drastique une fois les cires enlevées (Mulroy *et al*., 1979). Ce lien entre structure des cires épicuticulaires et propriétés optiques se retrouve aussi en comparant la réflectance entre des cuticules lisses, qui s'avère faible (>10%) et des cuticules pruineuses (aspect de surface cendré du à des poussières cireuses, trouvé notamment chez la prune et le raisin), dont la réflectance est modérée, aux environs de 20 à 30% (Pfündel *et al*., 2006). Ainsi, la mise en place de cuticule avec peu de cristaux de cires épicuticulaires ne semble pas adaptée à une bonne filtration des UV-B mais confère des propriétés optiques spécifiques, notamment une modification des niveaux de brillance. La brillance peut être un atout pour les fruits par exemple, favorisant leur repérage par les animaux, qui vont contribuer à la dissémination des graines.

2.3.2.7 Propriétés biomécaniques du fruit

Les assises extracellulaires végétales révèlent une structure complexe dont le niveau d'imbrication entre composants pariétaux et cuticulaires est encore mal connu. La cuticule étant intimement liée à la paroi cellulaire épidermique, il n'est pas rare que ces assises

extracellulaires soient considérées comme un tout, résumée sous le terme de paroi cutinisée (Dominguez *et al*., 2011). La composition complexe et les différents niveaux d'organisation entre les molécules vont conférer aux assises extracellulaires des propriétés mécaniques très particulières. Elles sont fondamentales chez les fruits charnus car elles ont des répercussions directes sur la qualité des fruits. Les propriétés biomécaniques de la cuticule vont en effet influencer la résistance aux manipulations et au stockage des fruits. De plus, il est suggéré que la paroi cutinisée joue un rôle majeur dans la sensibilité au « cracking » (Dominguez *et al*., 2012). Ce phénomène d'éclatement du fruit, du à une augmentation de la pression hydrique et à un relâchement des parois du péricarpe lors de la maturation, se traduit par un déchirement de l'épiderme, celui-ci n'arrivant pas à contenir la pression interne. Ces fractures, susceptibles d'entrainer une dessiccation des fruits et une entrée de pathogènes, peuvent être comblées par un phénomène de cicatrisation des lésions superficielles. Cette cicatrisation s'effectue par une subérisation des tissus lésés, un mécanisme fondamental de la réparation des blessures chez les plantes (Dean et Kolattukudy, 1976). Cependant, ces zones subérisées rendent le fruit moins attractif sur le marché de frais. Ainsi, le fruit de tomate apparaît comme un modèle de choix pour les analyses mécaniques de par ses dimensions, la quantité et l'accessibilité de sa cuticule ainsi que l'évolution de ses propriétés physiques au cours du murissement.

Les analyses biomécaniques de la cuticule mesurent les stress causés par des forces externes, engendrant des déformations et donc des contraintes sur les tissus (Lopez-Casado *et al*., 2007). La cuticule protège la plante en diminuant l'impact des stress externes sur les organes des plantes et en évitant la rupture des tissus (Dominguez *et al*., 2011). La cuticule serait également un régulateur de la croissance des organes en imposant un résistance mécanique à l'expansion des tissus internes (Bargel et Neinhuis, 2005 ; Savaldi-Goldstein *et al*., 2007). Il a été montré qu'il existe une corrélation entre l'épaisseur de la membrane cuticulaire, les propriétés mécaniques et la résistance du fruit à la craquelure (Matas *et al*., 2004). D'un point de vue strictement mécanique, l'observation du comportement rhéologique de la cuticule suggère que la cutine jouerait le rôle d'une matrice viscoélastique, contenant des composants fibrillaires, probablement pariétaux, capables de remaniements passifs, sous l'effet d'une force de tension (Lopez-Casado *et al.*, 2007). Les cires et les flavonoïdes présents en faible concentration, imprègnent l'intérieur de la matrice de cutine et moduleraient la fermeté et les autres paramètres mécaniques (Petracek et Bukovac, 1995 ; Domınguez *et al*., 2009b).

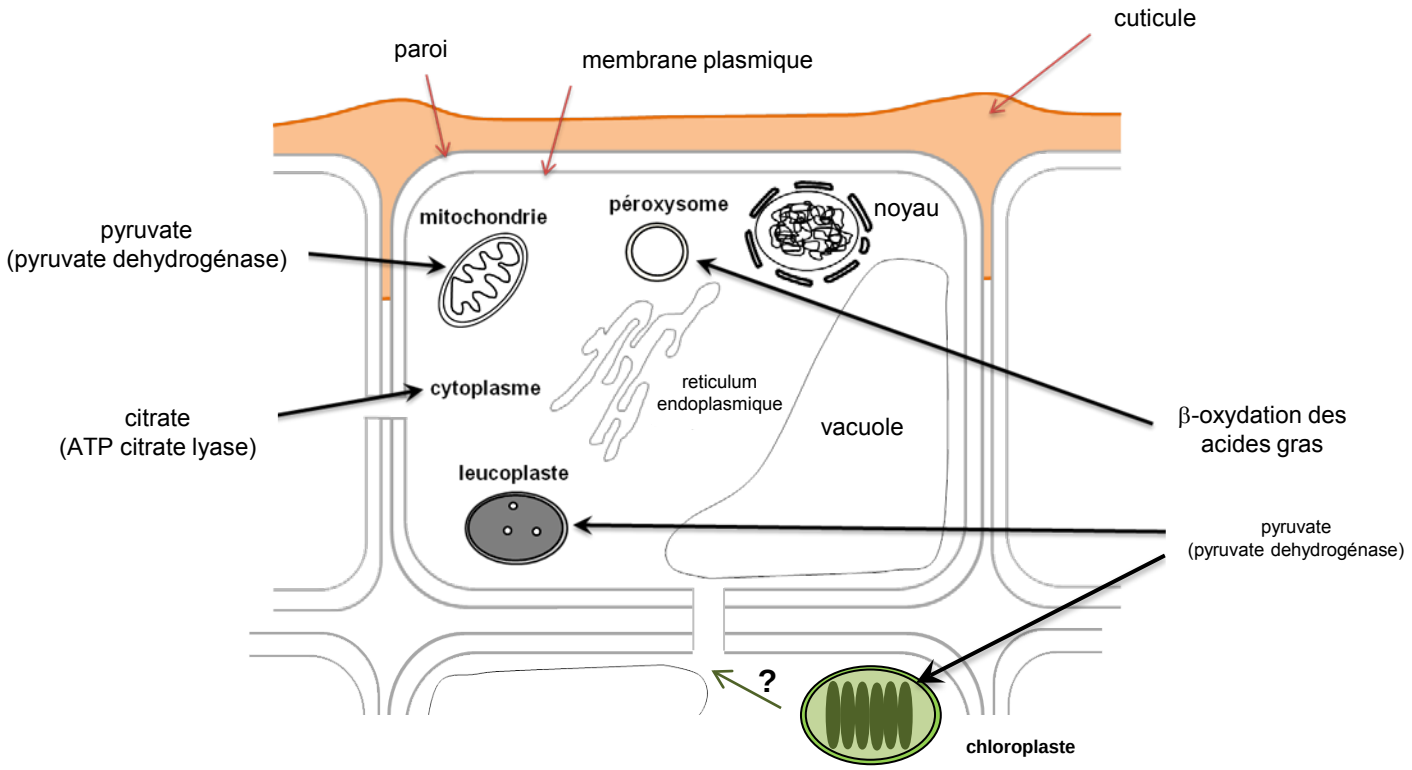


Figure 39 : Représentation schématique d'une cellule et des différentes zones de production d'acétyl-coA, à partir du pyruvate (mitochondrie, leucoplastes des cellules épidermiques, chloroplastes des assises sous épidermiques), du citrate (cytoplasme) ou de l'oxydation des acides gras (péroxysome).

2.4 Biosynthèse de la cuticule

Les voies de biosynthèses des composés cuticulaires sont étudiées depuis plus de 80 ans. Les avancées des connaissances se sont faites au fur et à mesure des progrès des techniques analytiques et des approches scientifiques. Les premières identifications de composants cireux datent de la fin des années 1920, avec la caractérisation d'alcanes chez l'épinard et le chou. Ce n'est qu'à la fin des années 60 que des études biochimiques systématiques ont été menées par le Pr. Pappachan E. Kolattukudy de l'Université de Colombus (USA), qui ont permis de jeter les bases actuelles de la structure et de la composition de la cuticule. Dans les années 80, sous l'impulsion de Chris Somerville, la communauté scientifique adopte *Arabidopsis thaliana* en tant que plante modèle et très rapidement se développent de nombreuses ressources génétiques telles que des mutants EMS. Parmi ces mutants d'*Arabidopsis*, les mutants *eceriferum* (*cer*) vont permettre des avancées majeures dans la connaissance des voies de biosynthèse de la cuticule (Koornneef *et al*., 1989). Depuis, d'autres modèles tels le maïs, la tomate et le riz sont utilisés pour décrypter les mécanismes et identifier les gènes impliqués dans la synthèse des cires et de la cutine, mais aussi le transport des composés jusqu'à la matrice extracellulaire et la régulation complexe des composés cuticulaires.

2.4.1 Acétyl-CoA

L'acétyl-CoA joue un rôle central dans le métabolisme puisque c'est un des intermédiaires les plus utilisés dans la cellule, faisant le lien entre de nombreuses voies de biosynthèse, notamment celle de la cuticule. Les principales voies de production d'acétyl-CoA impliquent la glycolyse et la β-oxydation des acides gras (figure 39). Les actéyl-CoA sont le matériel de départ pour la biosynthèse de certains acides aminés, des flavonoïdes *via* la chalcone synthase, les stérols, de beaucoup de dérivés d'isoprénoïdes et des acides gras, précurseurs des lipides cuticulaires. Malgré ce rôle central dans le métabolisme, il n'a jamais été montré que l'acétyl-CoA puisse traverser les membranes, ce qui suggère qu'il soit produit dans le compartiment où il sera utilisé. L'acétyl-CoA est le précurseur de la fabrication des acides gras. Sa synthèse s'effectue à partir des produits de la glycolyse et du cycle de Krebs tels que le malate, le pyruvate (action de la pyruvate deshydrogénase) et l'acétate (action de l'acétyl-CoA-synthase).

2.4.2 Synthèse des acides gras

2.4.2.1 Localisation

Il est admis que la synthèse *de novo* des acides gras s'effectue dans les plastes, et très majoritairement dans les chloroplastes (Browse et Sumerville, 1991). Les tissus

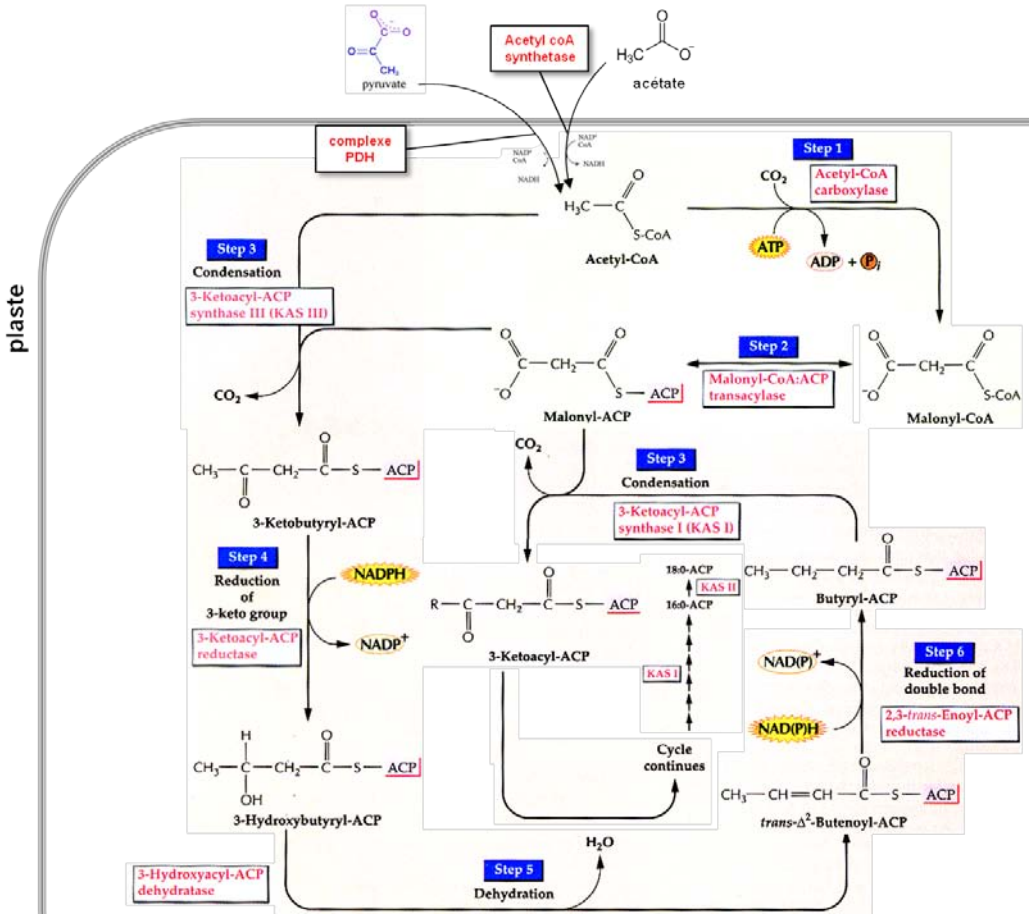


Figure 40 : Vue d'ensemble de la synthèse des acides gras dans les plastes (d'après Buchanan, Gruissem, Jones, 1st edition, chapter 10.2)

épidermiques ne sont pas photosynthétiques et ne possèdent pas de chloroplastes afin de ne pas perturber le rayonnement lumineux destiné aux cellules sous épidermiques. Les plastes présents dans les cellules épidermiques sont plutôt du type proplaste ou leucoplaste, ces derniers étant souvent associés au stockage d'amidon (amyloplaste), de lipides (oléoplaste) ou de protéines (protéoplaste). Cependant, dans certains types cellulaires, les leucoplastes sont impliqués dans de nombreuses réactions biochimiques telles que les synthèses d'acides gras ou d'acides aminés. Cependant, un paradoxe existe entre le faible nombre de plastes présent dans les cellules épidermiques et la quantité nécessaire à l'élaboration d'un réseau lipidique complexe tel que la cuticule. Aucun système d'importation des acides gras synthétisés des cellules photosynthétiques vers les cellules épidermiques n'a jusqu'à présent été montré.

2.4.2.2 Cycle de synthèse itératif

La synthèse des acides gras est un cycle itératif qui permet à partir d'un acétyl-CoA de former des acides gras, augmentés de 2 unités carbone à la fin de chaque cycle (Ohlrogge et Jaworski, 1997).

La première étape du cycle de synthèse des acides gras (Fatty Acid Synthase : FAS) consiste à ajouter 1 atome de carbone à un acétyl-CoA pour former un malonyl-CoA, par l'action d'une acétyl-CoA carboxylase (figure 40). Une malonyl-CoA :ACP transacylase va ensuite substituer le coenzyme A par un groupement acyl-Acyl-Carrier-Protein (ACP), pour former un malonyl-ACP. Ce malonyl-ACP et une nouvelle molécule d'acétyl-CoA vont être alors condensés par une 3-kétoacyl-ACP synthase III (KAS III), pour donner un 3-kétobutyryl-ACP. L'intervention de l'enzyme de condensation KAS III est spécifique du premier tour du cycle. Le groupe 3-kéto est réduit par action d'une 3-kétoacyl-ACP réductase, formant un 3-hydroxybutyryl-ACP. Une déshydratase élimine une molécule d'eau pour donner un *trans*-Δ^2-buténoyl-ACP et la double liaison est réduite par une 2,3-*trans*-enoyl-ACP-réductase. Le butyryl-ACP est alors condensé à une nouvelle molécule de malonyl-ACP par l'enzyme KAS I, donnant un 3-kétoacyl-ACP. A la fin du premier cycle, la molécule est allongée de 2 carbones. Les cycles vont être répétés 7 fois jusqu'à obtenir un acide gras insaturé à 16 atomes de carbone, lié à un acyl-ACP, avec une condensation assurée par l'enzyme KAS I. L'addition de 2 autres molécules de carbone pour obtenir un C18 :0-ACP est assurée par l'enzyme KAS II, les isoformes de 3-kétoacyl-ACP-synthase ayant des spécificités de substrat différentes.

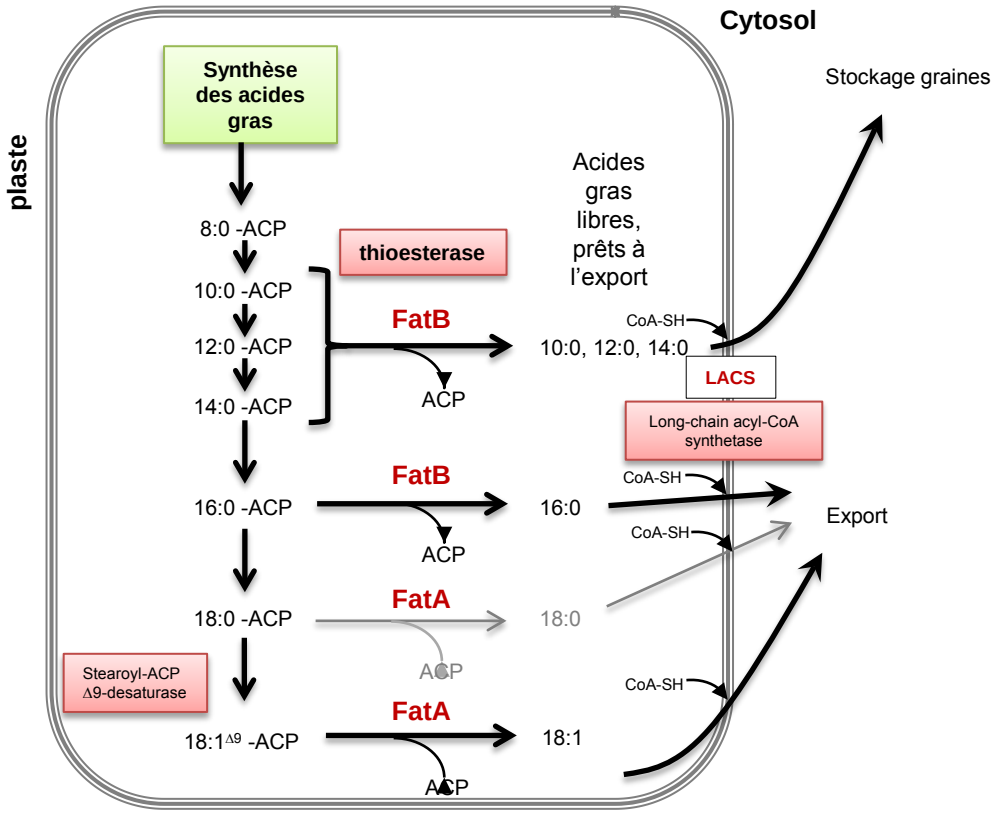


Figure 41 : Rôle des thioestérases et devenir des acides gras libres. L'enzyme LACS située dans la membrane interne du chloroplaste active les acides gras.

2.4.2.2 Fin du cycle

Suivant leur utilisation, les acides gras peuvent sortir du cycle avant d'atteindre une élongation finale à 16 ou 18 atomes de carbone. La réaction principale d'arrêt de l'allongement de l'acide gras est l'hydrolyse de la partie acyl par une thioestérase, conduisant au relargage d'un sulfhydryl-ACP (figure 41). Les thioéstérases majoritaires, FatA et FatB, montrent des spécificités de substrat, tous comme les 3-kétoacyl-ACP-synthase (Dormann *et al.*, 1995 ; Bonaventure *et al*., 2003). En effet, Fat B est active avec des acides gras saturés uniquement, et à chaînes aliphatiques inférieures ou égales à 16 atomes de carbone alors que FatA hydroylyse les chaînes à 18 atomes de carbone, saturées ou insaturées. Le clivage de la partie acyl-ACP empêche donc l'extension de la chaîne mais entraîne aussi l'export de la chaîne acyl hors du plaste. Les acides gras à 10, 12 ou 14 atomes de carbone sont en général retrouvés dans les triacylglycérols de certaines graines (noix de coco, laurier de Californie…etc.).

L'étape finale de la synthèse des acides gras dans les plastes est la désaturation d'une grande partie de l'acide stéarique produit (C18 :0) en acide oléique (C18 :$1^{\Delta 9}$) par la Stearoyl-ACP Δ9-désaturase. Cette conversion en acide gras insaturé est primordiale pour le bon fonctionnement des membranes. Si celles-ci ne contenaient que des chaînes saturées, il y aurait formation d'un gel semi cristallin perturbant la mobilité membranaire. La quantité de chaînes insaturées doit être régulée car une quantité excessive de C18 :$1^{\Delta 9}$ entrainerait l'effet inverse avec un point de fusion trop bas.

2.4.2.3 Export

L'export des acides gras des plastes vers le réticulum endoplasmique, appelée voie eucaryotique, reste peu documenté, notamment la conversion par une activité Long-chain acyl-CoA synthetase (LACS) des acides gras libres en acyl gras-CoA activés, en présence d'ATP (figure 41). Cette activation est nécessaire au transport des acides gras entre les compartiments cellulaires. Les activités LACS ont été localisées dans de nombreux compartiments subcellulaires, comme l'enveloppe externe des chloroplastes, des corps lipidiques et le Réticulum Endoplasmique (RE) (Andrews et Keegstra, 1983 ; Schnurr *et al*.,2002). Cependant, jusqu'à présent il n'a pas été démontré formellement où et quand l'activation des acides gras avait lieu (Pollard *et al*., 2008). Il semble que les enzymes LACS de l'enveloppe externe du chloroplaste soient des candidats désignés (Schnurr *et al*., 2004) mais il a été montré que certaines enzymes du RE, notamment des acides gras oxydases de type CYP86A fonctionnaient sur des acides gras libres. La question qui reste en suspend est donc de savoir si ces acides gras libres sont passés du chloroplaste vers le RE en l'état, ou

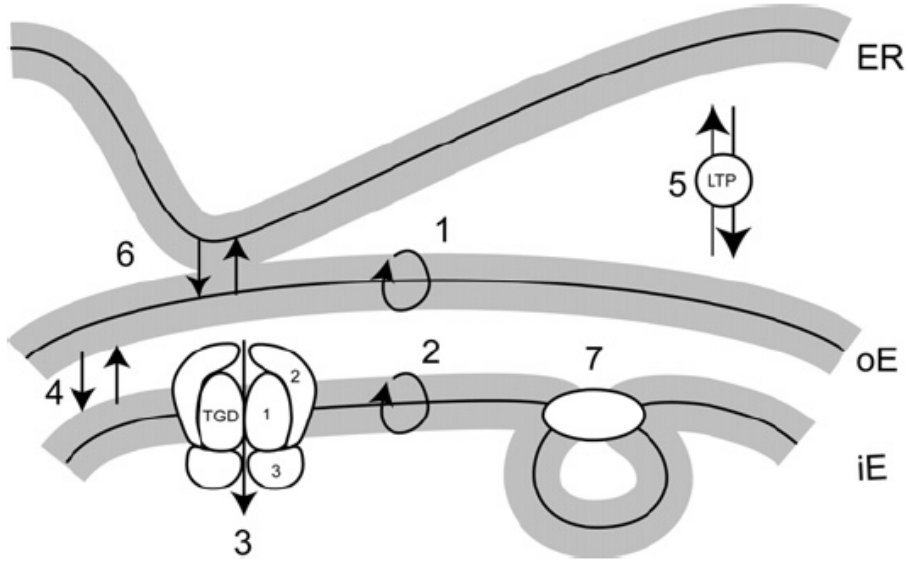


Figure 42 : Modes de transport hypothétiques des lipides entre membranes plastidiales et Réticulum Endoplasmique (ER) dans les plantes. L'ER, les enveloppes membranaires externes (oE) et internes (iE) sont indiquées. Les deux feuillets de la bicouche lipidique sont dessinés. 1. Basculement des lipides polaires à travers l'enveloppe membranaire interne ; 2. Basculement des lipides polaires à travers l'enveloppe membranaire externe ; 3. Mouvement transmembranaire des lipides polaires à travers le complexe TGD123; 4. Transfert des lipides entre les 2 enveloppes membranaires; 5. transfert des lipides *via* une Lipid Transfert Protein (LTP); 6. transfert des lipides entre la membrane externe du plaste et le RE par des zones de contact (PLAMs) ; 7. Formation de vésicules au niveau de l'enveloppe membranaire interne (d'après Benning, 2008).

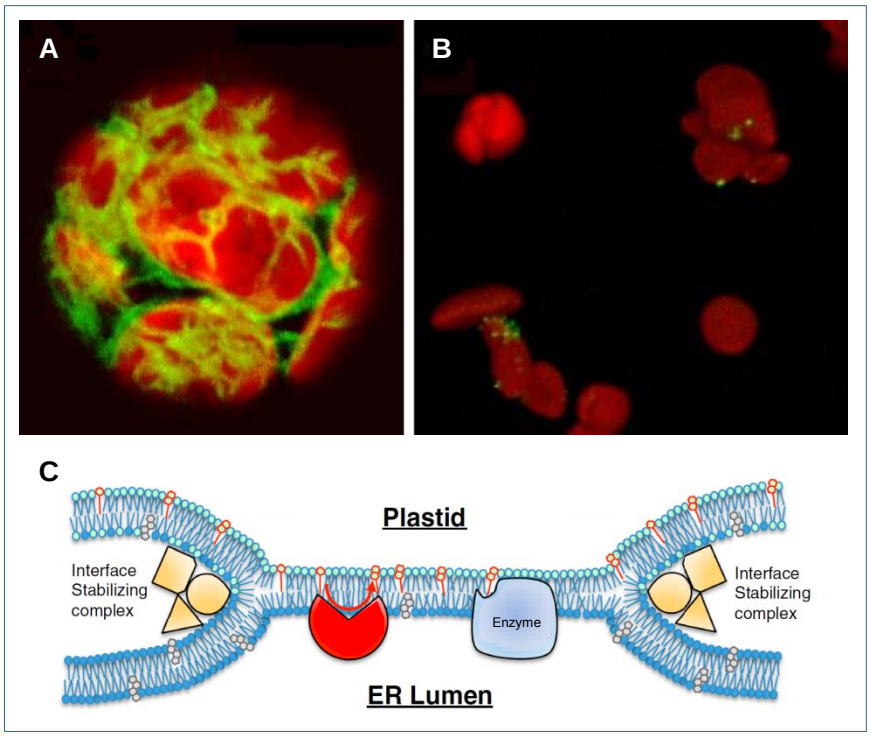


Figure 43 : Zones de contact entre chloroplaste et Réticulum Endoplasmique (RE). A. Observation en microscopie confocale de la relation entre chloroplastes et RE dans un protoplaste d'*A. thaliana.* La Green Fluorescent protein (GFP) est contenue dans le lumen du RE, qui apparait vert, les chloroplastes autofluorescent en rouge. La dimension de l'image est 20 x 20 µm. B. Chloroplastes isolés des protoplastes. Image 40 x 40 µm (d'après Andersson *et al*., 2007a); C. Modèle théorique d'hémifusion entre les membranes du RE et des chloroplastes (d'après Mehrshahi *et al*., 2013).

bien si le cofacteur A a été enlevé dans le RE après l'export. La présence d'enzymes LACS dans le RE montre qu'il y a une nécessité d'activer des acides gras libres dans ce compartiment.

L'autre zone d'ombre réside dans le transport proprement dit des acides gras, d'une part de la membrane interne vers la membrane externe du plaste, puis du plaste vers le RE. Le système de transport inter organelle n'a jusqu'à présent pas été décrypté alors que les échanges bidirectionnels entre RE et plastes sont légions, notamment les échanges de diacylglycérol entre le RE et le chloroplaste (Roughan et al.,1980; Roughan et Slack, 1982). Des analyses protéomiques et bioinformatiques portant sur l'enveloppe du chloroplaste ont montré la quasi absence de candidats impliqués dans le transport de métabolites non polaires tels que les lipides (Mehrshahi et al., 2013), en dépit des quantités importantes produites et échangées. Différents modes de transport peuvent être mis en place pour assurer le flux de lipides entres enveloppes du plaste tels que le retournement des lipides polaires dans les membranes, les mouvements transmembranaires des lipides polaires via des complexes, la formation de vésicules de transport ou bien des transferts simples entre les deux enveloppes membranaires (figure 42). Le transfert des lipides du plaste jusqu'au RE pourrait s'effectuer par l'intermédiaire de lipid tranfert protein (LTP) ou bien par la mise en place de zones de contacts physiques entre les membranes du RE et des plastes, par l'intermédiaire de plastid-ER associated membranes ou PLAM (Benning, 2008) (figure 42).

Suite à la mise en évidence des PLAM, il a été démontré l'existence d'une association physique entre les membranes du plaste et du RE au niveau de la zone de contact (figure 43A, B), appelée membrane contact sites (MCS) (Andersson *et al*., 2007). Depuis, l'existence d'une continuité entre les membranes des plastes et du RE est discutée puisqu'*in vitro* une enzyme membranaire du RE semble pouvoir accéder aux métabolites chloroplastiques par un phénomène d'hémifusion (figure 43C) au niveau d'un MCS (Mehrshahi *et al*., 2013).

Une fois les acides gras majoritairement en C_{16} et C_{18} exportés dans le RE, ceux-ci vont subir un grand nombre de modifications qui seront différentes entre les futurs constituants des cires ou de la cutine.

2.4.3 Synthèse des cires cuticulaires

Les plantes ont de nombreux besoins en acides gras, notamment pour synthétiser les composés cireux, dont les longueurs de chaînes peuvent varier de 16 à 32 atomes de carbone. Les précurseurs en C_{16} et C_{18} vont donc devoir subir une série d'élongation afin de devenir des Very Long Chain Fatty Acid (VLCFA).

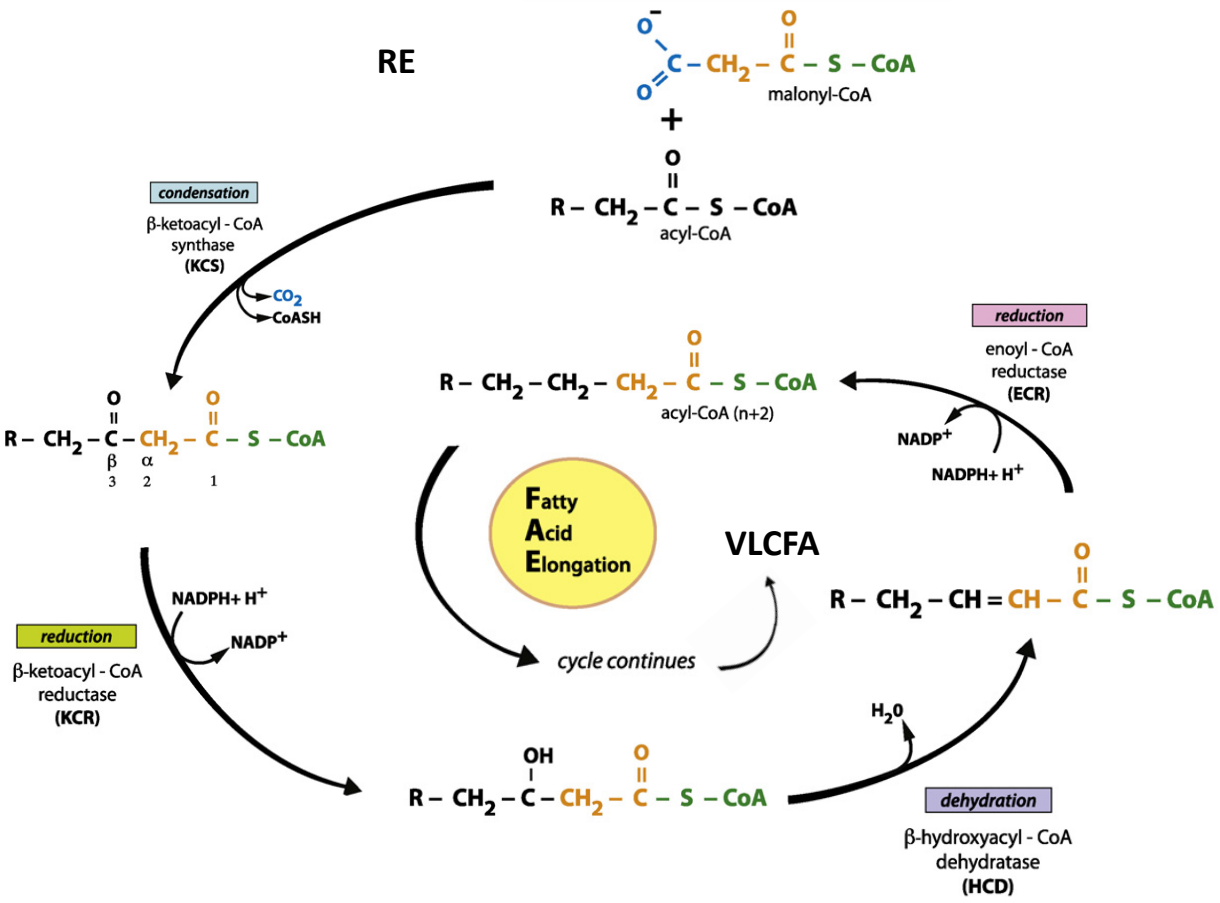


Figure 44 : Le complexe Fatty Acid Elongase (FAE) synthétise les Very Long Chain fatty Acid (VLCFA), de plus de 20 atomes de carbone, par des cycles répétés d'addition de 2 carbones. A chaque tour du cycle, les 4 enzymes du complexe FAE travaillent séquentiellement pour réaliser la condensation de 2 carbones à partir du malonyl-CoA à la chaîne d'acyl-CoA en cours d'élongation, suivie d'une réduction, d'une déshydratation et d'une seconde réaction de réduction, donnant naissance à un acyl-CoA saturé (d'après Kunst et Samuels, 2009).

2.4.3.1 Complexe d'élongation

Ces VLCFA précurseurs des cires cuticulaires sont synthétisés dans le RE des cellules épidermiques, par un complexe multi enzymatique appelé Fatty Acid Elongase (FAE). De nombreux travaux sur *Arabidopsis* ont permis d'isoler des mutants atteints au niveau des enzymes du complexe d'élongation des acides gras et ainsi de comprendre son fonctionnement. Les mutants *cut1* et *cer6* ont révélé que la protéine ECERIFERUM6 était une β-ketoacyl-CoA-synthase (KCS) (Millar *et al*., 1999 ; Fiebig *et al*., 2000), le mutant *cer10* a permis de mettre en évidence le gène *ECR* (Zheng et al., 2005), codant pour une enoyl-CoA-réductase, le mutant *pas2* a identifié le gène *PASTICCINO2* codant pour une β-hydroxyacyl-CoA-deshydratase (HCD) (Bach *et al*., 2008) et les mutant *kcr1* et *kcr2* ont permis d'isoler une réductase, la β-ketoacyl-CoA-réductase (KCR) (Beaudoin *et al*., 2009).

Les substrats utilisés dans la réaction d'élongation sont d'une part les acides gras saturés en C_{16} et C_{18} générés dans les plastes, et d'autre part le malonyl-CoA comme donneur de carbone. Le malonyl-CoA extraplastidial alimentant la synthèse des VLCFA est généré par une enzyme multifonctionnelle, l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase). Le complexe FAE va réaliser un cycle itératif proche de celui trouvé dans les plastes permettant de former les acides gras (Kunst et Samuels, 2009). L'acyl-CoA va être condensé à un malonyl-CoA par l'enzyme KCS pour former un β-ketoacyl-CoA, libérant ainsi un CO_2 (figure 44). Les étapes suivantes consistent à réduire une des 2 doubles liaisons de l'acyl-CoA par l'enzyme KCR pour former un β-hydroxyacyl-CoA, d'éliminer une molécule d'eau *via* HCD, ce qui entraîne l'apparition d'une nouvelle insaturation en milieu de la chaîne de l'enoyl-CoA, d'où la nécessité d'une nouvelle réduction, par l'intermédiaire de l'enzyme ECR. Ce cycle aboutit à la formation d'un acyl-CoA allongé de 2 carbones, qui repart dans le cycle en étant condensé à un nouveau malonyl-CoA. Les cycles d'élongation peuvent être terminés par une thioestérase pour former des VLCFA libres ou bien les esters de VLCFA-CoA seront disponibles pour subir des modifications dans le RE.

Il s'avère que l'enzyme KCS est la protéine limitante du complexe FAE car elle détermine la longueur finale de l'acyl-CoA produit (Millar et Kunst, 1997 ; Denic et Weissman, 2007). Cette enzyme est donc à l'origine de la variabilité des longueurs de chaînes des VLCFA et de leur distribution, ce qui explique pourquoi près de 21 KCS différentes ont été annotées chez *A. thaliana* (Joubès *et al*., 2008). Les KCR, HCD et ECR semblent par contre des enzymes plus ubiquitaires.

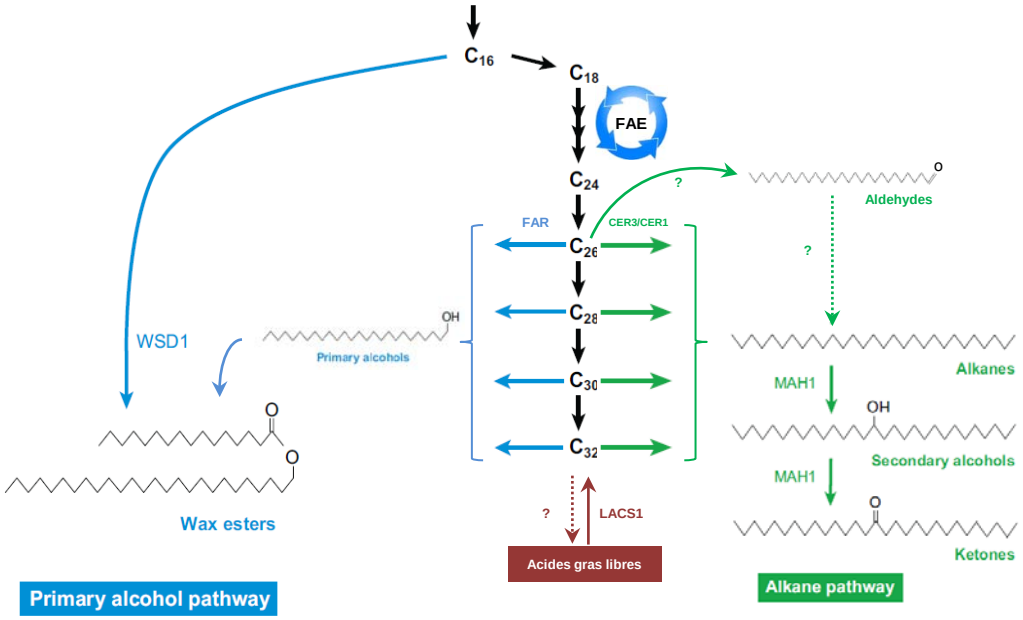


Figure 45 : Voie de synthèse simplifiée des composés cireux chez *Arabidopsis thaliana*, avec la voie des alcools primaires et la voies des alcanes. Une troisième voie permettrait de synthétiser un pool d'acides gras libres dans le RE, susceptibles d'être activés par une acyl-CoA synthase. FAR : fatty acid reductase; CER : ECERIFERUM; WSD : wax synthase/diacylglycérol acyltransférase; MAH : mid-chain alcane hydroxylase; LACS1 : Long Chain Acyl-CoA synthase 1 (adapté de Samuels *et al*., 2008).

2.4.3.2 Modifications des chaînes aliphatiques

Les chaînes aliphatiques vont ensuite subir une série de modifications, toujours au sein du RE, que l'on peut diviser en 2 branches distinctes : la voie des alcools primaires et la voie des alcanes (figure 45).

La voie des alcools primaires consistent en une prise en charge par une alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase (FAR) des acides gras en cours d'élongation, formant des alcools primaires à très longues chaînes. Biochimiquement, la formation d'un alcool primaire passe par un intermédiaire aldéhyde, mais les analyses biochimiques menées sur des graines de jojoba (Metz *et al*., 2000) ou des feuilles de pois (Vioque *et al*., 1997) ont montré que les VLCFA pouvaient être modifiés par une seule enzyme, avec l'aldéhyde restant lié à l'enzyme lors de la synthèse. Chez *Arabidopsis*, il a été démontré dans un système hétérologue que CER4 était capable de réaliser cette activité sur des acides gras de 24 à 26 atomes de carbone, mais pas sur des chaînes plus longues (Rowland *et al*., 2006) . De plus, le mutant *cer4* ne produit plus d'alcools primaires de 24 à 28 atomes de carbone. Il semble donc que plusieurs FAR différentes soient impliquées dans cette synthèse d'alcools primaires (Rowland et Domergue, 2012). Les alcools primaires formés par CER4 peuvent être le substrat d'enzymes synthétases de cires (wax synthases, WS) pour former des esters d'alcools (Shepherd et Griffiths, 2006 ; Samuels *et al*., 2008). La chaîne aliphatique majoritaire de ces esters de cires compte cependant 16 atomes de carbone, ce qui suggère que les acyl C_{16}-CoA sont le substrat prédominant des WS. Le gène WSD1 a été identifié chez *Arabidopsis* comme étant la synthase de cires majeure (Li *et al*., 2008).

La deuxième voie de modification des chaînes aliphatiques destinées aux cires est la voie des alcanes, *via* un intermédiaire aldéhyde potentiel. La synthèse d'alcane est réalisée à partir d'acides gras à très longues chaînes activés (VLC-acyl-CoA) par une enzyme LACS. Récemment, il a été proposé que ces VLC-acyl-CoA soient pris en charge par un hétérodimère CER3 / CER1, formant un complexe enzymatique catalysant la conversion en VLC-alcanes (Bernard *et al*., 2012). Dans ce modèle, CER3 permettrait la réduction de l'acyl-CoA en aldéhyde, pris aussitôt en charge par CER1. La réaction de décarbonylation nécessiterait un apport d'électron, fourni par l'interaction entre CER1 et le cytochrome B5. Chez *Arabidopsis*, au niveau des feuilles, les alcanes sont les produits finaux de la voie. Dans les tiges par contre, les alcanes peuvent être modifiés en alcools secondaires et cétones, par une série d'oxydations consécutives. L'analyse des gènes surexprimés dans l'épiderme d'*Arabidopsis* a permis d'isoler des candidats potentiellement impliqués dans l'oxydation des lipides, notamment une cytochrome P450, CYP96A15 (Greer *et al*., 2007).

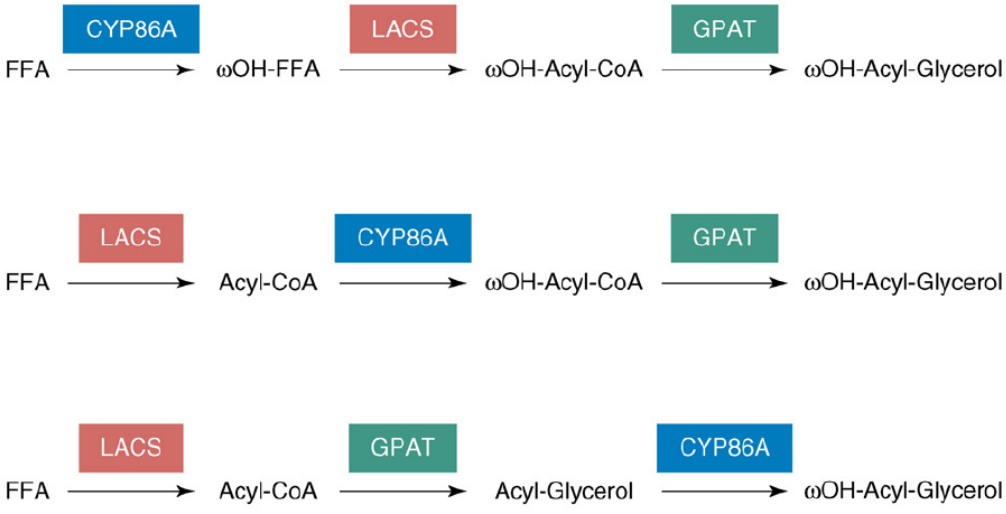


Figure 46 : Réactions simplifiées possibles catalysées par les enzymes LACS, GPZAT et CYP86A dans la voie de biosynthèse des polyesters de lipides. FFA : acides gras libres; CYP86A : cytochrome P450 oxydase ; LACS : Long Chain acyl-CoA Synthase; GPAT : Glycérol 3-phosphate acyltransférase (d'après Pollard *et al*., 2008)

L'étude du mutant *cyp96a15* a montré au niveau des cires une disparition des alcools secondaires et des cétones, avec pour corollaire une accumulation d'alcanes. La protéine CYP96A15 assure donc la fonction de mid-chain alkane hydroxylase (MAH1) chez *A. thaliana*.

Enfin, il semblerait que les acides gras activés sortant du complexe d'élongation puissent être pris en charge par une thioestérase encore non identifiée, qui va ainsi former un pool d'acides gras libres. Ce réservoir de VLCFA libres peut être converti par l'enzyme LACS1 (Lu *et al*., 2009) en VLCFA-CoA pour la synthèse d'aldéhydes et d'alcanes.

2.4.4 Synthèse des monomères de cutine

La biosynthèse de la cutine est moins documentée que celle des cires et de nombreuses inconnues demeurent quant à sa structure polymérique. Comme les cires, la cutine est synthétisée par les cellules épidermiques des organes aériens. Les précurseurs utilisés sont le palmitoyl-CoA (C_{16}) et l'oleoyl-CoA (C_{18}), qui seront modifiés dans le réticulum endoplasmique pour permettre la formation de différents monomères de cutine, mais à la différence des cires, il n'y a pas d'élongation des acides gras. Ces monomères seront ensuite assemblés, exportés et estérifiés entre eux pour former une matrice extracellulaire, qui servira de squelette à la cuticule.

La composition de la cutine est très variable entre espèces, tissus et stades de développement, au même titre que les autres composants cuticulaires (Bargel *et al*., 2006). Cependant, tous les acyl-CoA précurseurs vont connaître 3 réactions majeures (figure 46) : une acyl-activation, une hydroxylation (en position ω et potentiellement en milieu de chaîne) et un transfert à un glycérol (Pollard *et al*., 2008 ; Yeats et Rose, 2013). L'ordre des réactions n'est pas encore formellement démontré mais des études biochimiques laissent à penser que l'ω-hydroxylation précède l'hydroxylation en milieu de chaîne (Li-Beisson *et al*., 2009) et que l'hydroxylation précède le transfert au glycérol (Yang *et al*., 2012).

2.4.4.1 Acyl activation

La mise en place du phénomène d'activation des acides gras par une enzyme LACS reste encore à préciser. Les acides gras sont exportés du plaste sous leur forme activée mais il semble qu'un pool d'acides gras libres soit présent dans le RE, suggérant l'intervention d'une thioestérase. La nécessité d'un pool d'acides gras libres peut s'expliquer par une meilleure disponibilité des substrats dans le compartiment du RE, siège de la synthèse finale des produits lipidiques. L'acyl activation semble être une réaction précoce dans la synthèse des monomères de cutine puisque le couplage à un glycérol ne s'effectue

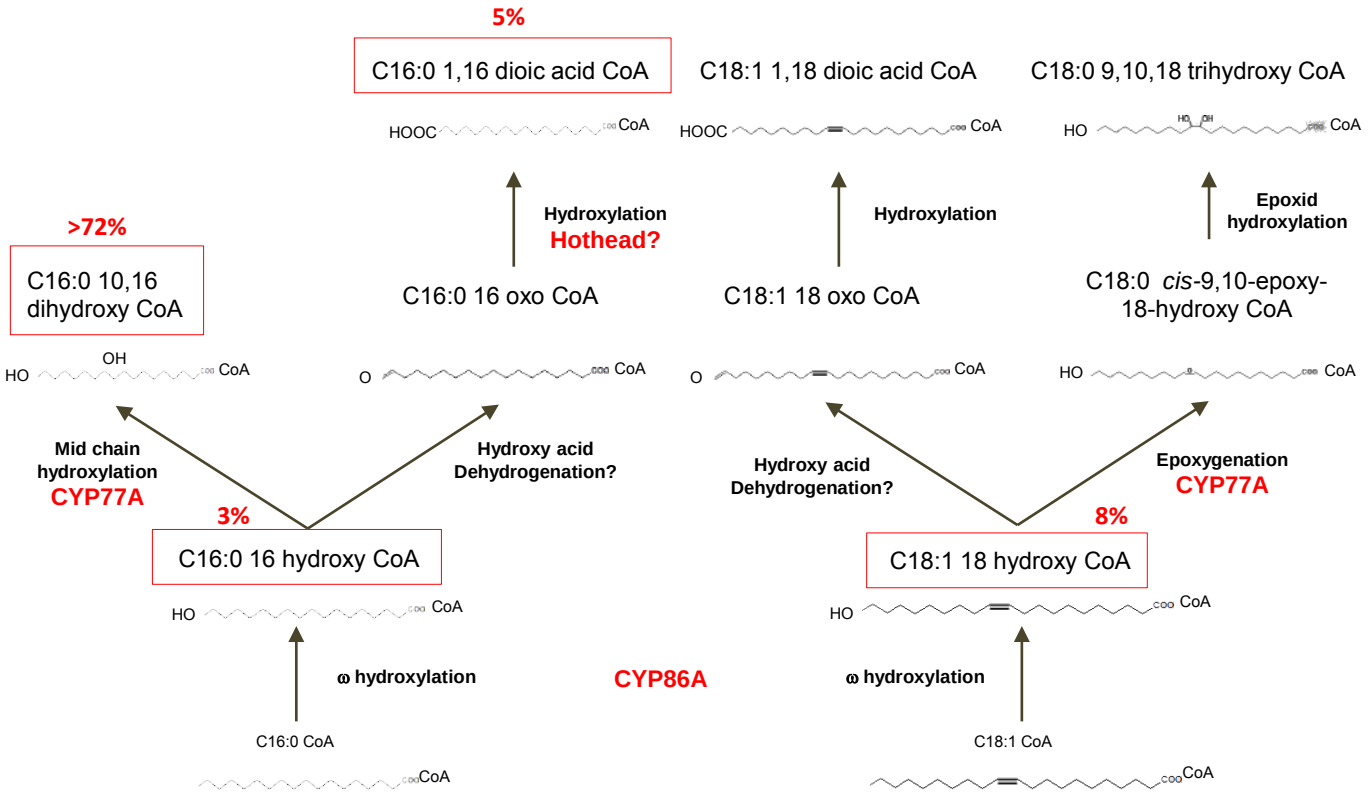


Figure 47 : Réactions potentielles permettant d'obtenir les différents monomères de cutine retrouvés chez la tomate. Les quantités indiquées au dessus des composés majoritaires correspondent à celles mesurées chez un fruit de tomate WVa106 de type sauvage.

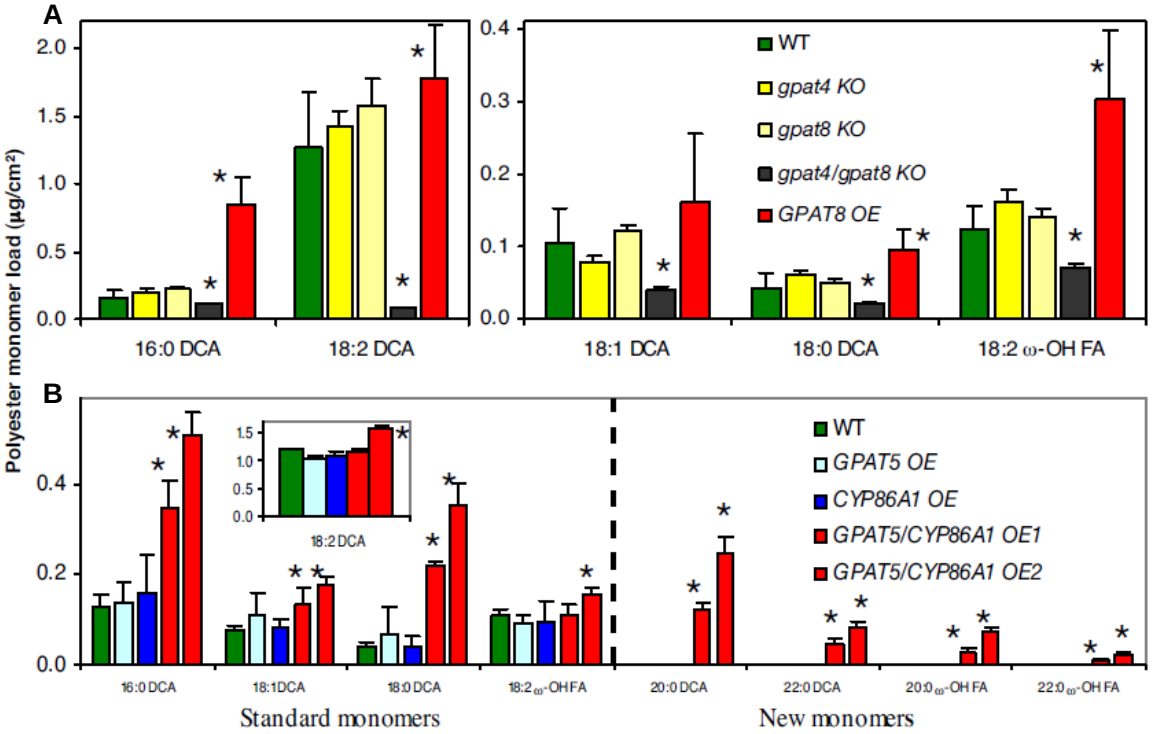


Figure 48 : Analyse de la cutine de transformants *gpat4*, *gpat5*, *gpat8* et *cyp86a1* d'*Arabidopsis*. A. Effets du KO de *GPAT4* et *GPAT8*, ou de la surexpression de *GPAT8* sur les monomères de cutine majoritaires de la tige. Non montré : résultats équivalents pour GPAT4 OE. B. Effets de la surexpression de *GPAT5* associée à la subérine et/ou l'oxydase d'acides gras *CYP86A1* sur les monomères de cutine majoritaires de la tige. Valeurs moyennes de 4 réplicats, intervalle de confiance à 95%. L'astérisque signale une différence significative avec la WT (test t, P<0.05), d'après Li *et al.*, 2007.

que sur des acides gras activés. Cependant, l'ordre entre l'acyl activation et l'hydroxylation reste inconnu puisque l'enzyme LACS peut activer aussi un bien un acide gras libre qu'un acide gras ω-hydroxylé (Schnurr *et al*., 2004) et l'hydroxylase a une activité *in vitro* avec les acides gras libres (Benveniste *et al*., 2006) et activés. Les enzymes de la famille LACS comptent 9 membres chez *Arabidopsis* et il semble que les gènes *LACS1* et *LACS2* interviennent dans la biosynthèse des monomères de cutine en C_{16} (Lu *et al*., 2009).

2.4.4.2 Hydroxylation

L'hydroxylation des acides gras est assuré par des enzymes de la famille des cytochromes P450 oxydases (figure 47). La première étape serait l'hydroxylation en position ω, réalisée par une sous famille des cytochromes P450 notée CYP86A (chez Arabidopsis, CYP86A8/ LACERATA dans les tissus végétatifs, Wellesen *et al*., 2001 ; CYP86A4 dans les pétales ; Li-Beisson *et al*., 2009) et la seconde étape serait l'hydroxylation en milieu de chaîne, effectuée par une CYP77 (CYP77A6 dans les pétales d'Arabidopsis ; Li-Beisson *et al*., 2009). Une glucose-méthanol-choline oxydoréductase a été isolée chez le mutant de fusion *hothead* (*hth*) d'*Arabidopsis*. La protéine HTH semble nécessaire à une bonne organisation de la cutine (Krolikowski *et al*., 2003). Des analyses biochimiques suggèrent que HTH serait responsable de la synthèse des acides dicarboxyliques à partir des acides ω-hydroxylés (Kurdyukov *et al*., 2006b). La composition de la cutine d'*Arabidopsis* étant atypique dans le règne végétal, une validation de la fonction des protéines HTH chez d'autres plantes permettrait d'argumenter son rôle dans la synthèse de la cutine.

2.4.4.3 Estérification à un glycérol

La troisième étape est l'estérification du monomère de cutine sur un groupement glycérol par une enzyme acyltransférase, de type glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT). L'étude combinée de mutants *gpat* et *CYP86A* chez *Arabidopsis thaliana* (Li *et al*., 2007) a montré d'une part le rôle primordial des acyltransférases dans la synthèse de cutine, mais aussi la relation forte entre les hydroxylases et les acyltransférases (figure 48). Ainsi, il existe une redondance fonctionnelle entre les gènes *GPAT4* et *GPAT8* au niveau des organes végétatifs *d'A. thaliana* et l'effet d'une double mutation est drastique sur la composition en cutine (figure 48A). La surexpression de GPAT4 ou GPAT8 conduit à une augmentation de la teneur en cutine. Il est à noter que des constructions réalisées avec des gènes liés à la voie de biosynthèse de la subérine (GPAT5 et CYP86A1) conduisent à des résultats intéressants. La surexpression de GPAT5 n'induit aucun changement dans la teneur en cutine, pas plus que celle de l'hydroxylase CYP86A1. Par contre, quand les 2 enzymes sont co-surexprimées, une augmentation de 80% des lipides polyestérifiés totaux

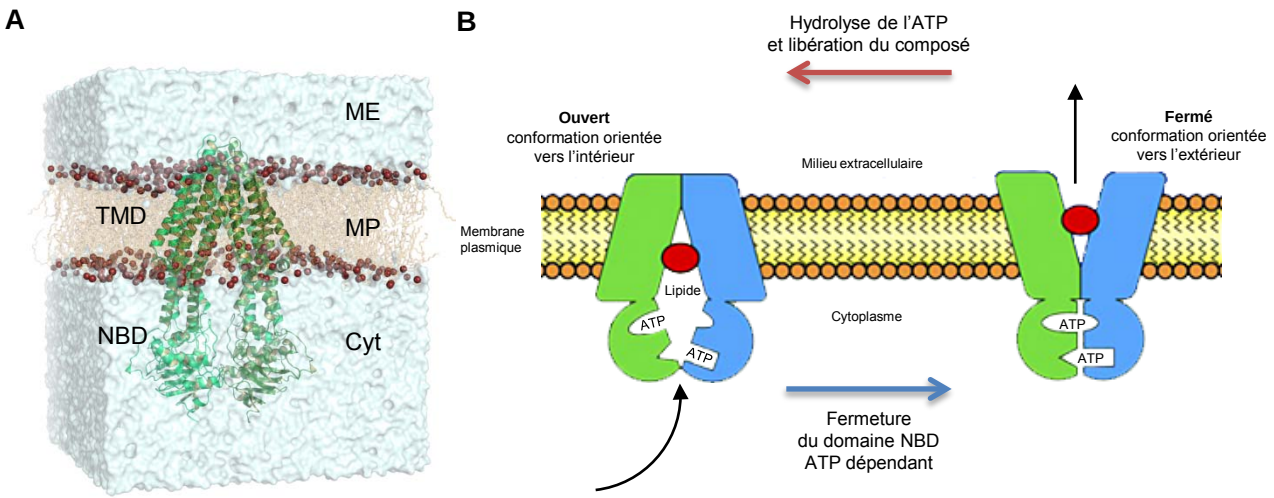


Figure 49 : Représentation schématique d'un transporteur de type ABC et de son fonctionnement. A. Reconstitution informatique en 3 dimensions d'un transporteur ABC enchâssé dans la membrane plasmique. TMD : domaine transmembranaire; NBD : domaine de liaison aux nucléotides; ME : milieu extracellulaire; MP : membrane plasmique, Cyt : cytoplasme (d'après V. Corradi, Université de Calgary). B. Représentation schématique du fonctionnement d'un transporteur ABC. La molécule à transporter, ici un lipide, va passer entre les 2 demi domaines NBD du transporteur en conformation ouvert, orienté vers le cytoplasme. La fermeture du domaine NB, ATP-dépendante, va entraîner le changement de conformation du transporteur ABC qui va alors permettre le passage du lipide vers le milieu extracellulaire (adapté de Procko *et al*., 2009).

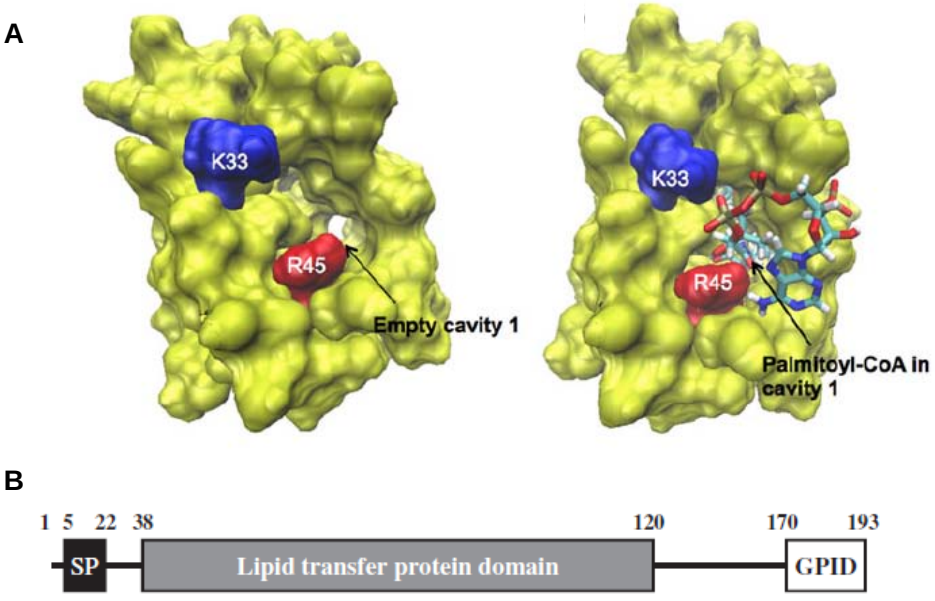


Figure 50 : Illustration de la structure d'un non specific LTP et d'un GPI-anchored LTP. A. Modèle structural du complexe LTP6 de *Lotus japonica* avec sa cavité vide et avec sa cavité logeant un palmitoyl-CoA (Tapia *et al*., 2013). B. représentation schématique du domaine LTPG2. SP : signal peptide; GPID : GlycosylPhosphatidylInositol-anchored Domain. Les nombres indiquent les séquences en acides aminés de la protéine LTPG2 (Kim *et al*., 2012).

est observée (figure 48B) avec la présence de chaînes à 20 et 22 atomes de carbone, typiques de la subérine mais localisées au niveau de l'épiderme. Cette étude montre la spécificité tissulaire des acyltransférases et hydroxylases, ainsi que l'association fine existant entre ces enzymes.

2.4.5 Transports des composés cuticulaires

Après la synthèse des cires et des précurseurs de cutine dans le RE, ces molécules sont exportées du RE jusqu'à la membrane plasmique, doivent ensuite la franchir puis traverser la paroi polysaccharidique, pour atteindre la cuticule en formation. La plupart de ces processus de transports sont peu connus, aussi bien pour les cires que la cutine. Cependant, de nombreux travaux menés chez *Arabidopsis thaliana* ont permis de montrer que le trafic des cires et des précurseurs de cutine faisait intervenir des transporteurs ABC au niveau de la membrane plasmique (Pighin *et al*., 2004 ; Bird *et al*., 2007 ; Panikashvili *et al*., 2007 ; 2011 ; Bessire *et al*., 2011). Les transporteurs ABC ou transporteurs à ATP Binding Cassette (figure 49) forment un ensemble de protéines transmembranaires (domaines TMD), avec des domaines de liaisons aux nucléotides (domaines NBD), dont le rôle est le transport unidirectionnel de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. L'hydrolyse de l'ATP fourni de l'énergie permettant un changement de conformation du transporteur, ouvrant un passage aux composés à travers la membrane plasmique. Les transporteurs ABC peuvent se présenter sous forme d'hémi-transporteur (fonctionnant soit en homodimère, soit en hétérodimère) ou sous forme de transporteur complet.

Le transport des composés cuticulaires au travers de la paroi jusqu'à la surface de la plante reste encore à découvrir. Une des pistes actuellement à l'étude est l'implication de Lipid Transfer Protein (LTP). Les non specific LTP (nsLTP) facilitent *in vitro* le transfert des lipides entre des liposomes (Kader *et al*., 1984) et ont une cavité hydrophobe (Kader, 1996). Il a d'ailleurs été montré récemment chez *L. japonica* que cette cavité pouvait lier du palmitoil-CoA (Tapia *et al*., 2013), ce qui désigne les nsLTP comme des candidats potentiels pour le transport apoplastique (figure 50). Cependant, les nsLTP sont des transporteurs difficiles à classer car ils ont des activités biologiques variées, tout comme leurs expressions géniques différentes suivant les tissus, les stades de développement ou les stimuli. Ils interviennent dans les phénomènes de signalisation (Maldonado *et al*., 2002), d'activités antimicrobiennes (Molina *et al*., 1993) et d'allergénicité (Salcedo *et al.*, 2007). De plus, des analyses d'expression de transporteurs spécifiques de l'épiderme couplée à une recherche de mutants chez *A. thaliana* n'a pas permis d'isoler de nsLTP, mais un autre type de LTP : un Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein (LTPG) (DeBono *et al*., 2009). Ce LTP particulier, ancré dans la membrane plasmique, apparait plutôt comme une

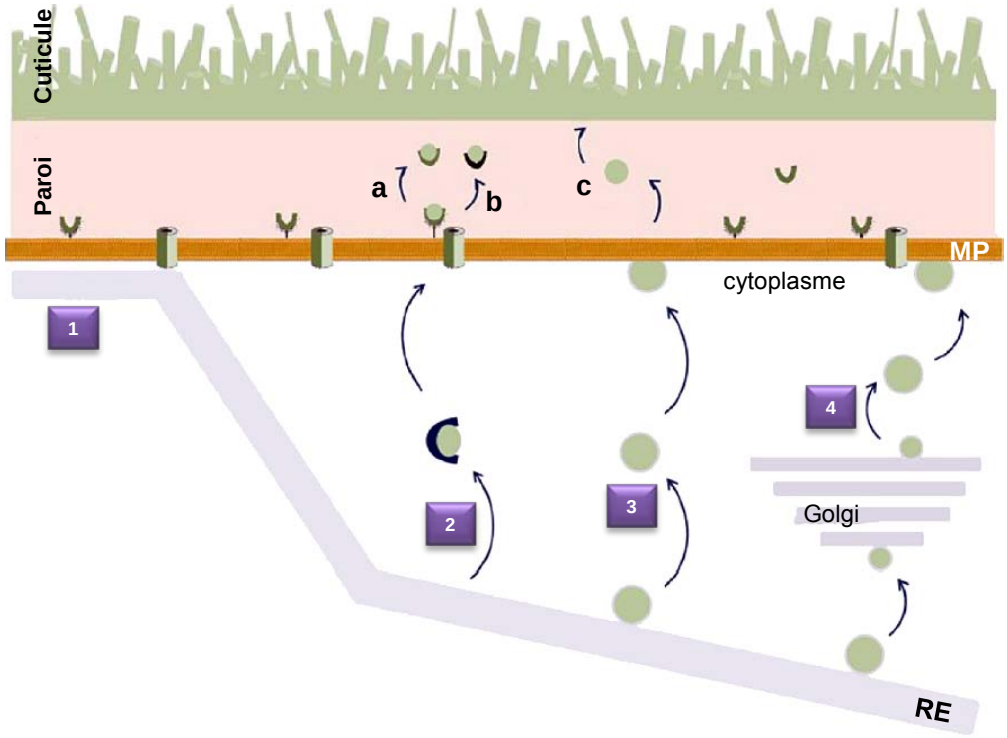


Figure 51 : Illustration des voies potentielles de transport des composés cuticulaires. 1-4 : Mécanismes potentiels du trafic cuticulaire du réticulum endoplasmique (RE) vers la membrane plasmique (MP) *via* des points de jonctions entre RE-MP (1), des transporteurs protéiques cytosoliques (2), des gouttelettes oléophiles (3), la voie sécrétoire de l'appareil de Golgi (4). L'export des composés cuticulaires de la MP est assuré par des transporteurs de type ABC. a-c : Mécanismes potentiels du trafic cuticulaire dans l'environnement apoplastique via la libération du LTPG ancré (a), un nsLTP (b), diffusion libre à travers la paroi (c) (adapté de Bernard et Joubès, 2013).

enzyme facilitant le passage de la membrane plasmique qu'un candidat pour le transport pariétal. Cependant, une coupure de l'ancrage peut être envisagée pour libérer le LTP dans l'apoplasme (Bernard et Joubès, 2013). Une autre voie possible est la diffusion simple des composés dans la paroi jusqu'à la surface de la plante (Yeats *et al.*, 2012b).

Une autre grande inconnue du système d'export est la façon dont les composés cuticulaires atteignent la membrane plasmique. Plusieurs mécanismes hypothétiques ont été avancés (Panikashvili et Aharoni, 2008 ; Bernard et Joubès, 2013) (figure 51) :

- Une jonction entre le RE et la membrane plasmique, qui pourrait être stabilisée par des PAM (Plasma membrane associated membranes) (Koziel *et al.*, 2009),
- Un transporteur protéique cytosolique inconnu, qui assurerait le transfert jusqu'au transporteur de type ABC,
- Une voie vésiculaire formant des corps lipidiques de type oléosome, susceptibles de décharger les composés cuticulaires directement dans les lipides rafts,
- Une voie sécrétoire utilisant l'appareil de Golgi.

Même si les modes de transport semblent les mêmes pour l'ensemble des composés cuticulaires, les études montrent que les acteurs impliqués dans le transport des cires ou de la cutine peuvent être spécifiques.

2.4.5.1 Export des cires

Le travail sur les mutants *eceriferum* d'Arabidopsis a permis d'isoler le gène *CER5/ABCG12*, codant pour un hémi-transporteur ABC permettant l'export spécifique de cires (Pighin *et al*., 2004). Un autre hémi-transporteur, *ABCG11* (Bird *et al*., 2007), est aussi impliqué dans le transport des cires. Il a été suggéré, après des études de double mutants et des analyses cytologiques en BiMolecular Fluorescence Complementation (BIFC) que ABCG11 et ABCG12 formait un hétérodimère nécessaire à la sécrétion des composés cireux (Mc Farlane *et al*., 2010). L'export des cires est facilité par 2 Lipid Transfer Protein, LTPG1 et LTPG2, liées à la face extracellulaire de la membrane plasmique (DeBono *et al*., 2009 ; Lee *et al*., 2009 ; Kim *et al*., 2012).

2.4.5.2 Export des monomères de cutine

L'hémi-transporteur WBCG11 joue aussi un rôle dans l'export des monomères de cutine et il peut s'associer avec lui-même pour former un homodimère (Mc Farlane *et al*., 2010). Un autre hémi-transporteur, ABCG13, impliqué dans le dépôt de cutine au niveau des fleurs a été identifié chez Arabidopsis (Panikashvili *et al*., 2011). Enfin, un transporteur complet, intervenant dans le transport de cutine a été identifié chez Arabidopsis (ABCG32 ;

Bessire et al., 2011), chez l'orge et chez le riz (Chen *et al*., 2011). Des études bioinformatiques menées sur des nsLTP semblent montrer de fortes affinités de ces protéines pour les monomères de cutine (Tapia *et al*., 2013).

2.4.6. Polymérisation de la cutine

La cutine est un polyester d'acides gras hydroxylés / epoxydés et de glycérol mais le mécanisme de cette polymérisation a été difficile à cerner. Il a été proposé différents processus comme une polyestérification chimique (Heredia-Guerrero *et al.*, 2009) ou bien l'existence d'une enzyme catalysant le mécanisme de polymérisation. Cette seconde hypothèse a été l'objet de nombreux travaux menés chez Arabidopsis, qui ont permis notamment de mettre en évidence une α/β hydrolase BODYGUARD (BDG), présentée comme un candidat potentiel (Kurdyukov *et al*., 2006b). Cependant, les effets pléiotropiques engendrés par la mutation, notamment au niveau de l'organisation des assises épidermiques, n'ont pas permis de clarifier la fonction de cette protéine. Récemment, il a été montré que BDG joue également un rôle majeur dans la régulation de la synthèse d'acide abscissique en réponse à un stress osmotique (Wang *et al*., 2011 ; Lisso *et al*., 2012). Une acyl-transférase cytosolique de la famille des BADH acyltransférases, la protéine DEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES (DCR) a montré une activité diacylglycérol-acyltransférase *in vitro*, responsable de l'incorporation de dihydroxypalmitate dans la cutine des fleurs d'Arabidopsis (Rani *et al*., 2010 ; Panikashvili *et al*, 2011). La localisation cytosolique de DCR pose le problème du transport du polymère jusqu'à la surface extracellulaire, ce qui cantonnerait cette protéine à un rôle de pré-assemblage intracellulaire. De la même façon, l'analyse du gène *Wilted Dwarf and Lethal 1* (*WDL1*) chez le riz, codant pour une protéine appartenant à la classe des SGNH, une sous famille des GDSL Lipase, a montré son implication dans la mise en place d'un polymère de cutine normal (Park *et al.*, 2010). La perte de la protéine WDL1 n'entraîne pas de conséquence sur la quantité de monomère de cutine mais conduit à des irrégularités de dépôt de la cuticule et à des modifications de la paroi cellulaire. La localisation de WDL1 dans le RE, comme la protéine DCR, ne permet pas de conclure quant au rôle exact de la protéine dans la polymérisation de la cutine.

Depuis quelques années, la famille des Gly-Asp-Ser-Leu estérases / acylhydrolase, appelée plus communément GDSL-Lipases, est suspectée d'être impliquée dans la polymérisation de la cutine, de par son expression spécifique des tissus épidermiques, à proximité des membranes cuticulaires (Lemaire-Chamley *et al*., 2005 ; Reina *et al*., 2007, Mintz-Oron *et al*., 2008, Matas *et al*., 2010 ; Yeats *et al*., 2010). De plus, chez *Arabidospsis thaliana*, l'expression d'une GDSL-Lipase est régulée positivement par WIN1/SHN1, un

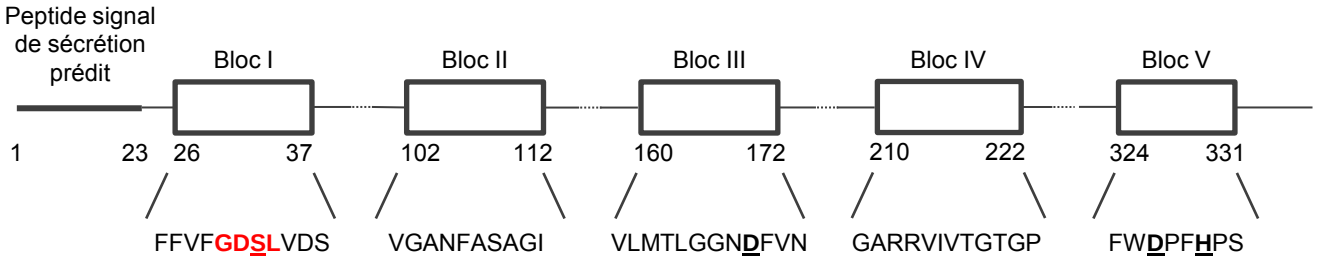


Figure 52 : Représentation schématique de la protéine GDSL2 de *S. lycopersicum*. Le motif tétrapeptidique G-D-S-L est indiqué en rouge, en gras. Les blocs I, III et V contiennent la triade catalytique classique (en gras souligné) : sérine, aspartate et histidine (adapté de Girard *et al*., 2012).

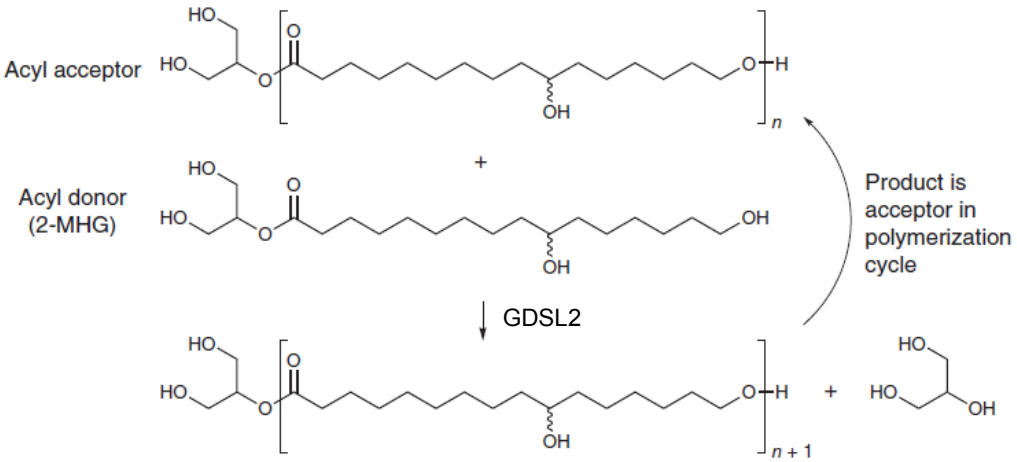


Figure 53 : Modèle proposé d'activité acyltransférase de la protéine SlGDSL2. L'enzyme catalyserait la biosynthèse de la cutine par transfert d'un groupe hydroxyacyl provenant d'un 2-mono-hydroxy-glycérol vers le polymère en formation. Seule la polymérisation *via* l'hydroxyl primaire est présentée, mais la liaison par l'hydroxyl secondaire peut s'effectuer (adapté de Yeats *et al*., 2012a)

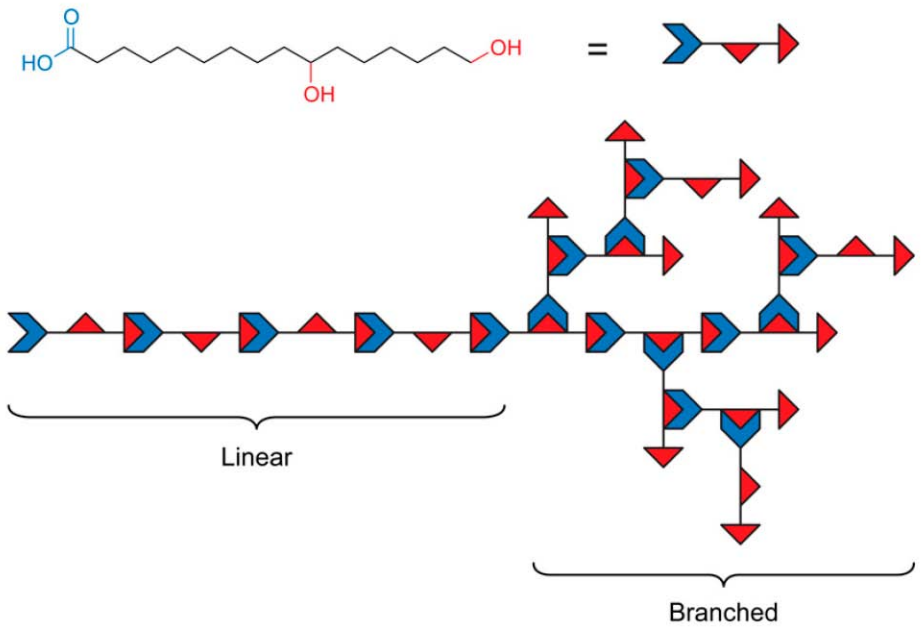


Figure 54 : Représentation schématique de la structure polymérique de la cutine. Les domaines linéaires ou branchés sont possibles par les différentes liaisons esters du 10,16-dihydroxyhexadécanoate (d'après Yeats et Rose, 2013)

facteur de transcription qui régule le dépôt de cutine (Kannangara *et al*, 2007; Shi *et al*, 2011). Les GDSL-Lipases sont synthétisées sous forme de pré-protéines contenant un signal peptidique facilitant l'export extracellulaire (figure 52). Récemment, des analyses chez la tomate ont montré que le gène *SlGDSL2* codait pour une protéine intervenant dans le degré de polymérisation de la cutine (Girard *et al*., 2012) et possédant une activité acyltransférase *in vitro* à partir de 2-mono-hydroxy-glycérol (Yeats *et al*., 2012a). La polymérisation s'effectuerait par transfert du groupe hydroxyacyl vers la cutine en formation, libérant ainsi un glycérol (figure 53). La structure du polymère reste encore discutée puisque suivant la position du groupement hydroxyl estérifié, la conformation du polymère peut être très différente. L'estérification de l'hydroxyl primaire conduit à une chaîne linéaire mais l'implication de l'hydroxyl secondaire conduit à la formation d'une chaîne latérale, branchée (figure 54).

2.4.7 Régulation de la biosynthèse cuticulaire

La régulation de la biosynthèse de la cuticule est un système complexe, redondant et interconnecté. La complexité de cette régulation découle en partie de son rôle de barrière de défense face aux stress biotiques et abiotiques, impliquant des interactions avec les réseaux de signalisation associés aux réponses aux stress environnementaux et aux pathogènes. De plus, la cuticule étant synthétisée exclusivement par les cellules épidermiques, la régulation de l'identité de l'épiderme au cours du développement influence la régulation du développement de la cuticule (Javelle *et al*., 2011). Cette interconnexion rend l'étude de la régulation de la cuticule encore plus délicate, mais progressivement, un réseau de régulation émerge, permettant de répondre aux contraintes développementales et environnementales, par l'intermédiaire d'hormones, de facteurs de transcriptions et de régulations post-transcriptionnelles (figure 55).

2.4.7.1 Régulation hormonale et environnementale.

L'acide abscissique (ABA) est un régulateur de la réponse des plantes au stress hydrique à travers son effet sur l'ouverture stomatale (Lee et Luan, 2012). L'ABA joue aussi un rôle sur la régulation de la synthèse des cires cuticulaires chez Arabidopsis, au même titre que les stress salins et hydriques. En effet, l'ABA induit une expression des gènes impliqués dans la synthèse des cires, conduisant à des modifications de la composition de la cuticule (Kosma *et al*., 2009).

Certaines conditions environnementales, comme des traitements au froid ou à l'obscurité entraînent une réduction de l'expression de plusieurs gènes composant le complexe d'élongation des acides gras (Hooker *et al*., 2002 ; Joubès *et al*., 2008). Il a aussi

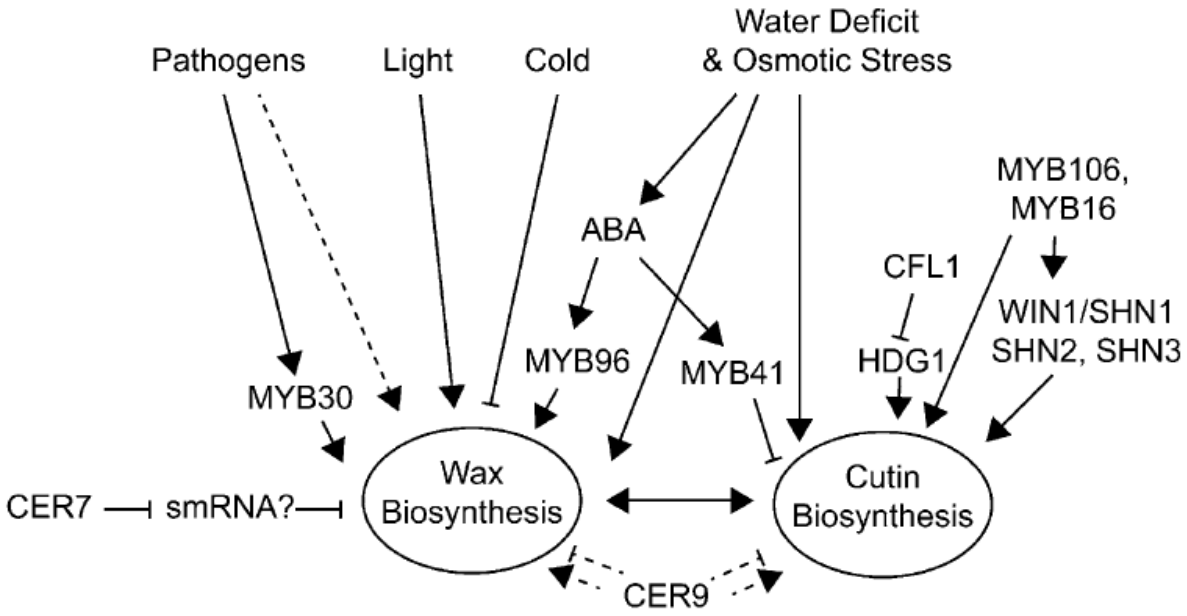


Figure 55 : Régulation de la biosynthèse cuticulaire. Résumé des interactions entre facteurs environnementaux et gènes de régulation connus pour moduler la biosynthèse des cires et de la cutine (d'après Yeats et Rose, 2013).

été montré que plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des cires sont induits par des pathogènes (Raffaele *et al.*, 2008) ou des ravageurs (Kosma *et al*., 2010).

2.4.7.2 Facteurs de transcription

Le premier facteur de transcription identifié ayant un rôle dans la régulation de la biosynthèse de la cuticule est *Wax Inducer 1*/*Shine 1* (*WIN1*/*SHN1 ;* Aharoni *et al*., 2004 ; Broun *et al*., 2004), un facteur de transcription de la famille des APETALA2–ethylene-responsive element binding protein (AP2/EREBP), caractérisée notamment par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type AP2. La surexpression de *WIN1*/*SHN1* conduit à une production accrue de cires et de cutine, mais aussi à une réduction de la densité stomatale (Aharoni *et al*., 2004 ; Kannangara *et al*., 2007). Il a été montré que les facteurs de transcription SHN activent le promoteur de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de la cutine, avec un effet en aval sur la biosynthèse des cires (Shi et al., 2011). De plus, soulignant la complexité et l'interconnexion entre les différentes voies de biosynthèse dans les cellules épidermiques, il a été montré que SHN induit l'expression d'enzymes de modifications des pectines, suggérant une coordination entre cuticule et paroi cellulaire polysaccharidique (Shi *et al*., 2011). L'effet des facteurs de transcription SHN dans les régulations de la cuticule et de la paroi a été observé chez le riz (Ambavaram *et al.*, 2011), l'orge (Taketa *et al*., 2008) et la tomate (Shi *et al*., 2013). Cette relation fine entre cuticule et paroi suggère que la cuticule est une modification spécialisée de la paroi cellulaire (Yeats et Rose, 2013). Enfin, les gènes *SHN1* et *SHN3* ont des effets sur la morphogénèse des cellules épidermiques et jouent notamment sur l'élongation cellulaire (Shi *et al*., 2011). D'autres facteurs de transcription appartenant aux AP2/EREBP ont été identifiés chez Arabidopsis, notamment les 3 gènes *WRINKLED*, capables de déclencher une production soutenue de triacylglycérols dans les graines (WRI1), ou de chaînes acyl pour la production de cutine dans les parties florales (WRI1, WRI3 et WRI4) (To *et al*, 2012). Des facteurs de transcription à motif AP2 ont été identifiés chez les luzernes, WXP1 et WXP2, intervenant dans la régulation de la cuticule. La surexpression de WXP1 chez *Medicago sativa* conduit à une augmentation de la production de cires cuticulaires (Zhang *et al*., 2005).

D'autres familles de facteurs de transcription interviennent dans la régulation de la biosynthèse de la cuticule, notamment deux sous-familles de MYB, les R2R3 exprimés en conditions de stress et les MIXTA-like, intervenant dans la morphogénèse des cellules épidermiques. Certains MYB de la famille R2R3, tel MYB30 exprimé lors d'une infection par des pathogènes, peuvent induire une surexpression des gènes du complexe FAE. Cette augmentation de la synthèse des VLCFA conduit à une charge en cires plus importantes (Raffaele *et al*., 2008). MYB96, identifié chez Arabidopsis, s'avère être un facteur de

transcription inductible par l'ABA, permettant une adaptation à un stress hydrique (Seo *et al*., 2009). Cette adaptation passe par une activation des promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des cires (Seo *et al*., 2011). Le facteur de transcription MYB41, en réponse à des stress hydriques, salins ou après induction par l'ABA régule quant à lui négativement la biosynthèse de la cutine (Cominelli *et al*., 2008). Il semble faire partie d'un réseau complexe permettant de moduler l'intensité de la synthèse cuticulaire. Les MYB16 et MYB106, de type MIXTA-like, ont été identifiés comme des régulateurs de la biosynthèse de la cuticule (Oshima *et al*., 2013). Ils fonctionnent sur le même principe que WIN1/SHN1, mais avec un champ de régulation plus étendu : ils agissent en amont des gènes SHN, peuvent les activer directement et agir sur les promoteurs des gènes de la biosynthèse de la cuticule (Oshima *et al*., 2013).

Certaines protéines homeodomain-leucine zipper IV (HD-ZIP IV) régulent également la synthèse de la cuticule. Le gène *Cutin Deficient 2* (*CD2*) isolé chez la tomate est nécessaire à la biosynthèse de la cutine dans le fruit, mais aussi dans d'autres organes (Isaacson *et al*., 2009 ; Nadakuduti *et al*., 2012). Chez le maïs, le facteur de transcription de type HD-ZIP IV Outer Cell Layer 1 (OCL1), exprimé spécifiquement dans les cellules épidermiques, est un régulateur positif de la biosynthèse de cires (Javelle *et al.*, 2010). Les protéines HD-ZIP IV peuvent aussi être la cible d'une régulation et c'est le cas de HDG1, un facteur induisant plusieurs gènes de la synthèse de cutine. La fonction de HDG1 peut être abolie par le gène *Curly flag leaf 1* (*CFL1*), codant pour une protéine à domaine WW, induisant ainsi une régulation négative de la biosynthèse de la cuticule (Wu *et al*., 2011). Les protéines HD-ZIP IV sont également impliquées dans la régulation de processus spécifiques de l'épiderme, comme la différenciation des trichomes, la formation des poils absorbants racinaires et la mise en place des cellules de garde stomatales (Masucci *et al*., 1996 ; Nakamura *et al.*, 2006 ; Takada *et al*., 2013).

Un autre facteur de transcription a été isolé récemment chez la glycine soja, appartenant à la famille des WRKY. *GsWRKY20* est capable de réguler la signalisation par l'ABA mais aussi de réguler positivement certains gènes de la voie de biosynthèse des cires, de la cutine et des transporteurs, entraînant la formation d'une cuticule plus épaisse, permettant une meilleure résistance au stress hydrique (Luo *et al*., 2013).

2.4.7.3 Régulations post-transcriptionnelles

Les études du mutant d'Arabidopsis *cer9*, atteint au niveau de sa composition et de sa quantité de cires, ont montré que le gène *CER9* code pour une protéine appartenant à la famille des E3 Ubiquitine ligase, impliquée au niveau du RE dans la dégradation des protéines mal conformées (Lu et *al*., 2012). Le mutant *cer9* possède une meilleure résistance

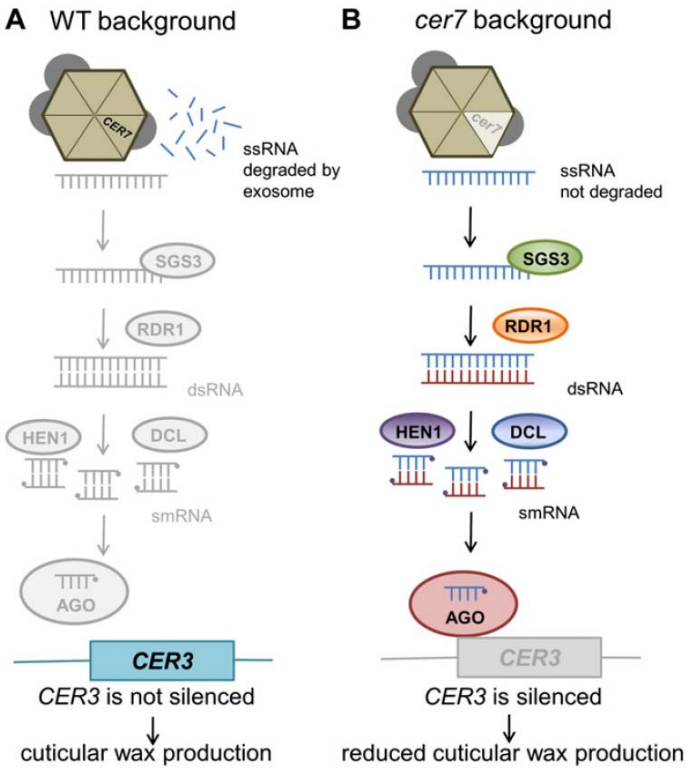


Figure 56 : Modèle illustrant les rôles de RDR1 et SGS3, composants de la machinerie de RNA-silencing, dans la régulation de la biosynthèse des cires. A. Dans le WT, l'ARN simple brin régulant *CER3* est dégradé par CER7, une ribonucléase de l'exosome. CER3 est exprimée, permettant la synthèse de cires. B. Dans le mutant *cer7*, l'ARN n'est pas dégradé conduisant à l'intervention de la machinerie de RNA-silencing, *via* SGS3 et RDR1, puis les enzymes DICER-like qui vont produire des siRNA, pris en charge par AGO, conduisant à la réduction de l'expression de *CER3*. HEN1 : HUA ENHANCER1; DCL : DICER-LIKE; AGO : ARGONAUTE (d'après Lam *et al.*, 2012).

au stress hydrique et une meilleure efficacité dans l'utilisation de l'eau, laissant penser que *CER9* serait impliqué dans le maintien de l'homéostasie du niveau d'expression de certains gènes clés de la biosynthèse de la cuticule (Lu et *al*., 2012). Un autre mutant d'Arabidopsis, *cer7*, a révélé également un autre mécanisme de régulation. La protéine CER7 est une ribonucléase localisée dans l'exosome qui réduirait la transcription du gène *CER3*, codant pour une enzyme majeure de la biosynthèse des cires, entraînant une diminution des cires cuticulaires (Hooker *et al*., 2007). Récemment, l'identification des gènes *RDR1* et *SGS3* codant pour des composants de la voie du « RNA-mediated gene silencing », a permis de mieux comprendre les mécanismes faisant intervenir CER7 (Lam *et al*., 2012). La protéine CER7 serait impliquée dans la dégradation d'ARN simple brin, responsables de la régulation négative des transcrits du gène *CER3* (figure 56). Dans le cas du mutant *cer7*, les ARN simple brin ne seraient pas dégradés par l'exosome et seraient alors utilisés par la machinerie de silencing de la plante. SGS3 et RDR1 vont catalyser la conversion des ARN simple brin en ARN double brins, qui servent de substrat aux enzymes DICER-like, pour produire des petits ARN, appelés siRNA. Ces siRNA seront utilisés par la protéine ARGONAUTE (AGO) pour cibler *CER3* et ainsi éteindre son expression.

3. Recherche de mutations

L'étude chez *Arabidopsis thaliana* des mutants *eceriferum* et des mutants insertionnels (lignées T-DNA) a permis des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes moléculaires liés la biosynthèse de la cuticule. Cependant, il reste à résoudre les mécanismes liés au transport des composés cuticulaires, à la régulation de la biosynthèse et aux liens structuraux entre paroi cellulaire et cuticule. La tomate a longtemps été utilisée pour étudier les propriétés biomécaniques de la cuticule, en raison d'une cuticule épaisse au niveau de ses fruits, qui s'avère simple à prélever et à isoler. De plus, sa cuticule dépourvue de stomate au niveau des fruits et sa surface homogène sont des atouts pour les études sur la perméance cuticulaire et la résistance à la dessiccation (Vogg *et al*., 2004 ; Isaacson *et al*., 2009). Depuis plusieurs années, le développement des ressources génétiques et génomiques associées à la tomate, comprenant la mise en place de banques d'EST, l'essor des marqueurs moléculaires, la construction de cartes génétiques saturées en désormais la séquence génomique annotée (Tomato Genome Consortium, 2012) offre de nouvelles possibilités pour exploiter la tomate en tant que plante modèle pour l'étude de la cuticule (Hovav *et al*., 2007; Adato *et al*., 2009; Isaacson *et al*., 2009; Girard *et al*., 2012; Yeats et Rose, 2013 ; Shi *et al*., 2013). Pour explorer les relations entre composition et propriétés de la cuticule et pour découvrir de nouveaux gènes et de nouvelles fonctions, il est nécessaire d'exploiter la variabilité naturelle ou induite des gènes de la tomate impliqués dans la synthèse et la régulation, des cires, de la cutine et de la subérine.

3.1 Collections de mutants

Les lignées T-DNA ou transposon-tagged sont des ressources de choix pour réaliser la validation fonctionnelle de gènes candidats. Ainsi, un nombre considérable de travaux et d'avancées scientifiques a pu être réalisé grâce à ces outils chez *Arabidopsis.* Cependant, la réalisation des lignées T-DNA s'est révélée être une tache ardue et le génome de la tomate étant pratiquement 6 fois plus grand que celui d'*Arabidopsis* (900 Mb *vs* 157 Mb), la mise en place de tels outils chez la tomate est un travail colossal (plus de 10^5 lignées pour obtenir la saturation du génome, Emmanuel et Levy, 2002). Les analyses fonctionnelles *in planta* sont donc généralement réalisées chez la tomate en utilisant des transformations stables, comme la surexpression sous le contrôle de promoteurs constitutifs ou tissus/stades de développement spécifiques (Fernandez *et al*., 2009) ou la répression, avec le RNA interférence (Chuang et Meyerowitz, 2000 ; Hannon, 2002), micro RNA artificiel (amiRNA ; Molesini *et al*., 2012) et l'extinction par répresseur chimérique (CRES-T ; Hiratsu *et al*., 2003). La génération de plantes transgéniques est cependant longue et nécessite des installations techniques réglementées. La transformation stable pose aussi le problème des variations somaclonales lors de la régénération des plantules, dont les fréquences sont parfois élevées (Arnold *et al*., 1995 ; Etienne et Bertrand, 2003). L'utilisation de transformation transitoire peut permettre de s'affranchir de ces contraintes pour étudier les effets de l'extinction d'un gène en utilisant des systèmes tels que le Virus Induced Gene Silencing (VIGS ; Baulcombe *et al*., 2004 ; Sahu *et al*, 2012).

La découverte dans les années 30 que les mutations peuvent être induites dans un génome a révolutionné l'histoire de la génétique. Alors que seules les mutations spontanées étaient disponibles pour les études de génétique, il a été montré que l'utilisation de rayons ionisants ou d'agents chimiques était susceptible d'entraîner des mutations ponctuelles (Muller, 1930). Plus tard, cette approche sera utilisée pour induire artificiellement de la variabilité génétique de façon aléatoire au sein d'une population (Koornneef *et al*., 1982). L'exposition de semences à des agents mutagènes tels des radiations (fast neutron) ou l'ethyl methanesulfonate (EMS) entraîne des mutations ponctuelles, dont la fréquence est indépendante de la taille du génome (Greene *et al*., 2003). Différents fonds génétiques de tomate ont été utilisés pour créer des collections EMS, tels M82, une tomate d'industrie (Menda *et al.*, 2004) ou Micro-Tom, une tomate miniature à croissance déterminée (Just *et al*., 2013), généralement utilisée comme plante d'ornement. L'avantage de la tomate Micro-Tom réside dans sa taille réduite (10 à 20 cm de haut) qui permet de réaliser des cultures de forte densité et son cycle de vie court (70 à 90 jours) (Emmanuel et Levy, 2002). Ces particularités rendent Micro-Tom particulièrement bien adapté à des criblages haut débit de phénotype mutant d'intérêts. La collection EMS Micro-Tom de l'INRA Bordeaux comprend

environ 8000 familles, dont 3500 ont été phénotypées, et les annotations ont été regroupées dans environ 150 catégories phénotypiques. La densité moyenne de mutation estimée est d'1 mutation tous les 125 kb (Just et al., 2013).

3.2 Génétique inverse

Une des manières les plus directes pour déterminer la fonction d'un gène est d'analyser les changements qui se produisent dans un organisme quand ce gène est inactivé. Cette méthode dite de génétique inverse (du gène vers le phénotype) consiste à étudier les conséquences d'une modification d'un gène ou d'une protéine *in planta*. L'utilisation de mutants insertionnels conduit à l'interruption de l'expression d'un gène ou à une structure protéique tronquée, engendrant généralement des phénotypes forts ou dominants. A l'inverse, des mutations ponctuelles du génome permettent obtenir des modifications plus subtiles sur les protéines, sans perturber l'expression des gènes. Aujourd'hui, l'avènement de stratégies comme le Targeting-Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING, Mc Callum *et al.*, 2000), associant une collection de mutant EMS et une méthode de détection de mutation confère une puissance et un débit inconnu jusqu'alors en génétique inverse. Cette approche repose tout d'abord sur la mise en place d'une collection de mutants EMS qui permettra de réaliser des analyses fonctionnelles sur des gènes cibles. Cette collection de mutants doit présenter une fréquence élevée de mutations, permettant d'une part de limiter le nombre de lignées nécessaire pour saturer le génome, et d'autre part la possibilité d'obtenir des séries alléliques pour un gène donné. L'intérêt d'une série allélique est d'isoler différentes mutations ponctuelles sur le même gène, ayant des conséquences différentes sur la protéine, se traduisant potentiellement par des phénotypes aux effets contrastés. Le deuxième pré-requis est la maîtrise d'un système de criblage de mutations, permettant de mettre en évidence les modifications dans les cibles d'ADN. Les techniques de détection actuellement utilisées peuvent être la Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC ; Mc Callum *et al*., 2000), la digestion par une endonucléase (Till *et al*., 2004) ou le séquençage (Tsai *et al*., 2011).

Dans le cas d'une détection par une endonucléase, le criblage d'une collection EMS pour une séquence cible donnée s'effectue de la façon suivante. Après mutagénèse des graines, les plantes résultantes appelées M1 sont auto fécondées, et la génération M2 des individus est utilisée pour d'une part réaliser des extractions d'ADN et d'autre part générer les graines M3, qui seront stockées. Les échantillons d'ADN sont poolés puis amplifiés par PCR, sur une région spécifique du gène d'intérêt. Les produits d'amplification sont incubés avec une endonucléase qui va cliver préférentiellement les mésappariements entre les séquences de l'hétéroduplex formé par les ADN cibles (mutants) et l'ADN de référence (type

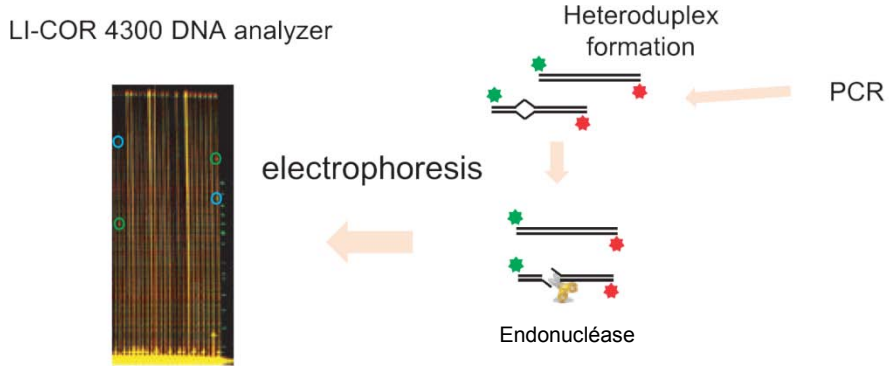


Figure 57 : Représentation simplifiée de l'étape de détection de mutation par digestion enzymatique lors d'une stratégie Targeting-Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING). L'amplification s'effectue sur les pools d'ADN, grâce à des amorces marquées spécifiques de la région d'intérêt. Les hétéroduplex sont clivés par une endonucléase. Les profils de digestion sont analysés sur un gel de séquence (adapté de Okabe *et al*., 2011)

sauvage) (figure 57). Lors de la détection d'une mutation dans un pool, les échantillons d'ADN sont analysés de nouveau, mais individuellement (on parle alors de déconvolution), afin de détecter la ou les plante(s) portant une mutation au niveau du gène d'intérêt. L'analyse des fréquences de mutations ponctuelles inconnues dans une région d'intérêt d'un gène cible a révélé qu'en moyenne, 45% des mutations engendrées par l'EMS étaient silencieuses, 5% étaient synonyme et que 50% des mutations provoquaient une modification faux sens, susceptible de modifier la fonction de la protéine (Greene *et al*., 2003).

3.3 Génétique directe et cartographie

L'approche classique, dite de génétique directe, est utilisée depuis l'époque des travaux de Mendel (1870) et consiste pour un phénotype mutant donné d'en déterminer le ou les gènes responsables. L'identification de la mutation s'effectue généralement par clonage positionnel qui utilise les techniques de cartographie, longue et parfois complexe, n'aboutissant pas forcément à une mise en évidence du candidat (Peters *et al*., 2003). Cette approche consiste à utiliser des marqueurs liés au gène muté pour délimiter une région contenant le gène d'intérêt. Les premiers marqueurs utilisés étaient peu nombreux et souvent sensibles aux variations de l'environnement, comme des marqueurs morphologiques ou des marqueurs biochimiques, telles les isozymes (Lewontin et Hubby, 1966). Des systèmes de marqueurs moléculaires basés sur l'ADN ont permis des avancées significatives comme les analyses de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP ; Botstein *et al*., 1980) mais c'est le développement des marqueurs basés sur les amplifications PCR qui a considérablement enrichi les cartes génétiques. Les marqueurs issus de l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD ; Williams *et al*., 1990), des séquences microsatellites de type simple sequence repeats (SSR) ou short tandem repeats (STR) (Zietkiewicz *et al*, 1994 ; Gupta *et al*., 1994) et du polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (AFLP ; Vos *et al*., 1995) ont conduit à la mise en place d'une cartographie plus systématique et plus rapide.

L'évolution des techniques de séquençage conduit à l'utilisation de nouveaux types de marqueurs, notamment chez les espèces disposant d'un grand nombre d'Expressed Sequence Tag (EST) dans les banques de données. Ces nouveaux marqueurs sont basés sur des variations de séquences, soit des polymorphismes de nucléotide simple (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), soit des insertions ou délétions d'un ou plusieurs nucléotides, appelées InDel (Rafalski *et al*., 2002). Ils représentent la plus grande source de variation génétique dans le génome, aussi bien dans les régions intra et inter géniques (Shirasawa *et al*., 2012). Désormais, les cartes génétiques à haute densité et les outils de génotypage à haut débit (puce à SNP) (Sim *et al*. 2012) couplés au séquençage massif des

génomes (Whole Genome Sequencing, WGS), notamment chez la tomate (Tomato Genome Consortium, 2012), permettent d'envisager des approches de génétique directe pour identifier des mutations d'intérêts au sein de collections EMS (Just *et al*., 2013). Ces collections de mutants constituent des ressources de variabilité susceptible de permettre la découverte de nouveaux phénotypes et de nouveaux variants alléliques. Cependant, l'identification des mutations causales responsables du phénotype reste délicate dans un mutant qui présente dans son génome un grand nombre de mutations causées par l'EMS.

Les cartes de liaison génétique nécessitent de croiser des parents suffisamment polymorphes afin d'obtenir un nombre de marqueurs élevés. Dans ce contexte, chez la tomate, peu de cartes intraspécifiques ont été obtenues dans la tomate cultivée car la diversité génétique au sein de *Solanum lycopersicum* s'avère assez restreinte (Shirasawa *et al*., 2010). Cependant, l'utilisation de parents très polymorphes peut être à l'origine de variations phénotypiques importantes pour le caractère d'intérêt quantitatif, difficile à cartographier. De plus, l'établissement d'une carte de liaison pour faire de la cartographie, notamment de la cartographie fine, nécessite des populations importantes. La surface nécessaire par de telles approches impose des limites techniques à de nombreux laboratoires qui ne disposent pas d'installations expérimentales adaptées. Cette contrainte souligne l'intérêt d'utiliser le cultivar Micro-Tom, un mutant affecté dans la synthèse des brassinostéroïdes, au niveau des tissus végétatifs (Martí *et al*. 2006) et un mutant EMS de la variété d'industrie M82, appelé M82 dwarf (Menda *et al*., 2004). Ces 2 génotypes présentent un phénotype miniature qui ne se complémente que partiellement lors d'un croisement, permettant la mise en place des populations F2 de cartographie avec plusieurs centaines de plantes dans un espace limité. Une carte de liaison génétique a donc été développée par un recherche de polymorphisme entre Micro-Tom et M82 dwarf et près de 640 marqueurs de type SNP ont pu être définis (Shirasawa *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, de nouvelles stratégies de génétique directe se mettent en place suite à au développement des techniques de séquençage à haut débit, de type Next Generation Sequencing (NGS), qui permettent d'obtenir le séquençage de génomes entiers avec une couverture élevée, à un coût raisonnable. Les approches de cartographie par séquençage permettent l'identification de mutations causales par comparaison directe de fréquences alléliques entre un pool d'individu présentant le phénotype d'intérêt et un pool d'individu référence. Cette stratégie a été validée chez des plantes modèles comme Arabidopsis (Hartwig *et al*. 2012; Schneeberger *et al.,* 2009) et le riz (Abe *et al*., 2011).

Clone ID[b]	Accession No.	SGN[a]		Annotation[c]	Fold Change E/L[d]	Adjusted *P* Value[e]
		Identifier	E Value			
Metabolism: lipid, fatty acid, and isoprenoid metabolism						
LE08BH05	AJ784564	U212736	0.0	Lipid transfer protein 2	28.34	1.46E-07
LE15AG03	AJ785357	U222218	0.0	Nonspecific lipid transfer protein	14.93	4.55E-06
LE12DB10	AJ785227	U217603	2.0E-128	Acetyl-CoA C-acyltransferase	5.75	1.39E-05
LE08BB02	AJ784516	U213809	0.0	GDSL-motif lipase/acylhydrolase	16.64	3.03E-06

Table 7 : Gènes reliés à la cuticule exprimés préférentiellement dans l'exocarpe de tomate (extrait de Lemaire-Chamley *et al.*, 2005)

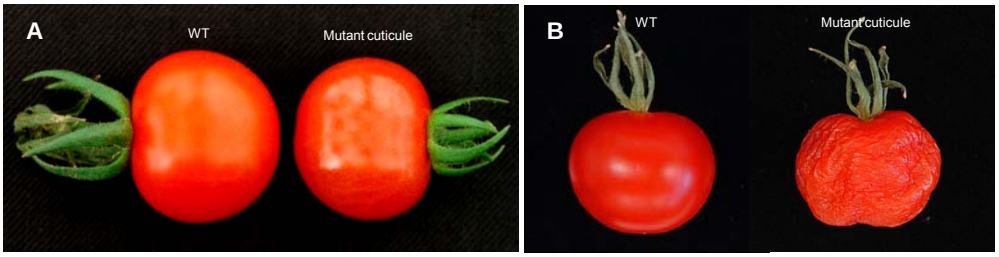


Figure 58 : Illustration des conséquences d'une déficience cuticulaire sur les propriétés agronomiques du fruit de tomate. A. Aspect de surface modifié chez le mutant, plus brillant qu'un fruit de type sauvage. B. Conservation du fruit 3 semaines à 28°C, le mutant résiste moins bien à la dessiccation qu'un fruit de type sauvage.

Présentation du travail de thèse

La principale question biologique travaillée par l'équipe « Génomique Fonctionnelle du Développement du Fruit », composante de l'UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie, est de savoir comment le développement précoce du fruit aura une incidence sur la composition et la qualité globale du fruit charnu. Il s'agit non seulement d'acquérir des connaissances sur des processus biologiques fondamentaux mais aussi de baliser pour les professionnels des voies potentielles d'amélioration de la qualité des fruits charnus.

Dans ce contexte, des analyses transcriptomiques ont été menées afin de comprendre si des changements dans les profils d'expression des gènes étaient associés à une spécialisation précoce des tissus de la tomate (Lemaire-Chamley *et al*., 2005). Ces analyses ont révélé l'importance des gènes liés à une fonction de protection au niveau des tissus de l'exocarpe, notamment un groupe de gènes liés à la synthèse de la cuticule (table 7). Un de ces candidats, une protéine lipase acylhydrolase à motif GDSL dont l'activité catalytique *in planta* et le rôle physiologique étaient encore inconnus, a été utilisé pour réaliser des transformants stables sur des tomates cerises var. West Virginia 106, en utilisant une stratégie RNA interférence (RNAi). Une collaboration mise en place avec l'unité INRA UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages de Nantes (département Caractérisation et Elaboration des Produits issus de l'Agriculture, CEPIA) a permis d'étudier les conséquences physiologiques, biochimiques et moléculaires de la perturbation de l'expression de *GDSL2*. Il a été montré que l'enzyme GDSL2 participe à la mise en place du polymère de cutine à la surface des cellules épidermiques, en intervenant dans l'estérification des monomères d'acylglycérol (Girard *et al*., 2012).

Cette étude a mis en évidence le potentiel de la tomate en tant que plante modèle pour étudier la cuticule. En effet, le fruit de tomate présente de nombreux avantages techniques comme la présence d'une cuticule épaisse, facile à prélever, une composition lipidique plus simple que celle d'Arabidopsis et comparable entre les organes végétatifs et reproducteurs. De plus, la collection de tomate Micro-Tom mutagénéisée à l'EMS est un réservoir de diversité génétique, idéal pour obtenir des mutants atteints dans les voies impliquées dans la formation de la cuticule. Il reste en effet beaucoup de mécanismes peu documentés dans la mise en place de la cuticule, notamment au niveau des transports des composés cuticulaires ou de la régulation de la voie. Enfin, la cuticule intervient dans les caractères agronomiques forts chez la tomate que sont la brillance du fruit et la finesse de la peau. Ces qualités sont recherchées par les sélectionneurs car elles améliorent l'attractivité de la tomate. En effet, l'aspect brillant du fruit permet d'améliorer l'attractivité visuelle du fruit (figure 58A) et dans le cas des tomates cerise, la finesse de la peau est un critère de qualité

chez les consommateurs, surtout chez les enfants, généralement rebutés par une peau épaisse. Dans le cas des tomates d'industrie, la finesse de la peau est aussi recherchée pour réduire la quantité de résidus de fabrication, pour tout ce qui concerne les concentrés ou les ketchups. A l'inverse, des peaux plus épaisses peuvent être recherchées pour améliorer l'extractibilité de l'exocarpe lors des procédés de transformation. La cuticule intervient aussi dans les propriétés de conservation des fruits et légumes car elle permet de limiter l'évaporation de l'eau à travers l'épiderme (figure 58B). Une cuticule moins imperméable peut, au contraire, faciliter certains processus de transformation visant à obtenir des tomates séchées.

La collection EMS Micro-Tom contient un grand nombre de mutants affectés plus ou moins sévèrement au niveau de leur surface, qui peuvent se révéler être des mutants cuticulaires (microfissures, fendillement, plissures, brunissement de l'épiderme, dessèchement, altération de la coloration…etc..). Les altérations fortes de la cuticule étant préjudiciables à la qualité des fruits, le choix s'est porté sur un critère d'importance agronomique, la variation de brillance du fruit, qui résulte probablement de changements plus subtils dans la composition, la structure ou les propriétés de la cuticule. La première partie du projet de thèse a consisté à sélectionner des mutants affectés au niveau de la brillance de leurs fruits, puis d'en analyser la cuticule afin de voir si sa composition lipidique était affectée. Une étude cytologique et morphologique de la cuticule a été menée sur certains mutants pour essayer de comprendre les relations entre brillance et composition de la cuticule. Par la suite, le mutant le plus affecté présentant la charge en cutine la plus faible a été analysé de façon plus poussée. L'accumulation de composés cuticulaires a été déterminée au cours du développement du fruit, ainsi que certaines propriétés physiologiques reliées à l'état de la cuticule (perméabilité, résistance à la dessiccation, épaisseur des cadres de cutine) nécessaires au phénotypage, la brillance se révélant un facteur délicat à quantifier et soumis aux variations des conditions environnementales. La mise en place d'une population F2 issue d'un croisement entre la variété M82 dwarf et le mutant Micro-Tom le plus affecté a permis de réaliser une cartographie de la mutation responsable de la variation du phénotype observé. Les analyses ont montré que ce mutant est un nouveau variant allélique du gène *SlGDSL2* étudié dans un travail précédent, *via* un transformant RNAi chez la variété WVa106.

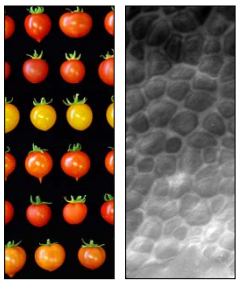
Ce travail a fait l'objet d'un article re-soumis à Plant Physiology en novembre 2013 (Chapitre 2, partie 1).

La deuxième partie de la thèse décrit les analyses réalisées sur 3 mutants remarquables issus du crible basé sur la brillance, le mutant P17F12 présentant le taux de

cutine le plus élevé des mutants de brillance sélectionnés, le mutant P30B6 et le mutant P23F12, des mutants aux taux de cutine faibles. Le mutant P17F12 a montré des propriétés étonnantes de conservation probablement liée aux modifications de compositions de sa cuticule. La parthénocarpie des fruits de ce mutant, dont les différents essais de pollinisation se sont montrés infructueux, a empêché de produire des graines et d'engendrer une descendance. L'étude des mutants P30B6 et P23F12 a montré que malgré leur composition cuticulaire proche, leurs propriétés de résistance à la dessiccation et leur niveau de perméabilité aux solutés étaient rigoureusement différents, suggérant des différences probables dans l'organisation de la structure de la cuticule. La cartographie des mutations des deux mutants déficients en cutine n'a pas permis d'identifier de gènes candidats. Dans le cas du mutant P30B6, différentes régions chromosomiques responsables de la variation quantitative des caractères de brillance, de résistance à la dessiccation, de perméabilité et de largeur de cadres de cutine ont été mises en évidence. Dans le cas du mutant P23F12, l'approche de cartographie a permis de désigner une région de 67,3 cM, située sur le chromosome 9, faiblement recombinante. Une stratégie basée sur le séquençage à haut débit a alors été mise en œuvre et une nouvelle population issue du croisement entre Micro-Tom type sauvage et le mutant P23F12 a été constituée. Un phénotypage basé sur la brillance a été réalisé et 2 pools de plantes ont été constitués, regroupant 1 pool de plantes les plus brillantes et 1 pool regroupant les plus mates. Un séquençage de l'ADN des 2 pools a été effectué dans le but de déterminer quels SNP sont associés spécifiquement au pool des plantes brillantes.

La troisième partie de la thèse décrit les travaux préliminaires destinés à mettre en place un ensemble de mutants affectant différents gènes qui permettra d'étudier les relations entre acteurs de la voie de biosynthèse et de transport de la cuticule. Des analyses d'expression de gènes reliés à la cuticule ont été réalisées sur des fruits à 20 JAA du mutant *gdsl2-b*, en mis en évidence des gènes liés à la biosynthèse de la cutine, au transport des composés cuticulaires et à leur régulation. De façon intéressante, indépendamment du fonds génétique et du mode d'extinction de *SlGDSL2*, l'expression d'un gène lié au transport des composés cuticulaires (non specific Lipid Transporter2, nsLTP2) est fortement réprimée, donnée obtenue également lors d'expériences similaires menées sur les transformants RNAi *SlGDSL2* (Girard *et al*., 2012). Les analyses d'expression menées sur les autres mutants cuticulaires dans la Chapitre 2 partie II de ce travail ont également confirmé que les expressions de *SlGSL2* et *SlnsLTP2* semblent co-régulées. De nombreuses études sur la co-expression de gènes révèlent des associations fonctionnelles potentielles entre gènes co-régulés (Ruprecht *et al*., 2011). De par sa localisation extra-cellulaire (Le *et al*., 2006) et sa capacité théorique à fixer du Palmitoyl-CoA (Tapia *et al*., 2013), le transporteur de lipides

nsLTP2 s'avère être un candidat au transport des monomères de cutine à travers l'apoplasme. La question se pose de savoir si la co-régulation potentielle existant entre ces 2 gènes est susceptible de révéler une association entre la GDSL Lipase, une enzyme de polymérisation de la cuticule et le nsLTP, un transporteur de monomères de cutine. Ce type d'association n'a pas encore été décrit et une analyse approfondie des 2 gènes et de leurs possibles interactions est nécessaire. Ainsi, une recherche par TILLING de mutants alléliques *SlnsLTP2* et *SlGDSL2* a été entreprise et des croisements ont été effectués entre ces mutants afin de générer des lignées double mutant *SlGDSL2* / *nsLTP2*. Un troisième mutant atteint au niveau du gène *SlCYP86A69*, codant pour une enzyme responsable de l'ω-hydroxylation des précurseurs de cutine a été isolé dans la collection EMS Micro-Tom (Shi *et al*., 2013). Ce mutant d'une étape clé de la biosynthèse de la cutine, a été utilisé pour créer des doubles mutants avec *SlnsLTP2* et *SlGDSL2*, afin d'évaluer les conséquences d'une mutation d'une étape précoce de la voie de synthèse de la cuticule sur le transport et la polymérisation de la cutine.



Partie I

L'analyse de mutants de tomate affectés au niveau de la brillance révèle des mutants avec un déficit en cutine, des mutants riches en cutine et un nouvel allèle hypormophique de *GDSL Lipase*

Chapitre 2 : Résultats & discussion

Partie I

L'analyse de mutants de tomate affectés au niveau de la brillance du fruit révèle des mutants avec un déficit en cutine, des mutants riches en cutine et un nouvel allèle hypormophique de *GDSL Lipase.*

La cuticule est la barrière extracellulaire située à l'interface entre la plante et son environnement. Cette couche protectrice de nature lipidique est synthétisée exclusivement par les cellules épidermiques et se compose d'un squelette de cutine et d'un mélange complexe de cires cuticulaires. Chez le fruit de tomate, la cuticule joue un rôle important dans un certain nombre de critères agronomiques, comme la limitation des pertes en eau non stomatiques, la résistance aux pathogènes, la prévention des fissurations de la surface du fruit, la conservation et la brillance du fruit.

Afin d'identifier des mutants de tomate présentant des cuticules à l'architecture ou à la composition modifiées et ainsi étudier les relations entre la brillance du fruit et la cuticule chez la tomate, une analyse d'une collection de mutants de tomates Micro-Tom mutagénéisées à l'EMS (éthyl méthanesulfonate) a été initiée. Cette collection est composée de 8500 familles dont 3500 ont été phénotypées, et l'ensemble des données a été intégré à une base de donnée interrogeable appelée Micro-Tom Mutant Database (MMDB). Une sélection de mutants a été effectuée *in silico* en utilisant les filtres suivants : fruits, couleur du fruit, épiderme et brillance. Près de 300 familles présentant des fruits brillants ont été recensées dans la base et un nouveau filtre a été appliqué pour ne sélectionner que 40 familles, ne présentant pas d'autre phénotype que la brillance des fruits. Sur ces 40 familles, 24 ont confirmé après semis que l'ensemble des fruits portés par la plante présentant un phénotype de brillance différentiel par rapport à un fruit Micro-Tom de type sauvage. Un total de 16 familles présentant des fruits brillants et 8 présentant des fruits mats ont été utilisées pour effectuer des analyses biochimiques et cytologiques, afin de déterminer l'origine des variations de brillance.

L'analyse de la composition en cutine et en cires de la cuticule a révélé que l'ensemble des candidats présentent des variations dans leurs profils cuticulaires, ce qui valide la pertinence du crible basé sur la brillance des fruits. Aucun mutant n'a montré de baisse du contenu en cires avec plutôt une tendance à la hausse de la charge en cires, 50% des individus testés présentant une augmentation significative par rapport aux valeurs du WT. Il est apparu que des mutants aux valeurs équivalentes en charge en cires présentent des profils de brillance opposés, suggérant que la quantité de cires n'est pas la variable

responsable de la brillance de la surface. Les analyses des cires ont également permis de mettre en évidence des mutants présentant des modifications de composition, comme des teneurs en triterpénoïdes augmentées. Ces mutants peuvent s'avérer être des outils de choix pour évaluer les conséquences de ces modifications biochimiques sur les propriétés de la cuticule.

Une analyse des monomères de cutine a révélé un gradient de teneur très large chez les mutants testés, avec des mutants présentant des déficiences très fortes (baisse de 75% de la teneur en cutine par rapport au type sauvage (Wild Type, WT) pour le mutant le plus affecté) ou au contraire des mutants avec une quantité accrue de cutine (augmentation de 100% chez le mutant le plus extrême). Une nouvelle fois, les données de quantités de cutine ne permettent pas d'expliquer la brillance, puisque les mutants brillants peuvent être soit déficient en cutine, soit présenter un gain. De plus, les mutants mats présentent des valeurs de charge en cutine identiques à certains mutants brillants et peuvent même présenter des charges significativement augmentées par rapport au WT. Ces analyses de cutine ont également permis de dégager des groupes de mutants aux compositions altérées, comme ceux ayant des quantités élevées d'acides dicarboxyliques, molécules peu représentées habituellement dans la cutine de tomate. Une nouvelle fois, ces mutants seront des candidats intéressants pour évaluer les effets potentiels de ces composés dans les propriétés de la cuticule.

Des analyses cytologiques de la cuticule des mutants les plus représentatifs ont été menées afin de déchiffrer les relations existant entre quantité et/ou composition de la cuticule, structure et brillance. Des analyses histologiques puis des observations en microscopie photonique ont permis de montrer que la relation entre quantité de monomères et épaisseur de cutine n'était pas linéaire. Les mutants à faible teneur en cutine présentent des squelettes de cutine plus fins que le fruit de type sauvage mais les mutants à taux élevés ne sont pas caractérisés par des cutines significativement plus épaisses que le WT. Un degré de réticulation modifié pourrait expliquer ce phénomène. Ces analyses ont révélé également que les mutants mats semblent présenter des altérations du nombre et de la morphologie des cellules épidermiques. Les analyses en microscopie électronique à balayage de type environnemental (ESEM) ont permis de dresser une topographie de la surface des mutants suivant leur charge en cires et en cutine. Elles ont montré que la surface du polymère de cutine semble être l'élément clé de la brillance. Alors qu'un fruit de type sauvage présente un squelette de cutine avec des reliefs autour des cellules épidermiques, un mutant déficient en cutine montre un polymère aux cadres de cutine fins et peu prononcés et un mutant à la charge en cutine élevée présente au contraire des cadres noyés dans la cutine. Une fois les cires en place, ces 2 types de mutants présentent une

surface parfaitement lisse, à la différence d'une cuticule de type sauvage. Les cadres de cutine et les cellules épidermiques du WT forment des massifs réguliers, conduisant à une réflexion de la lumière plus diffuse, d'où une brillance plus faible.

L'identification de la mutation provoquant le phénotype de P15C12, le mutant le plus déficient en cutine, a été menée par une approche de cartographie. Une population F2 issue du croisement entre P15C12 et M82 dwarf a été générée puis les fruits des individus ont été phénotypés en utilisant 4 critères, la brillance de la surface, la perméabilité de la cuticule à l'entrée de solutés, la résistance à la dessiccation et la mesure de largeur des cadres de cutine. Ces données phénotypiques ont été couplées à une analyse de génotypage utilisant 48 marqueurs polymorphes entre M82 et Micro-Tom, répartis régulièrement sur les chromosomes. Comme la brillance est un caractère composite dont le contrôle génétique est complexe, et que la population de cartographie était issue du croisement de deux génotypes différant par leur cuticule et leur brillance, la recherche de la région chromosomique portant la mutation s'est faite par analyse de Quantitative Trait Loci ou QTL, qui vise à identifier la où les régions chromosomiques contrôlant la variation quantitative d'un caractère, en l'occurrence la brillance. Dans le cas de la population étudiée, où l'effet de la mutation est fort, un QTL majeur correspondant à la mutation doit être détecté. Effectivement, cette analyse a permis de mettre en évidence un QTL majeur basé sur le bras supérieur du chromosome 11. Un tri *in silico* de données de transcriptome issues d'une analyse sur tissus isolés après microdissection laser a permis d'établir une liste des gènes exprimés de façon spécifique dans l'épiderme externe du fruit de tomate (Matas *et al*., 2011). La séquence et la position de chacun de ces gènes sur les chromosomes a pu être obtenue. A partir de ces données, 2 gènes candidats spécifiques de l'épiderme externe et colocalisant avec le QTL sur le chromosome 11 ont été sélectionnés, correspondant à un gène codant pour une cytochrome P450 de type CYP77 et un gène codant pour une enzyme lipase/hydrolase à motif GDSL. Le séquençage de ces 2 gènes a été réalisé sur le mutant P15C12 et une mutation d'une adénine vers une thymine a été détectée au niveau d'un site d'épissage du gène *SlGDSL2*. Cette mutation provoque la perte du site d'épissage côté 3' de l'intron 4 de *SlGDSL2*, ce qui conduit à l'accumulation de 2 types distincts d'ARNm : un ARNm non épissé de l'intron 4 et un ARNm résultant de l'utilisation par le splicéosome d'un site d'épissage cryptique localisé du côté 5' de l'exon 5. Dans les 2 cas, la prédiction de traduction de ces ARNm montre des protéines tronquées de taille proche. L'analyse des transcrits de *SlGDSL2* en temps réel montre un niveau d'expression significativement plus faible dans les cellules épidermiques de fruits à 20 JAA chez *gdsl2-b* que chez le WT. De plus, la protéine SlGDSL2 n'est pas immunodétectée dans l'épicarpe du mutant, suggérant que le système de dégradation médié par les ARN non sens reconnait et dégrade les ARNm

aberrants, évitant ainsi la production de protéines tronquées susceptibles d'avoir des effets néfastes pour la plante.

Des approches de génétique inverse basées sur le crible de collections de mutants de tomate ou sur des stratégies de RNA interférence sur de la tomate cerise (Girard *et al*, 2012;. Yeats *et al.*, 2012a) ont récemment prouvé que SlGDSL2 joue un rôle clé dans l'assemblage des monomères de cutine, en tant qu'acyltransférase, pour former le polyester de cutine dans la cuticule (Yeats et Rose, 2013). Le nouveau variant allélique isolé chez *gdsl2-b* permettra de préciser le rôle *in planta* des GDSL lipases, en comparant les fonctions de ces enzymes dans la polymérisation du squelette de cutine dans différents fonds génétiques (des tomates cultivées *S. lycopersicum* comme M82 et Micro-Tom ou des tomates cerises *S. lycopersicum* var. *cerasiformae* WVa 106).

Ce travail illustre l'intérêt et le potentiel des mutants de tomate affectés au niveau de la brillance pour améliorer les connaissances sur la formation de la cuticule chez les plantes. La tomate se révèle être un modèle parfaitement adapté à l'étude de la cuticule, de par son épaisseur importante facilitant son prélèvement et ses compositions équivalentes entre les tissus. De plus, l'existence de mutants aux compositions en cires ou en cutine modifiées va permettre d'approfondir les relations entre compositions et propriétés de la cuticule.

D'un point de vue plus général, cette approche de génétique directe montre l'intérêt d'une collection de mutants phénotypés, permettant d'obtenir rapidement des familles de mutants pour un caractère d'intérêt donnée. Cette ressource couplée aux nouvelles technologies de séquençage et de génotypage à haut débit, devrait permettre d'accélérer les avancées sur la compréhension des mécanismes complexes liés au développement des fruits.

Analyses of Tomato Fruit Brightness Mutants Uncover Both Cutin-Deficient and Cutin-Abundant Mutants and a New Hypomorphic Allele of *GDSL Lipase*[C][W][OPEN]

Johann Petit, Cécile Bres, Daniel Just, Virginie Garcia, Jean-Philippe Mauxion, Didier Marion, Bénédicte Bakan, Jérôme Joubès, Frédéric Domergue, and Christophe Rothan*

Institut National de la Recherche Agronomique and Université de Bordeaux (J.P., C.B., D.J., V.G., J.-P.M., C.R.), Unité Mixte de Recherche 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France; Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages, Institut National de la Recherche Agronomique, F-44316 Nantes, France (D.M., B.B.); Laboratoire de Biogénèse Membranaire, Université de Bordeaux, UMR5200, F-33000 Bordeaux, France (J.J., F.D.); and Laboratoire de Biogénèse Membranaire, Unité Mixte de Recherche 5200, Centre National de la Recherche Scientifique, F-33000 Bordeaux, France (J.J., F.D.)

The cuticle is a protective layer synthesized by epidermal cells of the plants and consisting of cutin covered and filled by waxes. In tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit, the thick cuticle embedding epidermal cells has crucial roles in the control of pathogens, water loss, cracking, postharvest shelf-life, and brightness. To identify tomato mutants with modified cuticle composition and architecture and to further decipher the relationships between fruit brightness and cuticle in tomato, we screened an ethyl methanesulfonate mutant collection in the miniature tomato cultivar Micro-Tom for mutants with altered fruit brightness. Our screen resulted in the isolation of 16 *glossy* and 8 *dull* mutants displaying changes in the amount and/or composition of wax and cutin, cuticle thickness, and surface aspect of the fruit as characterized by optical and environmental scanning electron microscopy. The main conclusions on the relationships between fruit brightness and cuticle features were as follows: (1) screening for fruit brightness is an effective way to identify tomato cuticle mutants; (2) fruit brightness is independent from wax load variations; (3) *glossy* mutants show either reduced or increased cutin load; and (4) *dull* mutants display alterations in epidermal cell number and shape. Cuticle composition analyses further allowed the identification of groups of mutants displaying remarkable cuticle changes, such as mutants with increased dicarboxylic acids in cutin. Using genetic mapping of a strong cutin-deficient mutation, we discovered a novel hypomorphic allele of GDSL lipase carrying a splice junction mutation, thus highlighting the potential of tomato brightness mutants for advancing our understanding of cuticle formation in plants.

The epidermis of all aerial plant organs is covered with an extracellular layer, the cuticle, which is synthesized by the epidermal cells. The cuticle is localized on the outer face of primary cell walls and is largely composed of cutin embedded with polysaccharides, filled with intracuticular waxes, and covered with a thin layer of epicuticular waxes (Nawrath, 2006). Cutin is a polyester of glycerol, hydroxy, and epoxy fatty acids; in most species, the main cutin monomers are C16 and C18 ω-hydroxy fatty acids (Pollard et al., 2008). Besides cutin, another lipid polyester named suberin typically also contains α,ω-dicarboxylic acids, hydroxycinnamic acids, and fatty alcohols. Suberin forms a hydrophobic layer in cell walls of specific plant organs (e.g. roots and seeds) or is synthesized in response to stress (Pollard et al., 2008). Waxes are a mixture of very long chain fatty acids (VLCFAs) (C24 to C34) and their derivatives (e.g. alkanes, aldehydes, primary and secondary alcohols, ketones, or esters) and occasionally include triterpenoids and phenylpropanoids (Kunst and Samuels, 2009).

In recent years, availability of the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) genome sequence, high-throughput gene expression analysis tools, and mutant collections enabled deciphering the biosynthetic pathways and transport networks involved in cutin, suberin, and wax biosynthesis (Pollard et al., 2008; Li-Beisson et al., 2009; Beisson et al., 2012; Yeats and Rose, 2013). The synthesis of the cutin monomer starts with the synthesis of long chain fatty acids in the plastids. Fatty acids are then transported to the cytoplasm where they undergo a series of modifications, including the activation to CoA thioesters by long chain acyl-CoA synthetases, oxidation by cytochrome P450 (CYP)–dependent fatty acid oxidases, and esterification to glycerol-based acceptors by glycerol-3-phosphate acyl transferases to produce acyl-glycerols (Pollard et al., 2008; Li-Beisson et al., 2009). Although the sequential order of the reactions remains to be determined, the implication of several

*Address correspondence to christophe.rothan@bordeaux.inra.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: Christophe Rothan (christophe.rothan@bordeaux.inra.fr).

[C] Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

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

[OPEN] Articles can be viewed online without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.232645

 © 2013 American Society of Plant Biologists. All Rights Reserved.
Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

long chain acyl-CoA synthetases, CYP86A, CYP77A, and glycerol-3-phosphate acyl transferases in cutin biosynthesis has been confirmed in Arabidopsis. Mechanisms of transport of the cutin monomers and their assembly into the cuticle remain largely unknown. The plasma membrane ATP-binding cassette transporters have been implicated in the transport of both wax and cutin to the apoplast, whereas lipid transfer proteins very likely contribute to the transport of cutin monomers through the cell wall to the cutin layer (Yeats and Rose, 2013). The implication of enzymes of the GDSL lipase family in cutin assembly, which is long suspected (Reina et al., 2007; Mintz-Oron et al., 2008), was recently demonstrated in tomato (*Solanum lycopersicum*; Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012a).

Molecular genetic studies were also of considerable help in the recent identification of key proteins in suberin and wax biosynthesis. The same gene families as for cutin likely contribute to suberin formation (Franke et al., 2012), which also includes specific steps such as fatty acid elongation involving β-keto acyl-CoA synthases and primary alcohol synthesis implicating fatty acyl reductases (Domergue et al., 2010). Likewise, several major enzymes of wax biosynthesis were only recently identified (Bernard and Joubès, 2013). Wax biosynthesis involves several steps including the synthesis of VLCFAs through a multi-enzyme fatty acid elongase complex and the synthesis of VLCFA derivatives through either the alcohol-forming pathway, which gives rise to primary alcohols and wax esters, or the alkane-forming pathway producing aldehydes, alkanes, secondary alcohols, and ketones. Export of wax through plasma membrane occurs via ATP-binding cassette transporters and glycosylphosphotidylinositol-anchored lipid transfer proteins (Kunst and Samuels, 2009; Yeats and Rose, 2013).

Coordinated regulation of metabolic pathways controlling cuticle formation has been demonstrated for transcription factors of the SHINE/WAX-INDUCER family (Aharoni et al., 2004; Broun et al., 2004) and recently for MIXTA-like myeloblastosis (MYB) transcription factors (Oshima et al., 2013). Several of their downstream targets involved in cutin synthesis, modification, and assembly, as well as in cell wall formation and structure and in epidermal cell patterning (Shi et al., 2013), have been identified. Other transcription factors of the MYB protein family, Homeodomain-leucine-zipper (HD-ZIP) IV family, and WW domain protein were shown to control cuticle formation, some of which and were suggested to take part in a regulatory network controlling epidermal cell patterning (Yeats and Rose, 2013).

Despite these advances and technological developments, much remains to be determined regarding the regulation, synthesis, assembly, and structure of the cuticle and their influence on cuticle properties. The thick and easy-to-isolate peel from tomato has long been used for studying the biomechanical properties of plant cuticle (Domínguez et al., 2011). In recent years, the increased availability of tomato genomic resources, including saturated genetic linkage maps, markers, and very recently the tomato genomic sequence (Tomato Genome Consortium, 2012), offered unprecedented possibilities for exploiting tomato as a model for studying plant cuticle (Hovav et al., 2007; Adato et al., 2009; Isaacson et al., 2009; Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012b; Shi et al., 2013). To fully explore the relationships between cuticle composition and cuticle properties and to discover new genes and functions, new sources of genetic variability affecting tomato genes involved in wax, cutin, and suberin synthesis and regulation are required.

In this study, we focused on tomato cuticle mutants identified through screening for fruit brightness (glossy or dull fruits) in a tomato ethyl methanesulfonate (EMS) mutant collection in the miniature cultivar Micro-Tom. Up to 24 tomato fruit cuticle mutants with modified fruit brightness but no otherwise major plant or fruit phenotypic changes were selected. Cytological and biochemical analyses revealed that mutant fruit with altered brightness displayed wide variations in cutin load and composition and in epidermal patterning. Only few changes in wax composition and increases in wax load were observed. Fruit brightness modifications could not be attributed to a single cause but rather to combinations of various and sometimes opposite alterations of fruit cuticle. We further identified the mutation underlying a *glossy* cutin-deficient mutant by genetic mapping of the corresponding cuticle-associated traits and discovered a novel allele of the tomato GDSL lipase involved in cutin polymerization (Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012b). Thus, our study highlights how the exploitation of artificially induced genetic diversity and of genomic tools currently available in tomato can efficiently contribute to the study of cuticle biosynthesis and properties in plants.

RESULTS

Screening a 'Micro-Tom' EMS Mutant Collection for Plants with Altered Fruit Brightness

Analysis of cuticle formation and properties using reverse genetic approaches may be hampered by other modifications of plant and fruit physiology often induced in strong cuticle mutants. In this study, we chose to focus on mild tomato fruit cuticle mutants displaying no obvious phenotypic alterations such as dwarfism, wilting, or organ fusion in plants or large cracks, multiple microcracks (russeting), and strong water loss in fruit. Toward this end, the criterion we used for selecting tomato mutants was fruit brightness, the variation of which results from milder modification of fruit surface. In addition, thin cuticle and glossy fruit appearance associated with adequate postharvest shelf-life and absence of fruit defects are among the desirable breeding traits for several types of fresh-market tomatoes.

The tomato mutant collection used was an EMS mutant population generated in the miniature cultivar Micro-Tom by our group (Rothan and Causse, 2007; Just et al., 2013). The collection comprises approximately

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

3,500 highly mutagenized mutant families thoroughly phenotyped (12 plants per M2 families) for approximately 150 plant and fruit phenotypic criteria ranged in categories and subcategories. All of the phenotypic data are compiled and stored in a dedicated web-searchable database called the MicroTom Mutant Database. Selection of fruit brightness mutants was done using requests centered on the fruit (category: fruit; subcategories: color, epidermis, and brightness [i.e. fruit glossier or duller than the wild-type control]). Strong fruit cuticle/color mutants, such as the *slcyp86a9* cuticle synthesis mutant recently identified from the same 'Micro-Tom' mutant collection (Shi et al., 2013), were excluded from the analysis. As shown in Figure 1, the first query using these criteria resulted in the identification of 274 mutant families. Taking into account additional criteria such as the presence/absence of other gross plant and fruit phenotypic alterations and the previous confirmation (or not) of the observed fruit brightness phenotypes in independent cultures of the retained M2 families allowed the final selection of 40 mutant families.

For each selected family, 24 plants were grown in a greenhouse. Visual evaluation of fruit brightness was done for each plant of each family on fruits at Red Ripe (RR) stage compared with wild-type fruits (Supplemental Table S1). In the M2 families studied, which segregates for the EMS-induced mutations, a plant was considered as a fruit brightness mutant when all of the fruits on that plant displayed the glossy or dull trait. Previous fruit brightness phenotypic annotation (dull or glossy fruit) was confirmed for 20 families (i.e. at least one plant in the family showing uniformly dull or glossy fruits), whereas 7 families displayed fruit brightness phenotypes opposite to those previously observed. In addition, two displayed both dull/glossy fruits on the same plants and 11 did not show any visual difference with the wild-type fruits. We finally selected the 20 confirmed mutant families plus 4 families displaying fruit brightness phenotypes opposite to those previously observed (i.e. one plant with dull or glossy fruits for each of the selected families). Among these 24 fruit brightness mutant plants, 16 were *glossy* mutants and 8 were *dull* mutants (Supplemental Figure S1).

Cuticle Is Altered in Fruit Brightness Mutants That Display Remarkable Changes in Cutin Load and Composition

To investigate whether variations in fruit brightness could be associated with quantitative and/or qualitative differences of cuticle, we analyzed wax and cutin load and composition of RR fruits (approximately 45 d postanthesis [DPA]) collected on the 24 selected mutant lines.

Both the *glossy* and *dull* mutants exhibited a wide range of variation in wax (identified compounds) load (Fig. 2; Table I). For up to 50% of the mutants, no significant differences in cuticular wax load were observed relative to the wild type (Fig. 2). Remarkably, the *glossy* and *dull* mutants displaying wax load variation all showed an increase in wax load compared with the wild type. However, whereas the *glossy* mutants showed a gradual variation in wax load from approximately 6 $\mu g/cm^2$ (i.e. close to wild-type values) to 13.5 $\mu g/cm^2$, most of the *dull* mutants had similar wax loads (7.6 to 9 $\mu g/cm^2$) with the exception of one (P6D6 mutant; 13.1 $\mu g/cm^2$). When we took into account the unidentified wax compounds, which represent 17% of the total wax in the wild type and up to 40% in the P4E2 mutant, similar variations were observed (data not shown).

As shown in Table I, the compounds identified in the chloroform-soluble wax from the Micro-Tom cultivar are mainly made up of alkanes, which represent more than 60% of the wax, triterpenoids (α-, β-, and δ-type amyrin; approximately 18%), isoalkanes (7% to 8%), and alcohols (approximately 3% to 4%). Although changes in alkane and in wax load showed the same trend in most mutants, several mutants showed remarkable modifications of wax composition. Amyrins increased to 29% to 33% of total wax load in the P17F12 and P23F12 *glossy* mutants and to almost 30% in the P6D6 *dull* mutant. Alcohols increased to 7% to 12% in the P11H2 and P4E2 *glossy* mutants, respectively. In conclusion, most fruit brightness mutants displayed no or slight variations in wax load and *glossy* mutants could not be distinguished from *dull* mutants based only on single wax analysis.

A wider range of variation was observed for cutin (identified compounds) load among the mutants (Fig. 3;

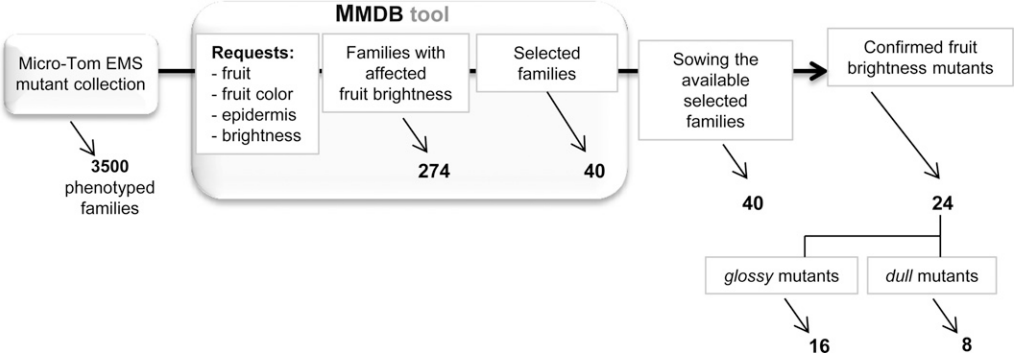


Figure 1. Strategy used for the selection of the fruit brightness tomato mutants through the MicroTom Mutant Database (MMDB) tool. Visual selection of fruit brightness mutants was done in comparison with wild-type fruits at the RR stage.

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

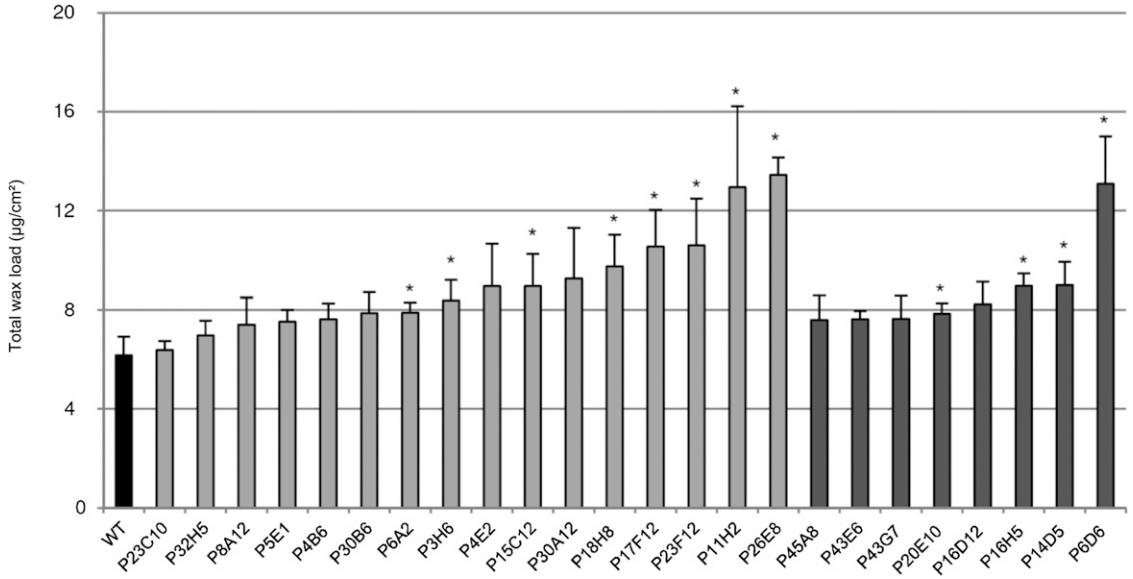


Figure 2. Total wax load in fruit cuticle from the wild type (WT) and selected tomato mutants. Mean values (in micrograms per square centimeter) are given with SD ($n = 4$). Unidentified compounds are not included. Black bar, Wild type; light gray bar, *glossy* mutants; dark gray bar, *dull* mutants. Asterisk indicates significant difference from wild-type fruit (*t* test, $P < 0.01$).

Table II). Again, as for wax load, the *dull* mutants displayed fewer variations than the *glossy* mutants, with the larger variations in cutin load in these mutants being a 60% increase (P16H5) relative to the wild type. By contrast, *glossy* mutants exhibited large disparities between the most extreme phenotypes (Supplemental Fig. S2). Both strong reductions (down to 15% of the wild type) and increases (up to 220% of the wild type) in cutin load were observed, unlike wax load. The residual cutin loads of the three most affected *glossy* mutants were 84.1 $\mu g/cm^2$ (P15C12), 162.6 $\mu g/cm^2$ (P23F12), and 285 $\mu g/cm^2$ (P30B6), which is below the wild type load of 586.1 $\mu g/cm^2$. By contrast, up to five *glossy* mutants displayed significant increases in cutin load, which ranged from approximately 722.9 $\mu g/cm^2$ (P4B6) to 1175.5 $\mu g/cm^2$ (P17F12). As in other tomato cultivars described to date (Mintz-Oron et al., 2008; Girard et al., 2012; Nadakuduti et al., 2012), cutin monomers are mostly made up of polyhydroxy fatty acids (65%, with 9,16-dihydroxy-palmitic acid representing 95% of the total) and ω-hydroxy fatty acids (11%), and in lesser amounts by fatty acids (approximately6%) and dicarboxylic acids (approximately 5%) (Table II). Whereas changes in cutin load were usually paralleled by similar changes in the various classes of cutin monomers, several *glossy* mutants displayed remarkable and specific patterns of accumulation of cutin monomers. Indeed, further exploration of the cutin composition data by principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA) revealed groups of mutants displaying similar cutin composition changes (Fig. 4). The first principal component (PC1) explaining 53% of the total variability clearly separated three clusters on the positive side and one cluster on the negative side. The second principal component (PC2) explaining 23% of the total variability separated two clusters on the positive side and two clusters on the negative side. A bulk of eight mutants, either *dull* or *glossy*, was not separated by the principal components PC1 and PC2 and were aggregated within the wild-type cluster.

Examination of PC1 and PC2 loadings (Supplemental Fig. S3) allowed the identification of cutin monomers responsible for cutin modifications in the various mutants. On the positive side of PC1 and PC2, the primary alcohols and 2-hydroxy fatty acids and the dicarboxylic acids discriminated the P17F12 *glossy* mutant and the P5E1/P26E8 cluster of *glossy* mutants. The P17F12 mutant, in which the total cutin load is increased by more than 2-fold, exhibited a 30-fold enhancement of 2-hydroxy fatty acids, which increased from trace amounts in the wild type (6.6 $\mu g/cm^2$) to approximately 16% of the total cutin monomers in the mutant (approximately 201 $\mu g/cm^2$). The dicarboxylic acid contents were strikingly similar between the P5E1 and P26E8 mutants and increased from approximately 32 $\mu g/cm^2$ in the wild type to 134 to 139 $\mu g/cm^2$ in the mutants. Another remarkable cluster groups the strong cutin-deficient mutants that are similarly affected for all cutin monomers (e.g. the P15C12 and the P23F12 mutants clustered on the negative side of PC1). On the positive side of PC1 and negative side of PC2, the polyhydroxy fatty acids, ω-hydroxy fatty acids, fatty acids, and cinnamic acid compounds were discriminating the P30A12/P18H8 cluster of *glossy* mutants. These mutants also accumulate large amounts of cutin monomers (X 1.6). However, in contrast to P17F12, their 2-hydroxy fatty acids content is similar to that of the wild type (Table II). Finally, a cluster discriminated on the negative side of PC2 groups

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Table I. *Wax composition of fruit cuticle from the wild type and selected tomato mutants*

Mean values (in micrograms per square centimeter × 10) of total wax load and of individual compounds ($n = 4$). The percentage of total wax load is indicated for individual compounds. Unidentified compounds are not included in the table.

Plant	Total Identified Load	*n*-Alkanes		Isoalkanes		Alcohols		Amyrins		Fatty Acids	
	Mean ± SD	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%
Wild type	61.7 ± 7.5	42.0 ± 4.7	68.0	4.7 ± 0.9	7.6	2.1 ± 0.5	3.4	11.0 ± 2.4	17.8	2.0 ± 0.5	3.3
Glossy											
P23C10	63.8 ± 3.6	41.4 ± 1.0	65.0	3.4 ± 0.1	5.4	1.5 ± 0.3	2.3	15.4 ± 3.5	24.2	2.0 ± 0.3	3.2
P32H5	69.8 ± 5.9	45.1 ± 4.0	64.6	5.4 ± 1.1	7.8	2.5 ± 0.2	3.6	13.3 ± 0.9	19.0	3.5 ± 1.1	5.0
P8A12	74.1 ± 10.9	44.6 ± 6.5	60.2	5.2 ± 0.7	7.0	2.9 ± 0.2	3.9	18.6 ± 4.1	25.1	2.8 ± 0.6	3.8
P5E1	75.3 ± 4.7	52.9 ± 3.2	70.2	5.4 ± 0.3	7.2	2.5 ± 0.2	3.3	10.5 ± 0.9	13.9	4.1 ± 0.6	5.4
P4B6	76.3 ± 6.3	49.9 ± 3.8	65.4	5.1 ± 1.0	6.7	2.5 ± 0.7	3.3	15.3 ± 0.6	20.1	3.4 ± 1.2	4.5
P30B6	78.8 ± 8.4	51.7 ± 5.5	65.6	4.3 ± 0.2	5.5	2.5 ± 0.6	3.2	18.1 ± 4.0	23.0	2.2 ± 0.2	2.7
P6A2	78.9 ± 4.2	47.4 ± 3.0	60.1	6.8 ± 0.2	8.6	3.6 ± 0.7	4.6	18.9 ± 4.7	23.9	2.2 ± 0.5	2.8
P3H6	83.9 ± 8.1	54.0 ± 6.0	64.4	5.6 ± 0.4	6.7	3.3 ± 1.0	3.9	19.0 ± 1.7	22.6	2.0 ± 0.7	2.4
P4E2	89.5 ± 17.1	58.7 ± 11.6	65.6	5.1 ± 1.3	5.7	10.6 ± 3.5	11.8	13.1 ± 2.6	14.6	2.1 ± 0.5	2.3
P15C12	89.6 ± 12.9	53.8 ± 8.8	60.1	5.8 ± 1.0	6.5	3.0 ± 1.1	3.4	25.9 ± 2.5	28.9	1.1 ± 0.4	1.2
P30A12	92.5 ± 20.5	61.0 ± 9.6	66.0	5.0 ± 1.0	5.4	3.8 ± 1.1	4.1	20.1 ± 9.0	21.7	2.7 ± 0.4	2.9
P18H8	97.6 ± 12.7	67.2 ± 8.4	68.8	4.8 ± 0.4	4.9	3.2 ± 0.0	3.3	20.4 ± 4.7	20.9	2.0 ± 0.2	2.1
P17F12	105.4 ± 14.9	62.2 ± 3.9	59.0	5.4 ± 0.9	5.1	4.4 ± 0.9	4.2	31.0 ± 10.5	29.4	2.4 ± 0.9	2.3
P23F12	106.0 ± 18.9	61.7 ± 11.3	58.2	5.7 ± 0.6	5.3	2.5 ± 0.6	2.4	34.6 ± 7.1	32.6	1.5 ± 0.4	1.4
P11H2	129.5 ± 32.8	84.0 ± 23.8	64.9	9.1 ± 1.4	7.0	9.3 ± 3.8	7.2	22.7 ± 5.4	17.5	4.4 ± 1.4	3.4
P26E8	134.5 ± 7.0	91.4 ± 5.0	68.0	5.4 ± 1.4	4.0	7.4 ± 2.0	5.5	27.0 ± 2.9	20.1	3.2 ± 0.5	2.4
Dull											
P45A8	76.0 ± 9.8	44.0 ± 2.0	57.9	7.3 ± 1.4	9.6	2.2 ± 0.1	2.9	20.5 ± 6.5	26.9	2.1 ± 0.5	2.7
P43E6	76.3 ± 3.3	51.9 ± 2.9	68.0	7.3 ± 0.7	9.5	3.0 ± 0.2	3.9	11.6 ± 0.5	15.1	2.7 ± 0.3	3.5
P43G7	76.4 ± 9.2	47.4 ± 5.2	62.1	8.4 ± 2.5	10.9	2.5 ± 1.1	3.2	14.8 ± 2.1	19.4	3.4 ± 0.5	4.4
P20E10	78.5 ± 4.2	56.7 ± 4.7	72.2	6.4 ± 1.6	8.2	1.4 ± 0.1	1.8	12.0 ± 1.1	15.2	2.0 ± 0.2	2.5
P16D12	82.4 ± 8.9	55.0 ± 10.0	66.7	9.0 ± 2.1	10.9	2.2 ± 0.2	2.7	13.5 ± 1.4	16.4	2.6 ± 0.3	3.2
P16H5	89.6 ± 5.0	56.2 ± 2.3	62.7	7.0 ± 0.6	7.8	2.8 ± 0.1	3.1	21.8 ± 2.4	24.4	1.8 ± 0.2	2.0
P14D5	89.9 ± 9.4	57.4 ± 5.3	63.8	8.4 ± 1.9	9.3	2.9 ± 0.4	3.3	19.1 ± 1.8	21.2	2.1 ± 0.4	2.4
P6D6	130.8 ± 19.2	75.6 ± 8.5	57.8	10.1 ± 3.6	7.7	3.3 ± 1.2	2.5	39.5 ± 6.0	30.2	2.2 ± 0.5	1.7

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

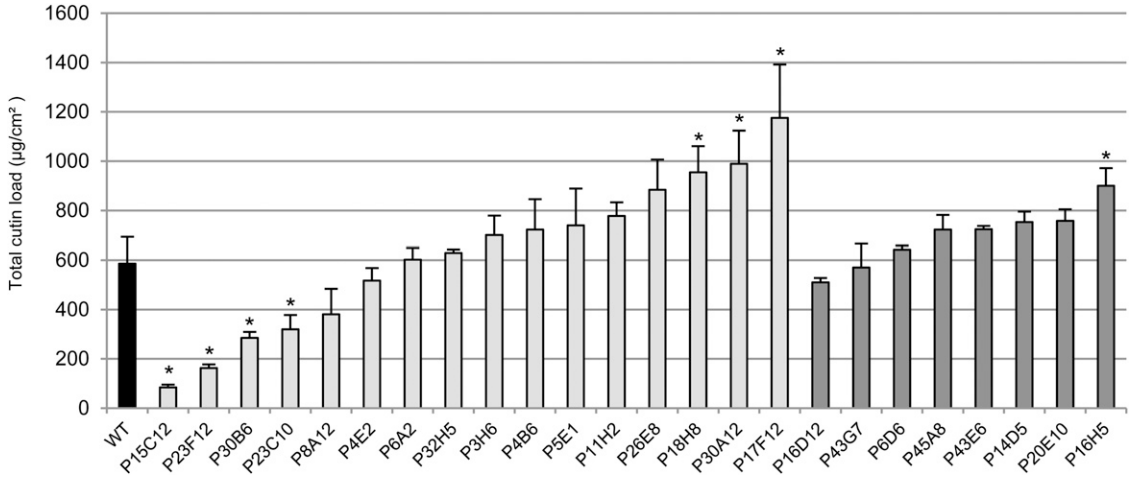


Figure 3. Total cutin load in fruit cuticle from the wild type (WT) and selected tomato mutants. Mean values (in micrograms per square centimeter) are given with SD ($n = 4$). Unidentified compounds are not included. Black bar, Wild type; light gray bar, *glossy* mutants; dark gray bar, *dull* mutants. Asterisk indicates significant difference from wild-type fruit (*t* test, $P < 0.01$).

several *dull* and *glossy* mutants with moderate to large changes in cutin load.

Thus, although cutin is altered in most *dull* and *glossy* mutants, no obvious link could be made between fruit cutin load and/or composition and fruit brightness, as already observed for waxes. Moreover, glossy mutants can show either strong deficiencies (e.g. P15C12) or increases (e.g. P17F12) in cutin load (Fig. 3). To further explore the possible effect of wax and cutin covariations on fruit brightness, we combined the biochemical (wax and cutin composition and load) and phenotypic data and analyzed them by HCA (Supplemental Figs. S4 and S5). However, as for cutin alone, no obvious relationships could be found between cutin and wax variations and the dull or glossy aspect of the fruit.

Epidermal and Cuticle Architecture Affects Fruit Brightness

To obtain additional insight into the relationships between fruit brightness and cuticle, we selected three groups of mutants according to cutin monomer and/or wax load of the fruits and further characterized them by optical and scanning electron microscopy. Among these were *glossy* mutants with high cutin load (P18H8 and P17F12) and low cutin load (P23F12 and P15C12) and *dull* mutants with either high cutin load (P16H5) or high wax load (P6D6) (Fig. 5A). As expected, *glossy* mutants with low cutin load exhibited very thin cuticles compared with the wild type, with cuticle thickness reduced by approximately 49% and 67% for P23F12 and P15C12, respectively (Fig. 5, D and E). Surprisingly, cuticle thickness was very similar between wild-type fruits and *glossy* mutants with high cutin loads, despite the strong difference in cutin load between these mutants and the wild type (60% to 120% more cutin in P18H8 and P17F12, respectively). Examination of exocarp sections indicated that neither tissue structure nor epidermal cell size and shape were affected in these *glossy* mutants (data not shown). *Dull* mutants did not show any significant difference in cuticle thickness relative to the wild type but both high cutin and high wax *dull* mutants displayed distinctive morphological alterations of the cuticle-encased epidermal cells, which appeared less elongated and more conical-shaped than in the wild type and other mutants.

When examined under environmental scanning electron microscopy (ESEM), native fruit surface from glossy mutants with low cutin load mutants looked much smoother than that of the wild-type fruits, which showed more irregular surface with small domes (Fig. 5B). By contrast, fruit surface from dull mutants was rough and entirely covered with circular-shaped, dome-like structures, in agreement with optical microscopy observations (Fig. 5D). These differences appeared even more clearly when epicuticular waxes were removed from cuticle by treatment with chloroform (Fig. 5C). Cutinized epidermal cell walls were clearly visible in the wild type, whereas the surface of high cutin load *glossy* mutants remained remarkably smooth with no (P18H8) or very few (P17F12) surface irregularities. In contrast, de-waxing low cutin load *glossy* mutants revealed very thin-walled epidermal cells underneath the cuticle proper, with no cutin deposit on top of these cells unlike the wild type. De-waxing did not change the surface aspect of the dull fruits, although the dome-like structures that correspond to epidermal cells (Fig. 5D) were even more apparent. Their quantification clearly indicates that the fruit epidermal cell number is increased by 66% to 122% in the *dull* mutants (Supplemental Table S2). Together, these observations suggest that both the cuticle and the development of the epidermis are altered in dull fruit mutants. By contrast, only the cuticle is

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Table II. *Cutin monomer composition of fruit cuticle from the wild type and selected tomato mutants*

Mean values (in micrograms per square centimeter) of total cutin load and of individual compounds ($n = 4$). Unidentified compounds are not included in the table. The percentage of total cutin load is indicated for individual compounds. ND, not detected.

Plant	Total Load	Fatty Acids		Dicarboxylic Acids		ω-Hydroxy Acids		Cinnamic Acid		Polyhydroxy Acids		2-Hydroxy Fatty Acids		Fatty Alcohols	
	Mean ± SD	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%
Wild type	586.1 ± 107.4	35.2 ± 8.6	6.0	31.9 ± 8.5	5.4	65.8 ± 26.2	11.2	17.9 ± 3.8	3.1	385.3 ± 85.7	65.7	6.6 ± 0.9	1.1	43.5 ± 12.4	7.4
Glossy															
P15C12	84.1 ± 11.3	2.6 ± 0.5	3.1	3.3 ± 0.1	3.9	6.2 ± 1.9	7.4	10.0 ± 2.3	11.9	57.1 ± 2.2	67.8	1.5 ± 0.2	1.8	3.4 ± 0.6	4.1
P23F12	162.6 ± 14.8	11.8 ± 1.9	7.2	7.2 ± 1.1	4.4	19.1 ± 0.9	11.7	6.3 ± 0.9	3.9	102.2 ± 9.8	62.8	ND	0	16.1 ± 2	9.9
P30B6	285.0 ± 24.0	17.6 ± 2.1	6.2	10.6 ± 3.9	3.7	19.9 ± 2	7	8.8 ± 0.5	3.1	198.7 ± 23.3	69.7	ND	0	29.5 ± 5.7	10.3
P23C10	320.0 ± 58.0	13.3 ± 2.5	4.1	20.0 ± 6.2	6.2	28.9 ± 6.3	9	8.8 ± 0.7	2.7	218.6 ± 34.4	68.3	3.2 ± 0.8	1	27.3 ± 8.3	8.5
P8A12	380.8 ± 103.6	18.2 ± 6.6	4.8	34.3 ± 8.6	9	28.9 ± 9.4	7.6	10.1 ± 5.3	2.6	244.2 ± 53.4	64.1	2.8 ± 0. 9	0.7	42.3 ± 12.5	11.1
P4E2	517.2 ± 51.1	16.4 ± 5.6	3.2	14.3 ± 5.6	2.8	83.3 ± 10.5	16.1	23.9 ± 3.2	4.6	349.7 ± 31.4	67.6	3.4 ± 0.1	0.7	26.1 ± 6.1	5.1
P6A2	602.4 ± 47.6	40.1 ± 5.4	6.7	28.5 ± 3.7	4.7	50.1 ± 3.1	8.3	16.8 ± 1.1	2.8	413.4 ± 27.6	68.6	4.0 ± 0.6	0.7	49.7 ± 9	8.2
P32H5	629.1 ± 14.0	23.6 ± 3	3.7	36.8 ± 2.7	5.9	66.8 ± 10.3	10.6	28.9 ± 6	4.6	399.3 ± 30.2	63.5	6.7 ± 0.9	1.1	67.0 ± 10.7	10.6
P3H6	701.0 ± 78.5	57.5 ± 12.2	8.2	36.0 ± 13.1	5.1	54.3 ± 9.3	7.7	15.2 ± 3.8	2.2	485.3 ± 57.1	69.2	2.1 ± 1.1	0.3	50.6 ± 6.6	7.2
P4B6	722.9 ± 122.9	32.5 ± 7.5	4.5	65.7 ± 19.3	9.1	65.5 ± 10.8	9.1	24.9 ± 6.3	3.4	427.0 ± 55.4	59.1	7.7 ± 1.7	1.1	99.6 ± 2.6	13.8
P5E1	739.4 ± 149.8	36.6 ± 6.9	5.0	134.2 ± 27.6	18.2	58.9 ± 18.1	8	21.1 ± 7	2.9	360.4 ± 49.2	48.7	12.4 ± 2	1.7	115.8 ± 25.6	15.7
P11H2	778.1 ± 54.9	30.5 ± 10.8	3.9	28.6 ± 6.8	3.7	140.7 ± 17.3	18.1	27.2 ± 1.6	3.5	502.4 ± 23.4	64.6	5.0 ± 1.3	0.6	48.8 ± 8.2	6.3
P26E8	883.9 ± 122.8	35.6 ± 8	4.0	138.9 ± 40.1	15.7	77.5 ± 9.3	8.8	30.8 ± 4.1	3.5	449.6 ± 40.7	50.9	14.2 ± 0.4	0.6	137.4 ± 36.1	6.3
P18H8	954.6 ± 106.0	82.4 ± 14	8.6	41.8 ± 14.7	4.4	142.0 ± 34.1	14.9	34.6 ± 1.8	3.6	564.6 ± 47.6	59.1	7.4 ± 2.1	0.8	81.8 ± 13	8.6
P30A12	989.5 ± 134.7	66.3 ± 23.5	6.7	49.5 ± 0.6	5	112.8 ± 17.9	11.4	45.0 ± 6.6	4.6	631.8 ± 74.1	63.9	7.6 ± 0.8	0.8	76.5 ± 29.8	7.7
P17F12	1175.5 ± 216.6	39.6 ± 8	3.4	106.2 ± 14	9	81.7 ± 16.8	6.9	36.8 ± 9.2	3.1	541.2 ± 113.9	46	201.4 ± 46.7	17.1	168.6 ± 49.7	14.3
Dull															
P16D12	510.6 ± 17.2	21.2 ± 0.5	4.1	32.1 ± 2.9	6.3	56.3 ± 5.3	11	18.9 ± 0.9	3.7	321.1 ± 8.1	62.9	5.9 ± 0.7	1.2	55.1 ± 5.4	10.8
P43G7	570.1 ± 95.7	21.9 ± 3.7	3.8	57.3 ± 10.9	10.1	53.8 ± 26.9	9.4	18.1 ± 7.2	3.2	344.3 ± 59.1	60.4	6.0 ± 2.2	1.1	68.8 ± 9.8	12.1
P6D6	642.8 ± 15.3	15.6 ± 3.1	2.4	15.2 ± 4.6	2.4	104.4 ± 8.6	16.2	21.7 ± 1.1	3.4	454.0 ± 11	70.6	ND	0	32.0 ± 2.5	5
P45A8	722.7 ± 59.0	17.9 ± 3.2	2.5	24.3 ± 2	3.4	103.4 ± 7	14.3	38.8 ± 4	5.4	501.7 ± 44	69.4	1.7 ± 0.5	0.2	34.9 ± 3.5	4.8
P43E6	724.0 ± 13.1	32.8 ± 9	4.5	39.4 ± 19	5.4	61.7 ± 8.3	8.5	16.5 ± 0.8	2.3	533.9 ± 26.2	73.7	5.1 ± 0.8	0.7	34.8 ± 8.5	4.8
P14D5	752.8 ± 42.4	32.5 ± 0.2	4.3	40.8 ± 1.5	5.4	42.0 ± 4.7	5.6	15.0 ± 2	2	564.8 ± 7.7	75	3.7 ± 0.2	0.5	53.9 ± 0.8	7.2
P20E10	757.9 ± 46.9	18.8 ± 4.4	2.5	27.9 ± 3.6	3.7	108.8 ± 8.1	14.4	33.5 ± 1.5	4.4	531.8 ± 32.6	70.2	3.7 ± 0.7	0.5	33.4 ± 4.8	4.4
P16H5	900.2 ± 71.2	23.1 ± 2.5	2.6	41.3 ± 4.6	4.6	78.2 ± 2.9	8.7	42.9 ± 0.9	4.8	667.5 ± 56.1	74.1	4.4 ± 0.5	0.5	42.9 ± 5.4	4.8

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

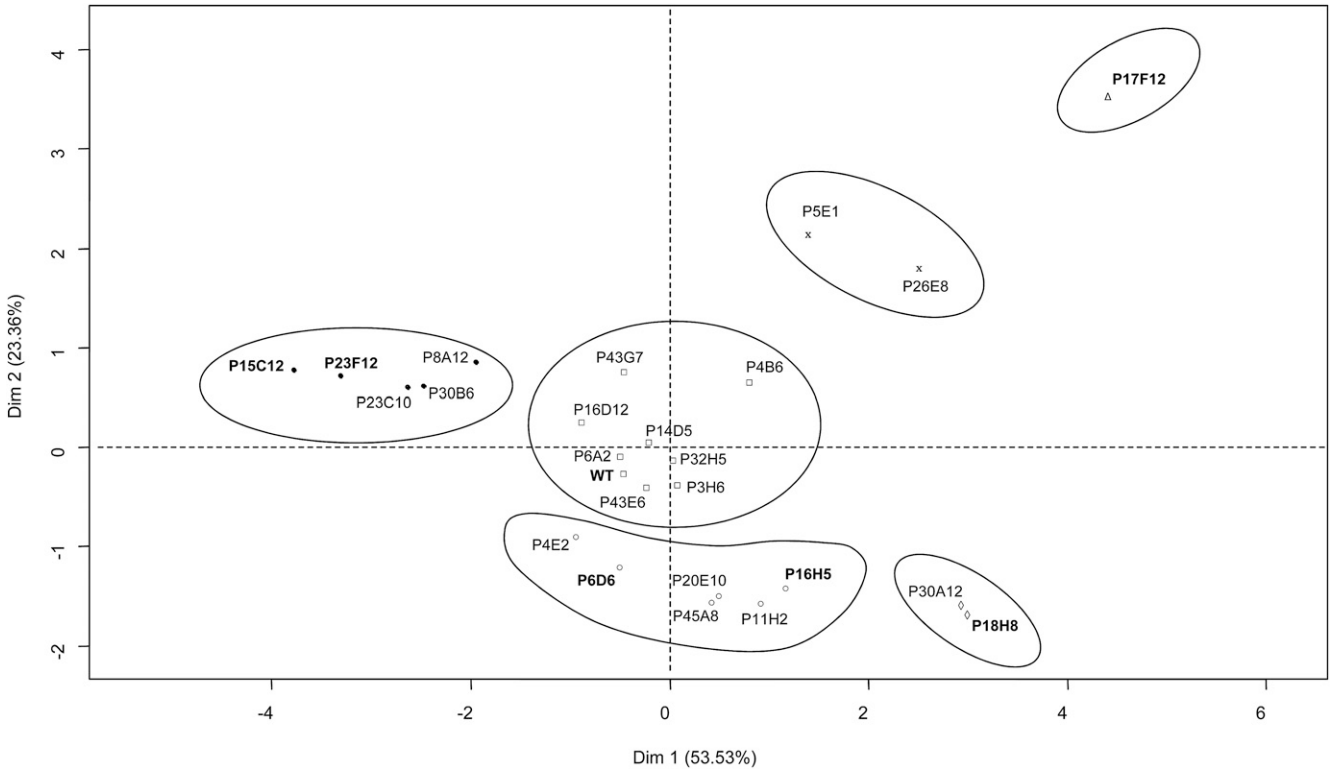


Figure 4. HCA plot of the two first principal components showing the 24 mutants and the wild type (WT) analyzed for cutin composition of fruit cuticle. Data were centered and scaled for the PCA. The Euclidian distance and Ward aggregation method were used for the HCA. The *x* axis and *y* axis are the two principal components with the percentage of contribution to the two dimensions indicated between brackets. Cluster 1 is represented with black circles, cluster 2 with white triangles, cluster 3 with black crosses, cluster 4 with white diamonds, cluster 5 with white squares, and cluster 6 with white circles. Bold type indicates wild type and fruit brightness mutants further analyzed for fruit surface and cuticle.

affected in glossy fruit mutants and increased fruit brightness can be provoked by both deficiency and increased accumulation of cutin.

Cutin-Composition Mutants P5E1 and P26E8 Show Constitutive Alteration of Suberin Biosynthesis in the Fruit

To investigate the mutations underlying the variations in fruit brightness, we focused on the glossy mutants because dull mutations are likely pleiotropic and affect the epidermis. We further focused on cutin mutants because cutin load is possibly the major factor controlling fruit brightness in tomato (Girard et al., 2012; Nadakuduti et al., 2012; Yeats et al., 2012b), and the possible effects of wax changes on glossiness have already been well described in Arabidopsis (Chen et al., 2003; Aharoni et al., 2004; Bourdenx et al., 2011). One way to identify the possible origin of the mutation is to combine the wealth of information now available on cuticle biosynthesis and regulation with the data on fruit surface chemistry. Two of the cutin-accumulation mutants that clustered together in PCA-HCA (P5E1 and P26E8 lines; Fig. 4) showed unusual high dicarboxylic acid content (15% to 18% of total monomers). Cutin compositions of these mutants are strikingly similar (Table II; Supplemental Table S3), suggesting that they are allelic. In addition, close examination of the dicarboxylic acid components of the P5E1 and P26E8 mutants (Supplemental Table S3) indicates that both display a 2.5-fold increase in C16:0 dicarboxylic acid and a 5-fold increase in C18:1 dicarboxylic acid compared with the wild type. In most species, except Arabidopsis and other Brassicaceae, this composition is considered as indicative of suberin (Pollard et al., 2008). Remarkably, no russeting or any other visible mark of suberin accumulation had been observed in the fruit sample analyzed, which presented a uniform glossy appearance. After cuticle composition analysis, we therefore planted one of these mutants (P26E8) in order to observe its cuticle phenotype. Close examination of the fruits revealed the obvious accumulation of suberin-like material at the distal end of the fruit (Supplemental Fig. S6), a trait not observed in the fruit sample previously analyzed. This result reinforces the hypothesis that the biosynthesis of both cutin and suberin are altered in these mutants. Because growth period and position of the fruit on the plant apparently influence the extent of accumulation of this suberin-like material, this is likely under the control of the environmental conditions.

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

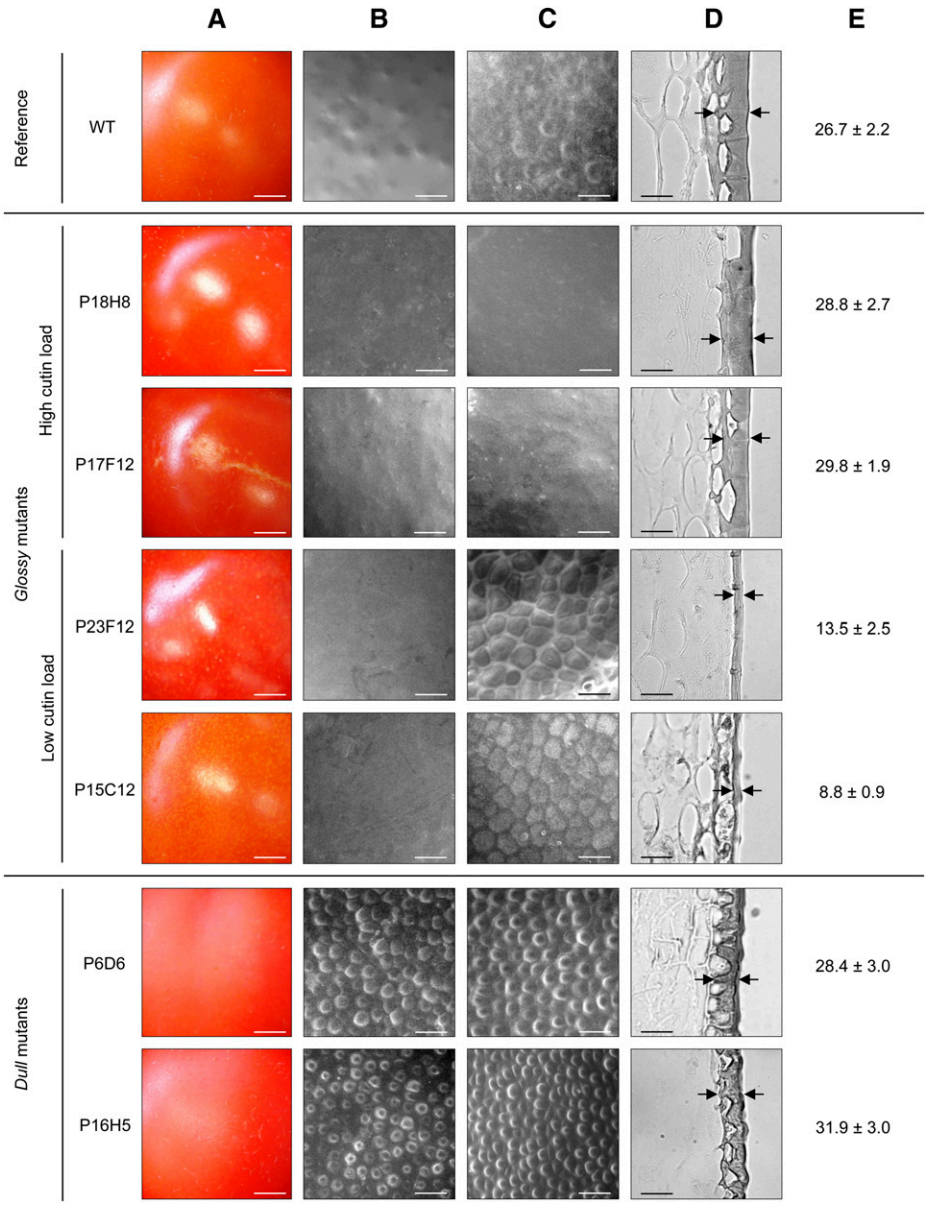


Figure 5. The surface and cuticle from the wild type (WT) and selected *glossy* and *dull* mutants fruits at RR stage. A, Light macroscopy images showing cuticle brightness. B, ESEM of native fruit surface. C, ESEM of de-waxed fruit surface. D, Light microscopy of fruit exocarp sections stained with Sudan IV. Black arrows show examples of cuticle thickness measurement points. E, Cuticle thickness measurements of pericarp sections stained with Sudan IV. Mean values (in micrometers) of 40 measures on 3 different sections are given with SD. Scale bar = 5 mm in A; 40 μm in B and C; 30 μm in D. [See online article for color version of this figure.]

The P15C12 Cuticle Mutant Displays Constitutive Cutin Deficiency in the Fruit

Two other obvious targets are the P15C12 and P17F12 cutin mutants, which are strong cutin-deficient (cutin load: 84.1 $\mu g/cm^2$) and strong cutin-accumulating (cutin load: 1175.5 $\mu g/cm^2$) mutants, respectively. Fruits from the P17F12 mutant display obligatory parthenocarpy and plants carrying the cuticle mutation did not set seeded fruits, despite attempts of pollination with wild-type pollen. This mutant was therefore not further studied. By contrast, the P15C12 mutant, in which plant and fruit were not affected by the mutation except for cuticle alteration, was further characterized along fruit development for cutin load and water loss (Fig. 6, A to C). At 17 DPA, fruits from the wild type and P15C12 mutant exhibited low cutin loads (between 30 and 50 $\mu g/cm^2$). From then on, a striking accumulation of cutin occurred in the wild-type fruit during the next 8 d (i.e. during the cell expansion phase of fruit growth). Cutin load reached approximately 615 $\mu g/cm^2$ at 25 DPA in the wild type and slightly increased thereafter until 695 $\mu g/cm^2$ at the RR stage. By contrast, cutin load of the P15C12 mutant continuously stayed at the same low level throughout fruit development until the RR stage. The effect of the mutation on cutin accumulation in the cell walls from epidermal cells could be scored by analyzing the de-waxed fruit epidermis and measuring the thickness of the cutinized cell walls between two adjacent epidermal cells, hereafter called cutin width (Supplemental Figure S7). The cutin width was almost twice as thin in the P15C12 mutant than in the wild type (Fig. 6D).

Alterations of cutin biosynthesis in the P15C12 mutant were also accompanied by large modifications of

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

the cuticle permeability to water, although mutant wax load was 40% higher than that of the wild type. The water loss kinetics of representative fruits from the wild type and P15C12 mutant (Fig. 6B) clearly show the impaired ability of P15C12 detached fruits to avoid water loss, with the mutant fruit retaining only 32.2% of its original weight at the end of the experiment versus 72.5% in the wild type. Consistently, the tests of cuticle permeability performed on Mature Green (MG) fruit demonstrated that mutant fruit was very permeable to the toluidine blue dye, unlike the wild-type fruit (Fig. 6C). Thus, besides fruit brightness, the mutation affecting fruit cutin load in the P15C12 mutant has dramatic consequences on the integrity and properties of its cuticle. Because these various phenotypic traits (fruit brightness, cutin width, water loss, permeability to toluidine blue) describe various aspects of the same mutation affecting cutin load, they were therefore used for characterizing tomato genotypes carrying the cuticle-deficiency allele found in P15C12.

Mapping of the P15C12 Locus and Identification of the gdsl2-b Mutation through the Candidate Gene Approach

A F2 mapping population segregating for the cuticle-deficiency mutation found in P15C12 was generated through crossing the Micro-Tom P15C12 homozygous mutant with a M82 dwarf mutant, previously selected among EMS mutants generated in the widely used

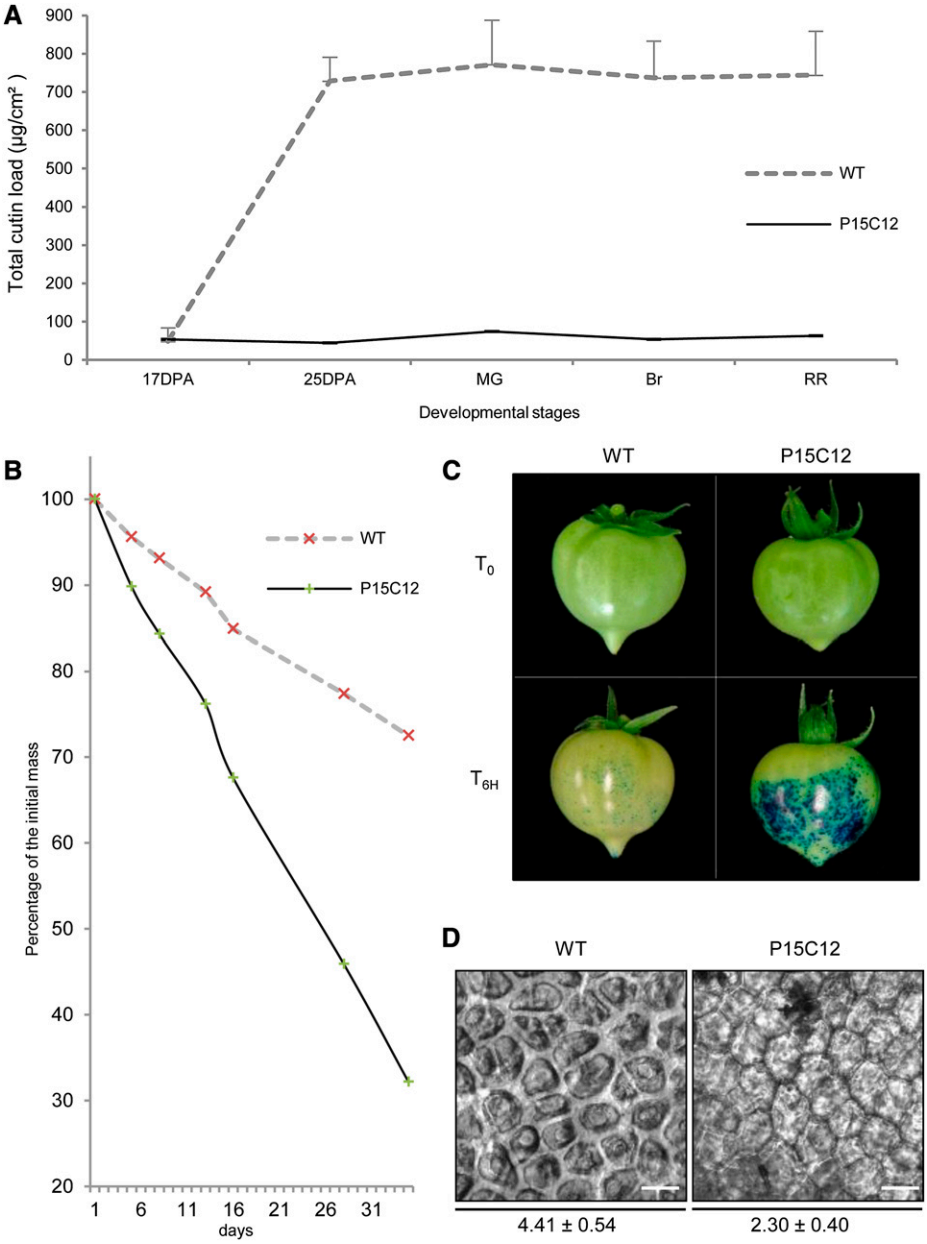


Figure 6. Cuticle properties of the *glossy* P15C12 cutin-deficient mutant. A, Total cutin load of the wild type (WT) and P15C12 fruits at 17 DPA, 25 DPA, MG, Breaker (Br), and RR stages. Mean values (in micrograms per square centimeter) of total cutin load are given with SD ($n = 4$). B, Water loss of RR fruit during storage. Fruits were stored at 28°C under pulsed air, and masses were measured at time zero (T_0) and after 4, 7, 12, 15, 27, and 34 d of storage. C, Permeability to toluidine blue of MG fruits incubated with the dye during 6 h (T_{6H}). D, Cutin width measurements on fresh pealed outer epidermis from RR fruits are expressed in micrometers. Twelve independent measures of the width of the cutinized cell walls were done after picture acquisition. Scale bar = 30 μm. [See online article for color version of this figure.]

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

tomato cultivar M82 (Menda et al., 2004). There are multiple rationale for this strategy (Just et al., 2013). First, by crossing 'Micro-Tom' with a cultivar from the same tomato species (*S. lycopersicum*) and not with a wild tomato such as a *Solanum pimpinellifolium* accession, we avoid the segregation of multiple polymorphic traits, among which those affecting the cuticle (Yeats et al., 2012a). Second, the F2 mapping population of 110 plants can be grown in the greenhouse on a limited space (6 m^2 instead of 25 m^2 for *S. pimpinellifolium*). Finally, a whole set of single nucleotide polymorphism (SNP) markers between Micro-Tom and M82 was recently developed (Shirasawa et al., 2010), allowing us to select 48 SNP markers evenly distributed along the 12 tomato chromosomes (Tomato Genome Consortium, 2012). The mapping population was scored as follows for cuticle-associated traits previously characterized in the P15C12 mutant: fruit brightness (three classes; Supplemental Fig. S8, A and B), cuticle permeability to toluidine blue dye (six classes; Supplemental Fig. S8, C and D), water loss (five classes; Supplemental Fig. S8, E and F), and cutin width (four classes; Supplemental Fig. S8, G and H). Frequency distributions show complex inheritance patterns for the various traits, probably revealing both the imprecisions in scoring the traits (fruit brightness, cuticle permeability) and the effects on cuticle properties of the interactions between cutin load and other cuticular traits that could segregate in the F2 population (e.g. epidermal patterning or fruit surface chemistry). Nevertheless, the major locus controlling each trait was located in a 4.84-Mb region on chromosome 11, between markers 11289_715 and 10722_814 (Fig. 7A). The log of the odds (LOD) score, R^2 percentage and effect of quantitative trait loci (QTL) are presented in Table III.

We next screened the chromosomal region of interest for candidate genes with known implication in cutin synthesis or regulation. Among these were genes identified as specifically expressed in the outer epidermis of tomato by laser microdissection of various tomato pericarp tissues followed by RNA sequencing analysis (Matas et al., 2011). Two genes (*Solyc11g007540* and *Solyc11g006250*; Sol Genomics Network [SGN] database, http://solgenomics.net/) were localized between the markers of interest on chromosome 11. The first presents a strong homology with an Arabidopsis gene (*AT5GO4660.1*) encoding a CYP77A4 cytochrome P450 oxidase catalyzing the epoxidation of free fatty acids (Sauveplane et al., 2009). No mutation in this gene was detected upon sequencing. The second encodes an acyl-transferase of the GDSL esterase/lipase protein family recently shown to be involved in the extracellular deposition of cutin in tomato fruit (Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012b). The current locus name of *Solyc11g006250* (1,004,368 to 1,006,899 nucleotides on chromosome 11) in the Solanaceae SGN database is *GDSL2*, whereas its given names were previously *SlGDSL1* (Girard et al., 2012) and cutin synthase *CD1* (Yeats et al., 2012b). In agreement with SGN, the gene was herein named *SlGDSL2*.

Sequencing the *SlGDSL2* (*Solyc11g006250)* gene from the wild type and P15C12 plants revealed an A to T mutation disrupting the 3′ splice site of intron 4 (Fig. 7B). Because a mutated allele of *SlGDSL2* was already described in tomato (Yeats et al., 2012b), the P15C12 mutant is thereafter named *gdsl2-b*. As in other introns belonging to the major class of introns processed by the U2 spliceosome, the splice site sequences of intron 4 from *SlGDSL2* gene fit the canonical GT-AG consensus borders, where the nearly invariant GT dinucleotide is at the 5′ end and the AG dinucleotide at the 3′ end of the intron. Point mutations in this 3′ AG dinucleotide, which is essential to the definition of the 3′ splice junction, may lead to the production of mRNA with unspliced intron 4. Actually, missplicing of intron 4 of *SlGDSL2* leads to the accumulation of several species of SlGDSL2 mRNA in both the P15C12 mutant and its F1 hybrid (Fig. 7D). The larger mRNA effectively corresponds to unspliced mRNA, as confirmed by sequencing. In-frame reading of intron 4 produces 13 additional incorrect residues after exon 4 (Fig. 7C), thus leading to the production of a truncated protein in which the 64 residue C-terminal region is missing. Interestingly, a second mRNA is produced whose size is consistent with that of correctly spliced SlGDSL2 mRNA. However, close examination of the mutated sequence reveals the presence of a cryptic 3′ splicing site in exon 5, 17 nucleotides downstream of the canonical 3′ consensus splice sequence of intron 4, which is predicted to be favored in the mutant (Human Splice Finder, http://www.umd.be/HSF/HSF.html). Indeed, sequencing the smaller-sized mRNA confirmed the alternative splicing at this site. The new open reading frame in exon 5 leads to the synthesis of eight new incorrect amino acids before truncation of the protein (Fig. 7C).

Real-time quantitative PCR analysis of *SlGDSL2* expression in 20 DPA fruit revealed that accumulation of SlGDSL2 transcripts was reduced by approximately 96% in the P15C12 mutant compared with the wild type (Fig. 7E). Immunoblot analysis of SlGDSL2 protein in 20 DPA fruit epidermis failed to detect the protein in the epidermis from the *gdsl2-b* fruit, in contrast with the wild-type fruit (Fig. 7F), suggesting that the *gdsl2-b* mutant carries a strong hypomorphic or null allele of the *SlGDSL2* gene, which is likely responsible for the cutin-deficiency phenotype observed in the P15C12 mutant line.

DISCUSSION

Considerable progress in research on cuticle synthesis and regulation has been made in recent years owing to the availability of Arabidopsis mutants and genomic tools. Main pathways for the synthesis of waxes and cuticle polymers have also been deciphered (Pollard et al., 2008; Bernard and Joubès, 2013) and increasing evidence on the mechanisms of transport of cuticular components and on the regulation of cuticle biosynthesis is now available (Yeats and Rose, 2013). Currently, the main challenges are to understand how cuticle properties are linked with cuticle composition and structure,

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

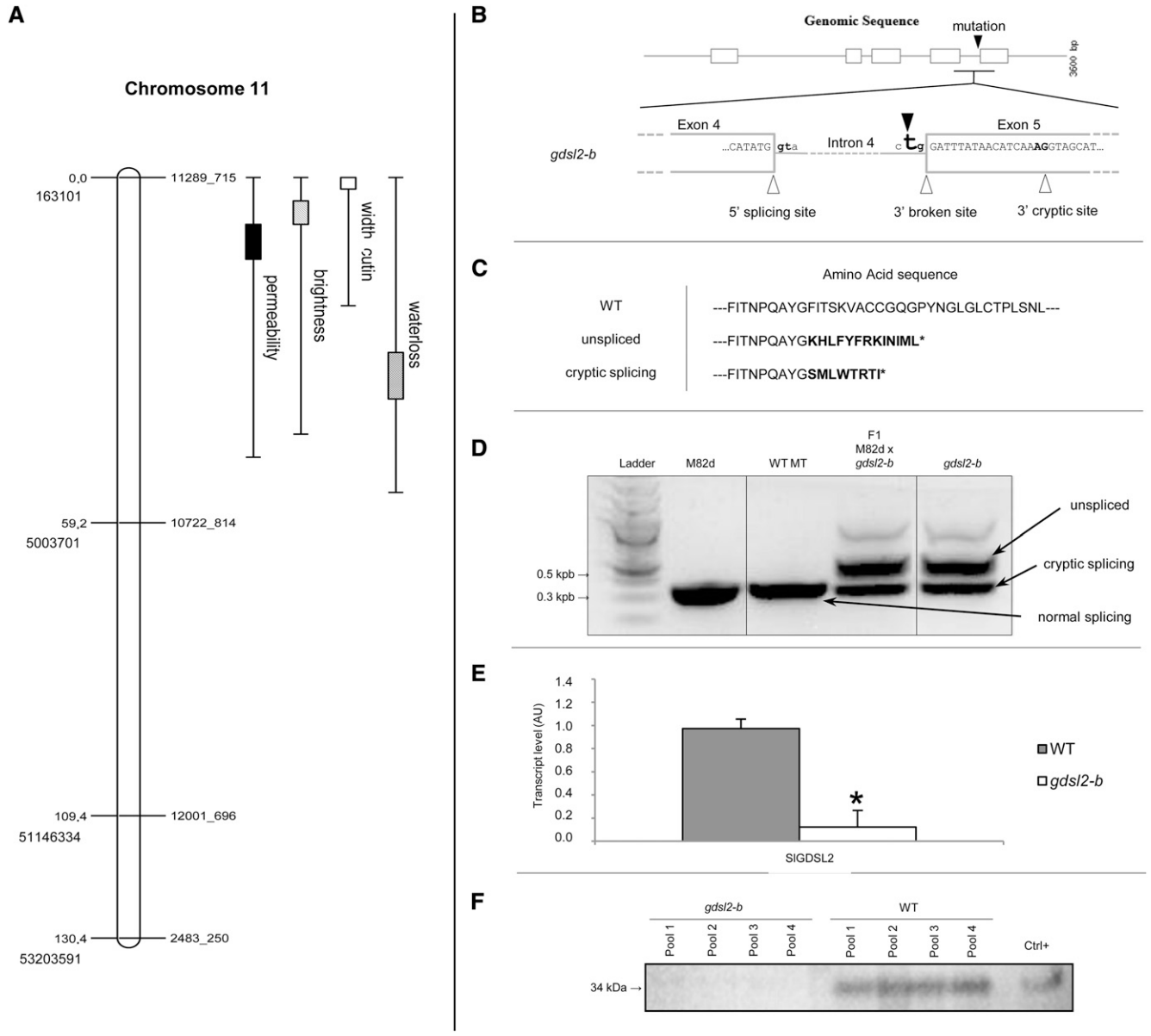


Figure 7. Mapping of the P15C12 *glossy* mutant and characterization of the mutation. A, The four cuticle-related traits (brightness, water loss, permeability, cutin width) were mapped to chromosome 11 between SNP markers 11289_715 and 10722_814. Genetic distance (in centimorgans) and physical position (ITAG2.40) are indicated on the left. Markers are indicated on the right. 1-LOD and 2-LOD support intervals of each QTL are marked by boxes and thin bars, respectively. B, *SlGDSL2* gene splicing model. Exons, introns, and splicing sites (in bold) are represented by white boxes, gray lines, and white triangles, respectively. The black triangle shows the A to T mutation in the 3′ consensus splice site of intron 4, which results in a broken splicing site in the *gdsl2-b* mutant. The 3′ cryptic splicing site is shown on the right. C, Amino acid sequences deduced from native SlGDSL2 transcript (wild-type plant, *SlGDSL2* gene), unspliced transcript (in-frame reading through intron 4 in the *gdsl2-b* mutant), and alternative cryptic site transcript (splicing of intron 4 at 3′ cryptic site in exon 5 in the *gdsl2-b* mutant). Incorrect amino acids are indicated in bold. D, Electrophoretic analysis of the *SlGDSL2* transcripts in M82dwarf (M82d), wild-type 'Micro-Tom' (WT MT), *gdsl2-b* mutant, and F1 hybrid between M82d and *gdsl2-b*. E, Real-time reverse-transcription PCR analysis of *SlGDSL2* expression in 20 DPA fruits in wild-type 'Micro-Tom' (gray box) and *gdsl2-b* mutant (white box). Mean values of three biological replicates are shown with SD. Asterisk indicates significant difference from wild-type fruits (*t* test, $P < 0.01$). F, Immunoblot analysis of GDSL2 protein in four independent pools of *gdsl2-b* and wild-type epidermis. Positive control is a recombinant GDSL extract (Girard et al., 2012). AU, Arbitrary units; Ctrl, control; LOD, log of the odds; QTL, quantitative trait loci.

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Table III. *Summary of the major locus identified for fruit brightness mutant P15C12 on chromosome 11 between markers 11289_715 and 10722_814*

LOD score is maximum logarithm of odds for the presence of a locus controlling each analyzed trait by simple interval mapping (MapMaker/QTL). R^2 is the percentage of variance explained by the locus. Additive allele effect was determined by QTL Cartographer.

Trait	LOD Score	R^2	Additive Allele Effect
		%	
Permeability	15.90	75.3	1.2807
Brightness	13.64	61.1	0.6287
Cutin width	4.76	24	−3.715
Water loss	8.13	65.6	−25.885

how cuticle components interact with cell wall polymers, and how this will affect plant characteristics (e.g. plant growth or resistance to biotic and abiotic stresses) (Domínguez et al., 2011).

Although Arabidopsis remains the model of choice for plant functional genomics, this species is not well adapted for studying cuticle properties due to its very thin cuticle and some specificities (e.g. the high level of dicarboxylic acids in Arabidopsis cutin, unlike most other plants). By contrast, tomato fruit has a thick and easy-to-study cuticle synthesized along early fruit development (Yeats and Rose, 2013). Tomato has thus long been used for studying cuticle biomechanics and permeability (Schreiber, 2010; Domínguez et al., 2011) and has recently emerged as a new model for functional genomics of cuticle formation in plants. Because tomato is both a major crop species and a model for fleshy fruits, a wealth of information and genomic tools is now available for this species (Tomato Genome Consortium, 2012). In addition, several major agronomical traits in tomato and in other fleshy fruit species (e.g. fruit growth, visual aspect, cracking, water loss, resistance to pathogens, and postharvest shelf-life) are highly dependent on fruit cuticle (Bargel and Neinhuis, 2005; Saladié et al., 2007; Matas et al., 2009; Domínguez et al., 2011; Parsons et al., 2012). An increasing number of studies highlight the possibilities offered by tomato for analyzing cuticle architecture, mechanical properties, and permeability (López-Casado et al., 2007; Saladié et al., 2007; Mintz-Oron et al., 2008; Buda et al., 2009; Isaacson et al., 2009; Wang et al., 2011) and for discovering genes contributing to cuticle synthesis and regulation (Hovav et al., 2007; Mintz-Oron et al., 2008; Girard et al., 2012; Nadakuduti et al., 2012; Yeats et al., 2012b; Shi et al., 2013). Nevertheless, to further our understanding of the relationships between cuticle composition and architecture and cuticle properties and performance in plants, new tomato cuticle mutants are highly needed (Domínguez et al., 2011).

Tomato EMS Mutants for Studying Cuticle Composition and Properties

Collections of artificially induced genetic diversity resulting from fast-neutron or EMS mutagenesis are increasingly being used in tomato because generating saturated T-DNA collections remains out of reach in this species (Emmanuel and Levy, 2002). Although wild tomato species probably display larger variability in cuticle composition and architecture than cultivated tomato (Hovav et al., 2007; Yeats et al., 2012a), EMS mutants provide several interesting features. The genetic background is almost identical for all mutant lines generated in a given cultivar, except for the induced point mutations, therefore allowing direct comparison between lines. Because point mutations induced by EMS are distributed randomly over the whole genome, allelic series that include both loss-of-function and weak and strong hypomorphic alleles can be found for each target gene (Just et al., 2013). Tomato EMS mutant collections can be further exploited by the targeting-induced local lesions in genomes (TILLING) approach, which allows the discovery of unknown point mutations in known candidate genes (Okabe et al., 2011), or through forward genetic approaches aiming at identifying the mutation underlying the mutant trait. Less straightforward than TILLING, this approach relies first on the phenotypic characterization of the mutant trait and then on the identification of the mutation through map-based cloning, combined (or not) with the candidate gene approach or, more recently, through whole-genome sequencing (Abe et al., 2012; Just et al., 2013). Using this strategy, new cuticle-related genes involved in cuticle regulation (the *cd2* HD-ZIP IV mutant; Isaacson et al., 2009), cutin monomer biosynthesis (the *cyp86A9* mutant; Shi et al., 2013), and cutin polymerization (the *cutin synthase* mutant; Yeats et al., 2012b) were recently uncovered in tomato EMS mutant collections. However, when considering the large number of candidate genes involved in the regulation, synthesis, and transport processes necessary for cuticle formation (Matas et al., 2011; Yeats and Rose, 2013), very few tomato cuticle mutants have been described to date (Kimbara et al., 2012; Nadakuduti et al., 2012; Shi et al., 2013).

In this study, screening the highly mutagenized EMS mutant collection of 3,500 families generated in the miniature Micro-Tom cultivar (Just et al., 2013) revealed hundreds of mutants possibly affected in cuticle. Fruits from the selected mutants showed either strong fruit surface defects such as microcracks (russeting), cracks, strong shriveling, or peel browning, or less severe alterations such as increased water loss and altered fruit color or brightness (data not shown). Because strong cuticle alterations are detrimental to fruit quality, we preferred to focus in a first step on the phenotypic alterations responsible only for variations in fruit brightness (glossy or dull fruits), which likely arise from more subtle changes in cuticle properties. Pleiotropic mutations were also excluded because the origin of the cuticular defect is not always easy to trace (e.g. in fruit developmental mutants; Czerednik et al., 2012). The disadvantage of using fruit brightness as a screen for detecting cuticle mutations is that this trait can be very sensitive to environmental conditions such as the growing season (data not shown). However, of the

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

40 emutants examined (from the 274 originally found in the mutant database), more than 20 were further confirmed as being fruit brightness mutants. Among them, eight mutants displayed the glossy/dull trait for both fruit and leaf (Supplemental Table S1), indicating that fruit can be used as an attractive model for studying alterations of leaf cuticle.

Our study clearly shows that although all selected brightness mutants displayed cuticle alterations, the glossy/dull fruit trait is not due to one single alteration. Recent studies of tomato mutants and transgenic lines established that increased fruit glossiness was associated with cutin deficiency (Isaacson et al., 2009; Girard et al., 2012; Nadakuduti et al., 2012; Shi et al., 2013). We indeed confirmed this relationship for several mutants (Fig. 4) but further showed that more complex cuticle architecture can be responsible for this trait. Most of the glossy mutants showed significant variations in either total cutin load or cutin composition (Table II). As shown in Supplemental Figure S2 and summarized in Figure 8, both low and high cutin load mutants may exhibit increased fruit glossiness. Incident light will be either reflected in a mirror-like manner (specular reflection) or reflected in a broad range of directions (diffuse reflection) due to surface irregularities and light scattering (e.g. by wax crystals; Pfündel et al., 2006). In wild-type tomato, the cutin layer is thicker at the junction of the epidermal pavement cells (anticlinal pegs), thinner elsewhere (Fig. 4D; Bargel and Neinhuis, 2005; Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012a), and therefore presents surface irregularities (Fig. 4B). The cutin layer is further covered by epicuticular waxes mostly made up of aliphatic compounds, which form a film at the surface of the fruit (Vogg et al., 2004; Buschhaus and Jetter, 2011). Because of these characteristics, wild-type fruit is moderately glossy. In the high cutin load mutant, a thick cutin layer covers all cell surface and thus likely levels most irregularities resulting in a smooth surface, which can be seen in both native and de-waxed fruit (Fig. 4). This likely increases the specular reflection, hence giving a glossy aspect to the fruit. By contrast, the de-waxed surface of low cutin load mutants displays a very irregular aspect because of the presence of a thin to very thin cutin layer. The epicuticular wax film covering these small surface irregularities likely polishes the surface of the fruit, which therefore displays increased glossiness. By contrast, dull mutants present a highly irregular surface due to an increased number of small epidermal cells of different morphological aspects, as shown by ESEM (Fig. 4). The rugged aspect of the fruit surface, seen for both native and de-waxed fruit, is probably responsible for increased diffuse light reflection, hence giving the fruit a matte aspect (Fig. 8). The higher wax load of some mutants may also contribute to increased light scattering.

No glossy tomato fruit mutants with reduced total wax load were observed in this study. In Arabidopsis, stem glossiness is generally indicative of altered epicuticular wax crystallization and is either due to general wax load reduction or to alteration of specific wax compounds (Jenks et al., 2002). Similar observations have been made in maize (*Zea mays*) and in rice (*Oryza sativa*) (Jenks et al., 2002; Islam et al., 2009). In addition, no organ fusion was observed among all the glossy/dull fruit mutants studied, in contrast with the glossy mutants described in Arabidopsis or the *SlCER6* loss-of-function wax tomato mutant (Smirnova et al., 2013). Although the participation of wax in the glossy aspect of the fruit cannot be excluded (several glossy mutants display significant increases in wax load), our results strengthen the conclusion that the glossy/dull fruit appearance in our tomato mutants is not due to wax deficiency. However, the most striking result is that the dull fruit aspect of tomato cuticle mutants appears primarily due to different epidermal cell differentiation. The relationship between epidermal cell differentiation and cuticle development is now well established and genes controlling both cell morphogenesis and cuticle synthesis have been identified (Kurdyukov et al., 2006; Javelle et al., 2011; Oshima et al., 2013). More indirect effects may also arise from perturbations in fruit cell division and development that affect cuticle formation in tomato fruit (Czerednik et al., 2012).

In addition to fruit brightness, the tomato cuticle mutants identified should be instrumental for deciphering the bases of structural, mechanical, or water barrier properties of the cuticle (Schreiber, 2010; Domínguez et al., 2011) and their influence on fruit performance such as resistance to cracking, drought, and pathogens. For example, the water loss properties of tomato fruit cuticle are largely affected by strong cutin alterations, as in the *gdsl2-b* mutant, although the associated modifications in cuticle structure have not been studied in detail (Isaacson et al., 2009; Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012b; Fig. 6). Likewise, the high proportion of cyclic triterpenoids found in the wax-rich *glossy* (P4E2) or *dull* (P6D6) mutants may modify the water loss properties of the fruit (Vogg et al., 2004; Buschhaus and Jetter, 2012).

Cuticle Composition Analysis of EMS Mutants as a Tool for Discovering Genes and Pathways

Insights into cuticle composition may provide some hints on the regulations or biochemical pathways affected in the various cuticle mutants. Before undertaking allelism tests by crossing the various mutants, as done for the wax *glaucous* mutants in *Sorghum* (Peters et al., 2009), we first analyzed mutants for their cutin and wax composition (Tables II and III). Indeed, several groups of mutants displayed remarkably similar cuticle characteristics suggesting the involvement of the mutated genes in related biochemical pathways (e.g. in the cutin-deficient mutants P15C12 and P23F12) or in their regulation (e.g. in the wax- and cutin-rich mutants P18H8 and P30A12). These groups may help to discover new genes and functions related to poorly known aspects of cuticle formation. In addition, as discussed below for the *gdsl* lipase gene, these mutants may help uncover

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

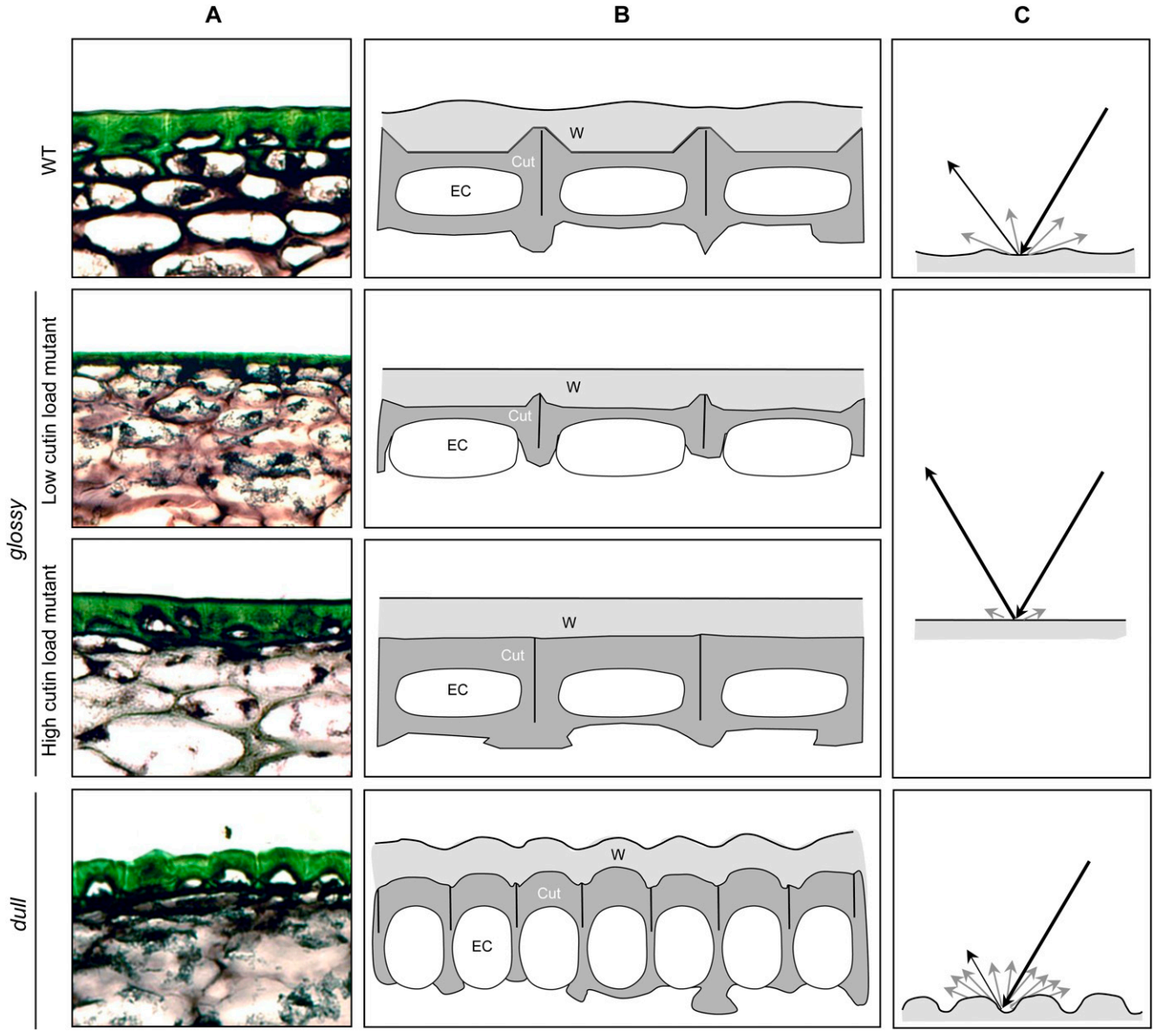


Figure 8. Model of the influence of cuticle architecture on tomato fruit brightness. A, Light microscopy of fruit exocarp sections stained with toluidine blue. B, Schematic representation of the architecture of fruit epidermis in the wild type (WT), high and low cutin load *glossy* mutants, and *dull* mutants. Epidermal cells (EC) are encased in cutinized cell walls (Cut, in dark gray) covered by waxes (W, light gray). C, Light reflection on tomato fruit surface. Black lines indicate incident light and specular reflection. Light gray lines indicate diffuse reflection. [See online article for color version of this figure.]

new alleles of known candidate genes such as those involved in cutin formation or in the coordinated regulation of wax and cutin biosynthesis (Yeats and Rose, 2013). Finally, these groups may also reveal genes involved in suberin biosynthesis. In the P5E1 and P26E8 mutants, the accumulation in cutin fraction of dicarboxylic acids, which are considered as markers for suberin, and the associated visual changes (Supplemental Figure S6) may be indicative of the constitutive upregulation of suberin biosynthetic pathway in these mutants. Indeed, the C18:1 unsaturated dicarboxylic acid content of P5E1 and P26E8 tomato fruit cuticle (approximately 99 μg cm^{-2}; Supplemental Table S3) is close to that of potato (*Solanum tuberosum*) tuber periderm (approximately 80 to 100 μg cm^{-2}; Serra et al., 2009). Because both species are closely related, these mutants may thus prove very interesting for investigating the relationships between cutin and suberin within the Solanaceae. Although both partially share a common biosynthetic pathway, suberin normally accumulates in the fruit only after wounding and in other stressful conditions.

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

The next step is the identification of the mutations underlying the mutant cuticle traits. Identification of unknown mutations in tomato classically proceeds through map-based cloning by crossing the *S. lycopersicum* mutant with a wild-related species such as *S. pimpinellifolium* (Isaacson et al., 2009; Yeats et al., 2012b). To reduce the inherent high genetic and phenotypic variability in the offspring of such a cross, we used as parental line a dwarf mutant of the cultivated M82 genotype, taking advantage of the development of SNP markers polymorphic between M82 and 'Micro-Tom' (Shirasawa et al., 2010). The combination of genetic mapping of the mutation and candidate gene approach resulted in the identification of a new hypomorphic or null allele of the *SlGDSL2* gene responsible for a strong cutin-deficient mutation. Sequencing of the *SlGDSL2* gene from the wild type and *P15C12* plants revealed an A to T mutation disrupting the 3′ splice site of intron 4, which leads to the accumulation of unspliced mRNA and to mRNA resulting from the utilization of a cryptic 3′ splicing site in exon 5 and, in both cases, to truncated SlGDSL2 proteins. Thus, the evidence presented here indicates that SlGDSL2 mutant plants are not able to accumulate correctly spliced mRNA in the fruit epidermis. In both scenarios (no-splicing or missplicing of intron 4), the presence of premature translation-termination codons in the mRNAs would result in the generation of truncated GDSL lipases lacking the C-terminal region. This region has an essential role in SlGDSL2 activity because it harbors two residues of the GDSL lipase catalytic triad: the Asp (D-321) and the His (H-326; Akoh et al., 2004). Truncated proteins devoid of GDSL lipase enzymatic activity could therefore have dominant-negative effects on cutin formation (e.g. by interfering with a cutin-assembly machinery involving SlGDSL2). Actually, the very low *SlGDSL2* transcript level and the absence of immuno-detected SlGDSL2 protein in *gdsl2-b* fruit epidermis (Fig. 7F) strongly suggest that the nonsense-mediated mRNA decay, a quality control mechanism present in plants and other eukaryotes that recognizes and degrades aberrant mRNA harboring premature translation-termination codons (Stalder and Mühlemann, 2008), prevents the production of truncated SlGDSL2 proteins that could possibly have detrimental effects on the plant.

Interestingly, one of the three fruit *cutin-deficiency* (*cd1*) mutants identified in the M82 tomato mutant collection (Menda et al., 2004; Isaacson et al., 2009) was recently identified as a *SlGDSL2* truncation mutant (Yeats et al., 2012b). The discovery of SlGDSL2 mutations by two independent screenings of unrelated tomato mutant collections in M82 and 'Micro-Tom' is probably not a mere coincidence. *SlGDSL2* was a likely candidate for cutin assembly in the cuticle due to its properties and its high and specific expression in tomato fruit epidermis (Lemaire-Chamley et al., 2005; Reina et al., 2007; Mintz-Oron et al., 2008; Matas et al., 2011). Reverse genetics approaches based on both screening of mutant collections in processing tomato and RNA interference–silencing strategy in cherry tomato (Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012b) recently proved that SlGDSL2 plays a key role as an acyl-transferase for the assembly of monomers to form the cutin polyester in the cuticle (Yeats and Rose, 2013). The new *gdsl2* allelic variant described in this study will aid in investigating the role of the GDSL lipase in planta by allowing comparison of GDSL function in cutin polymerization in different genetic backgrounds (cultivated tomato *S. lycopersicum*, M82, and 'Micro-Tom'; cherry tomato *S. lycopersicum var cerasiformae* Wva 106).

In conclusion, tomato mutants characterized herein or present in tomato EMS mutant collections constitute rich sources of genetic variability for exploring cuticle properties and for identifying new genes and alleles involved in cuticle formation. For example, several other strong cutin deficiency mutants identified in this study do not map with other known candidate genes. The recessive P23F12 mutation maps to chromosome 9 unlike other mutations identified to date in tomato (Supplemental Figure S9). The P30B6 mutation, which maps in a different location to chromosome 9, displays a different inheritance pattern (overdominance; data not shown). These results open the way for the discovery of new genes involved in cutin formation in tomato. The continual technological and scientific advances in tomato genomics and in cuticle research now greatly facilitate the identification of the mutations underlying the mutant traits. In addition to traditional map-based cloning (Isaacson et al., 2009), the combination of genetic mapping and candidate gene approaches, which are already proven successful (this study and Shi et al., 2013), can be further extended to the identification of the most promising target genes by RNA sequencing analysis of cuticle fruit mutants. Another very promising approach is the identification of the mutation by whole-genome sequencing (Abe et al., 2012; Just et al., 2013), which only involves crosses between wild-type 'Micro-Tom' and mutant 'Micro-Tom' and therefore excludes all other undesirable variations of other cuticle compounds that could alter cuticle properties.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials

Fruit brightness mutants were isolated from an EMS mutant tomato (*Solanum lycopersicum*) collection generated in the miniature cv Micro-Tom at the Institut National de la Recherche Agronomique as previously described (Rothan and Causse 2007; Just et al., 2013). Plants were grown at a density of 200 plants per square meter in a greenhouse under a 14-h light/10-h dark cycle, 18°C to 28°C temperature, and 60% to 80% relative humidity. Plants were watered twice a week with solution 1 [pH 5.8, oligoelements plus 3.5 mM KNO_3, 1 mM K_2SO_4, 2 mM KH_2PO_4, 6 mM $Ca(NO_3)_2$, 2 mM $MgSO_4$] until first fruit set on the first truss, and then with solution 2 [pH 5.8, oligoelements plus 4 mM KNO_3, 1.5 mM K_2SO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, 4 mM $Ca(NO_3)_2$, 1.5 mM $MgSO_4$] until fruits were ripe. Flowers were regularly vibrated to ensure optimal self-pollination and thus fruit development. Seeds were treated with 4% calcium hypochlorite for 15 min, rinsed for 30 min, air-dried for 2 d, and stored at 4°C with a desiccant until use.

Genetic Mapping

A mapping F2 population of 110 plants was created by crossing the P15C12 Micro-Tom *glossy* mutant with a dwarf mutant from the M82 cultivar EMS population (Menda et al., 2004). Plants from the mapping population were

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

grown in greenhouse in the conditions indicated above, except that plant density was 21 plants per square meter and plants were watered 3 times a week. Cuticle-associated traits were measured at two developmental stages of the fruit, first at the MG stage (brightness and permeability) and then at the RR stage (brightness, water loss, width of the cutin layer surrounding fruit epidermal cells). Genomic DNA was extracted from young leaves of each plant by a cetyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB) method. Five-hundred microliters of CTAB extraction buffer (145 mM sorbitol, 850 mM NaCl, 125 mM Tris-HCl [pH 8.0], 25 mM EDTA, 0.8% [w/v] Sarcosyl [*n*-lauroyl-sarcosine], 0.8% [w/v] CTAB) was added with 2.2 mg of sodium metabisulfite per sample, incubated at 65°C for 90 min, and 450 μl of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added to each sample, mixed by inversion and centrifuged for 10 min at 4500*g*. Subsequently, the supernatant was transferred to a fresh tube and treated with 500 μl of cold isopropanol. DNA was dried 15 min at 45°C under vacuum, suspended in 50 μl of distilled water and samples were treated with ribonuclease. Primer sets of 48 SNP markers well spread along the genome and displaying polymorphism between the 'Micro-Tom' and the 'M82' (Shirasawa et al., 2010) were chosen for genotyping each plant. Genotype and phenotype data were analyzed using MapMaker/Exp v3.0 (Lander et al., 1987), MapMaker/QTL v1.1 (Paterson et al., 1988), and QTL Cartographer (Basten et al., 2002) software.

Fruit Brightness Assessment

Fruit brightness of the mutant lines was visually estimated at the MG and RR (Breaker stage plus 7 d) stages by comparison with wild-type 'Micro-Tom' plants grown side-by-side and disseminated randomly among mutant lines. Mutants differing from wild-type 'Micro-Tom' were classified as *glossy* mutants (i.e. fruits with homogeneous glossy aspect) or as *dull* mutants (i.e. those with no light reflect on the fruit). An important criterion for classifying mutants as fruit brightness mutants was that all fruits on the plant displayed the same phenotype. However, several selected mutant lines carried both glossy and dull fruits, which were clearly different from the wild-type fruits. Analysis of fruit brightness in the segregating P15C12 Micro-Tom mutant × M82 dwarf population was done similarly except that fruit brightness was estimated by comparison of all genotypes to each other and that genotypes were further classified in three brightness groups.

Water Loss and Cuticle Permeability Measurements

For water loss measurements, one RR fruit was harvested from each plant of the F2 mapping population, including the parents. Fruit sealing wax was then applied on stalks and fruits were stored at room temperature. Fruit fresh weight was recorded at time zero and each week, until 6 weeks. Water loss was calculated as a percentage of weight loss. For measurements of cuticle permeability to stain, one MG fruit was collected from each plant of the F2 mapping population and from the parents, and dropped in 1% toluidine blue solution during 6 h as described in Tanaka et al. (2004).

Cutin Monomer and Wax Analysis

Cuticular waxes were extracted by fruit immersion during 30 s in 6 mL of chloroform containing 6 μg of docosane, as internal standard. Extracts were dried under moderate nitrogen flux and lipids were derivatized 15 min at 110°C in 100 μL BSTFA-TMCS (*N*,*O*-bis[trimethylsilyl trifluoroacetamide]: trimethyl chlorosilane [99:1]). The BSTFA-TMCS was dried under nitrogen and samples were suspended in 500 μL of hexane. Wax was then analyzed and quantified as previously described (Bourdenx et al., 2011).

For the cutin monomer analysis, a 1-cm diameter disc was cut off from a RR fruit epidermis, carefully scratched with a scalpel blade in order to remove exocarp cells, and incubated 30 min in isopropanol at 85°C. The disc was then delipidated by successive deeps in chloroform/methanol (C/M), at different ratios: C/M (2:1) for 24 h, C/M (1:1) for 24 h, C/M (1:2) for 24 h, and 100% methanol for 24 h. The delipidated epidermis disc was dried for 48 h under pulsed air and for 48 h in a desiccator. Cutin was then depolymerized, analyzed, and quantified as previously described (Domergue et al., 2010).

Light Microscopy

For cuticle thickness measurements, fruit exocarp (including cuticle) was obtained from two independent RR fruits of the wild type and mutant lines. Samples were fixed and embedded in paraffin as previously described (Mounet et al., 2009). Eight-micrometer slides of exocarp were stained using saturated and filtered Sudan Red solution in ethanol. Mean cutin thickness was assessed from 60 measurements.

For analyzing the thickness of the cutin layer between two adjacent fruit epidermal cells (thereafter called cutin width) in the mapping population, a 10-mm^2 square tissue sample was peeled off from one RR fruit harvested from each plant of the F2 mapping population, including the parents. As many epidermal cells as possible were then removed from the peel by scratching the internal surface with a scalpel blade. The resulting cuticle-enriched fragment was immerged in water, placed flatten on a glass slide, and observed under optical microscope at ×20 magnification. Cutin width was then determined by measuring thickness of the cutinized cell wall between two adjacent epidermal cells (Supplemental Figure S6). Mean cutin width was assessed from 12 measurements.

ESEM

For the observation of wax on the surface of the fruit, 5-mm side cubes of exocarp including cuticle were excised from the equatorial part of RR fruits and placed directly into the observation chamber of a FEI Quanta 200 scanning electronic microscope, in environmental mode. For cutin observation, cubes were submerged 30 s into chloroform beforehand, with gentle agitation. Observations were performed with a plate at 4°C, a 6-Tor pressure in the chamber, and a 4.7-V voltage applied to the filament. Pictures were captured with ×600 and ×3000 magnifications.

PCR and Quantitative Reverse-Transcription PCR Analysis of *SlGDSL2*

Genomic DNA was extracted from 100 mg fresh weight of the wild type and P15C12 mutant leaves with Plant DNAzol reagent (Invitrogen), further amplified using four primer pairs (GDSL 1F/1R, GDSL 2F/2R, GDSL 3F/3R, GDSL 4F/4R) and sequenced for determination of allelic sequences of *SlGDSL2* and *gdsl2-b*. Primer sequences are indicated in Supplemental Figure S10.

The cDNA sizing was performed after a total RNA extraction from 100 mg fresh weight and a reverse transcription, as previously described (Mounet et al., 2009; Girard et al., 2012). The amplification was performed using GDSL2-cDNA4F and GDSL2-cDNA5R primers. Primers sequences are indicated in Supplemental Figure S10.

SlGDSL2 expression was analyzed from bulks of plants segregating for both the fruit brightness and the *gdsl2-b* mutation in the F2 mapping population. The wild-type 'Micro-Tom', the 'M82dwarf', and the P15C12 (*gdsl2-b)* parental lines were included in the analysis. The glossy fruit bulk (homozygous for the mutant *gdsl2-b* allele) was made up of 21 RR fruits collected from 7 plants (3 fruits per plant). On each fruit, two discs of 1-cm diameter were collected and carefully scratched with a scalpel blade. Three pooled samples were then generated by distributing two discs per plant in each pool (i.e. 14 discs per pooled sample in total). The same strategy was used for the wild-type–like bulk (*SlGDSL2* allele) except that the three pooled samples were prepared from 24 RR fruits collected on 4 plants (i.e. 16 discs per pooled sample in total). Samples were ground in liquid nitrogen and stored at −80°C until RNA extraction as previously described (Mounet et al., 2009). PCR analysis was performed on reverse-transcribed cDNAs as previously described (Girard et al., 2012), using primers GDSL2-53 and GDSL2-34. Primer sequences are indicated in Supplemental Figure S10.

SlGDSL2 Immunoblot Analysis

Four independent 15 DPA fruit pools were constituted for both the wild type and *gdsl2-b* mutant line P15C12. Each pool was composed of the outer epidermis from three fruits, ground, and lyophilized. Antibody and immunoblot analyses were as previously described (Girard et al., 2012).

Supplemental Data

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

Supplemental Figure S1. Comparison of fruit brightness from selected glossy and dull mutants at RR stage.

Supplemental Figure S2. Comparison of the fruit brightness of mutants that showed the most extreme wax and cutin compositions.

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Supplemental Figure S3. Variables factor map for cutin components, after a centered PCA analysis.

Supplemental Figure S4. Individual factor map after PCA of the wax and cutin compositions.

Supplemental Figure S5. Variables factor map for wax and cutin components, after a centered PCA analysis.

Supplemental Figure S6. Photograph of fruits from the P26E8 mutant showing suberin deposition at the distal end of the fruit.

Supplemental Figure S7. Microscopic observation of fresh pealed outer epidermis from RR fruit.

Supplemental Figure S8. Phenotyping the F2 progeny from the cross M82d × P15C12 .

Supplemental Figure S9. Mapping of the P23F12 *glossy* mutant.

Supplemental Figure S10. Nucleotide sequences of the primers used in this study.

Supplemental Table S1. Comparison of the plant and fruit brightness data obtained from the MicroTom Mutant Database and from the subsequent observation of the 40 selected families grown in the greenhouse.

Supplemental Table S2. Mean density of fruit epidermal cells in the indicated mutants.

Supplemental Table S3. Cutin and wax composition of fruit cuticle from the wild type and four selected tomato mutants.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Michel Hernould for fruit cytology analyses, Aurélie Petit for her help in statistical analyses, Isabelle Atienza for taking care of the plants in the greenhouse, and Isabelle Svahn for her participation. The ESEM experiments were performed at the Electronic Imaging pole of the Bordeaux Imaging Center, and lipid analyses were performed at the Bordeaux Metabolome Facility.

Received November 15, 2013; accepted December 12, 2013; published December 19, 2013.

LITERATURE CITED

Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, et al (2012) Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. Nat Biotechnol **30:** 174–178

Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, Venger I, Levy D, Yativ M, Domínguez E, Wang Z, De Vos RC, Jetter R, et al (2009) Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SlMYB12-regulated transcriptional network. PLoS Genet **5:** e1000777

Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G, Pereira A (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

Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. Prog Lipid Res **43:** 534–552

Bargel H, Neinhuis C (2005) Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. J Exp Bot **56:** 1049–1060

Basten CJ, Weir BS, Zeng Z-B (2002) QTL Cartographer, Version 1.16. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

Beisson F, Li-Beisson Y, Pollard M (2012) Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. Curr Opin Plant Biol **15:** 329–337

Bernard A, Joubès J (2013) Arabidopsis cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. Prog Lipid Res **52:** 110–129

Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, Pascal S, Léger A, Roby D, Pervent M, Vile D, Haslam RP, Napier JA, 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

Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang CZ, Riechmann JL (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA **101:** 4706–4711

Buda GJ, Isaacson T, Matas AJ, Paolillo DJ, Rose JKC (2009) Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. Plant J **60:** 378–385

Buschhaus C, Jetter R (2011) Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces? J Exp Bot **62:** 841–853

Buschhaus C, Jetter R (2012) Composition and physiological function of the wax layers coating Arabidopsis leaves: β-amyrin negatively affects the intracuticular water barrier. Plant Physiol **160:** 1120–1129

Chen XB, Goodwin SM, Boroff VL, Liu XL, Jenks MA (2003) Cloning and characterization of the *WAX2* gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. Plant Cell **15:** 1170–1185

Czerednik A, Busscher M, Bielen BA, Wolters-Arts M, de Maagd RA, Angenent GC (2012) Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between CDKB and CDKA1 cell cycle genes. J Exp Bot **63:** 2605–2617

Domergue F, Vishwanath SJ, Joubès J, Ono J, Lee JA, Bourdon M, Alhattab R, Lowe C, Pascal S, Lessire R, et al (2010) Three Arabidopsis fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. Plant Physiol **153:** 1539–1554

Domínguez E, Cuartero J, Heredia A (2011) An overview on plant cuticle biomechanics. Plant Sci **181:** 77–84

Emmanuel E, Levy AA (2002) Tomato mutants as tools for functional genomics. Curr Opin Plant Biol **5:** 112–117

Franke RB, Dombrink I, Schreiber L (2012) Suberin goes genomics: use of a short living plant to investigate a long lasting polymer. Front Plant Sci **3:** 4

Girard AL, Mounet F, Lemaire-Chamley M, Gaillard C, Elmorjani K, Vivancos J, Runavot JL, Quemener B, Petit J, Germain V, et al (2012) Tomato GDSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. Plant Cell **24:** 3119–3134

Hovav R, Chehanovsky N, Moy M, Jetter R, Schaffer AA (2007) The identification of a gene (Cwp1), silenced during *Solanum* evolution, which causes cuticle microfissuring and dehydration when expressed in tomato fruit. Plant J **52:** 627–639

Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He Y, Yu B, Pravitasari A, Batteas JD, Stark RE, Jenks MA, et al (2009) Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. Plant J **60:** 363–377

Islam MA, Du H, Ning J, Ye H, Xiong L (2009) Characterization of Glossy1-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance. Plant Mol Biol **70:** 443–456

Javelle M, Vernoud V, Rogowsky PM, Ingram GC (2011) Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. New Phytol **189:** 17–39

Jenks MA, Eigenbrode SD, Lemieux B (2002) Cuticular waxes of *Arabidopsis*. The Arabidopsis Book **1:** e0016, doi:10.1199/tab.0016

Just D, Garcia V, Fernandez L, Bres C, Mauxion J, Petit J, Jorly J, Assali J, Bournonville C, Ferrand C, et al (2013) Micro-Tom mutants for functional analysis of target genes and discovery of new alleles in tomato. Plant Biotechnol **30:** 225–231

Kimbara J, Yoshida M, Ito H, Hosoi K, Kusano M, Kobayashi M, Ariizumi T, Asamizu E, Ezura H (2012) A novel class of sticky peel and light green mutations causes cuticle deficiency in leaves and fruits of tomato (*Solanum lycopersicum*). Planta **236:** 1559–1570

Kunst L, Samuels L (2009) Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. Curr Opin Plant Biol **12:** 721–727

Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bär S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Métraux JP, et al (2006) The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. Plant Cell **18:** 321–339

Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg LA (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics **1:** 174–181

Lemaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C, Rothan C (2005) Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. Plant Physiol **139:** 750–769

Li-Beisson Y, Pollard M, Sauveplane V, Pinot F, Ohlrogge J, Beisson F (2009) Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers

Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

require the synthesis of cutin polyester. Proc Natl Acad Sci USA **106:** 22008–22013

López-Casado G, Matas AJ, Domínguez E, Cuartero J, Heredia A (2007) Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. J Exp Bot **58:** 3875–3883

Matas AJ, Gapper NE, Chung MY, Giovannoni JJ, Rose JK (2009) Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. Curr Opin Biotechnol **20:** 197–203

Matas AJ, Yeats TH, Buda GJ, Zheng Y, Chatterjee S, Tohge T, Ponnala L, Adato A, Aharoni A, Stark R, et al (2011) Tissue- and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. Plant Cell **23:** 3893–3910

Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y, Zamir D (2004) In silico screening of a saturated mutation library of tomato. Plant J **38:** 861–872

Mintz-Oron S, Mandel T, Rogachev I, Feldberg L, Lotan O, Yativ M, Wang Z, Jetter R, Venger I, Adato A, et al (2008) Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. Plant Physiol **147:** 823–851

Mounet F, Moing A, Garcia V, Petit J, Maucourt M, Deborde C, Bernillon S, Le Gall G, Colquhoun I, Defernez M, et al (2009) Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. Plant Physiol **149:** 1505–1528

Nadakuduti SS, Pollard M, Kosma DK, Allen C Jr, Ohlrogge JB, Barry CS (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

Nawrath C (2006) Unraveling the complex network of cuticular structure and function. Curr Opin Plant Biol **9:** 281–287

Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Brès C, Rothan C, Mizoguchi T, Ezura H (2011) Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. Plant Cell Physiol **52:** 1994–2005

Oshima Y, Shikata M, Koyama T, Ohtsubo N, Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2013) MIXTA-like transcription factors and WAX INDUCER1/SHINE1 coordinately regulate cuticle development in *Arabidopsis* and *Torenia fournieri*. Plant Cell **25:** 1609–1624

Parsons EP, Popopvsky S, Lohrey GT, Lü S, Alkalai-Tuvia S, Perzelan Y, Paran I, Fallik E, Jenks MA (2012) Fruit cuticle lipid composition and fruit post-harvest water loss in an advanced backcross generation of pepper (*Capsicum* sp.). Physiol Plant **146:** 15–25

Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. Nature **335:** 721–726

Peters PJ, Jenks MA, Rich PJ, Axtell JD, Ejeta G (2009) Mutagenesis, selection, and allelic analysis of epicuticular wax mutants in sorghum. Crop Sci **49:** 1250–1258

Pfündel EE, Agati G, Cerovic ZG (2006) Optical properties of plant surfaces. Annu Plant Rev **23:** 219–249

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

Reina JJ, Guerrero C, Heredia A (2007) Isolation, characterization, and localization of AgaSGNH cDNA: a new SGNH-motif plant hydrolase specific to *Agave americana* L. leaf epidermis. J Exp Bot **58:** 2717–2731

Rothan C, Causse M (2007) Natural and artificially induced genetic variability in crop and model plant species for plant systems biology. EXS **97:** 21–53

Saladié M, Matas AJ, Isaacson T, Jenks MA, Goodwin SM, Niklas KJ, Xiaolin R, Labavitch JM, Shackel KA, Fernie AR, et al (2007) A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. Plant Physiol **144:** 1012–1028

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

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

Serra O, Soler M, Hohn C, Sauveplane V, Pinot F, Franke R, Schreiber L, Prat S, Molinas M, Figueras M (2009) *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

Shi JX, Adato A, Alkan N, He Y, Lashbrooke J, Matas AJ, Meir S, Malitsky S, Isaacson T, Prusky D, et al (2013) The tomato SlSHINE3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. New Phytol **197:** 468–480

Shirasawa K, Isobe S, Hirakawa H, Asamizu E, Fukuoka H, Just D, Rothan C, Sasamoto S, Fujishiro T, Kishida Y, et al (2010) SNP discovery and linkage map construction in cultivated tomato. DNA Res **17:** 381–391

Smirnova A, Leide J, Riederer M (2013) Deficiency in a very-long-chain fatty acid β-ketoacyl-coenzyme a synthase of tomato impairs microgametogenesis and causes floral organ fusion. Plant Physiol **161:** 196–209

Stalder L, Mühlemann O (2008) The meaning of nonsense. Trends Cell Biol **18:** 315–321

Tanaka T, Tanaka H, Machida C, Watanabe M, Machida Y (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

Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature **485:** 635–641

Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA, Riederer M (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. J Exp Bot **55:** 1401–1410

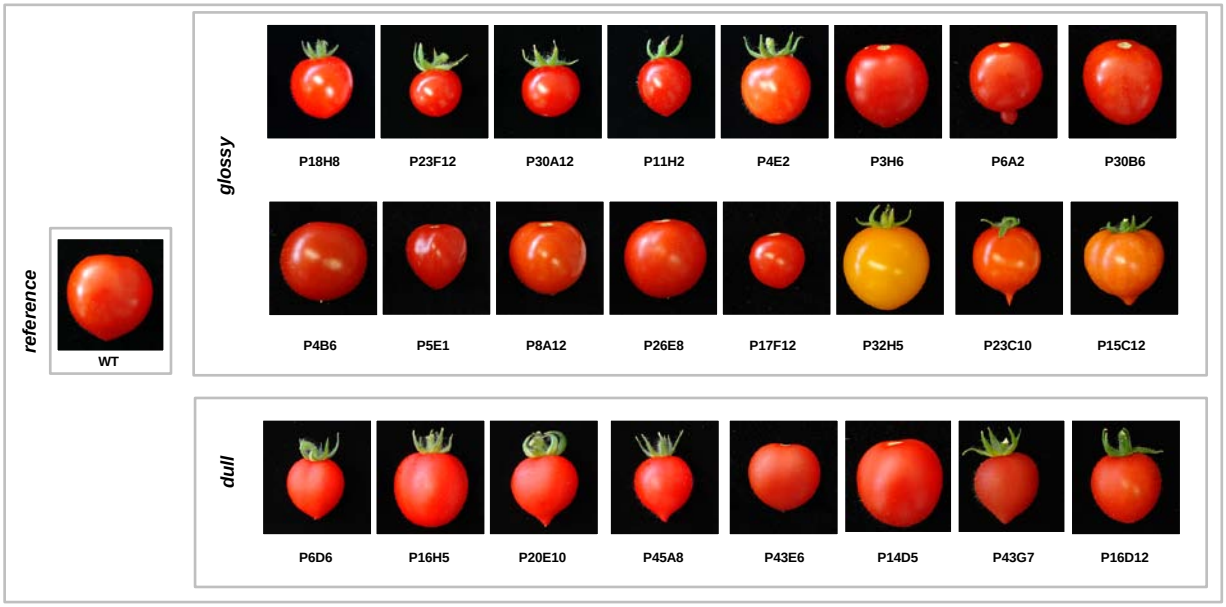
Wang Z, Guhling O, Yao R, Li F, Yeats TH, Rose JKC, Jetter R (2011) Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato fruit cuticular triterpenoids. Plant Physiol **155:** 540–552

Yeats TH, Buda GJ, Wang Z, Chehanovsky N, Moyle LC, Jetter R, Schaffer AA, Rose JK (2012a) The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. Plant J **69:** 655–666

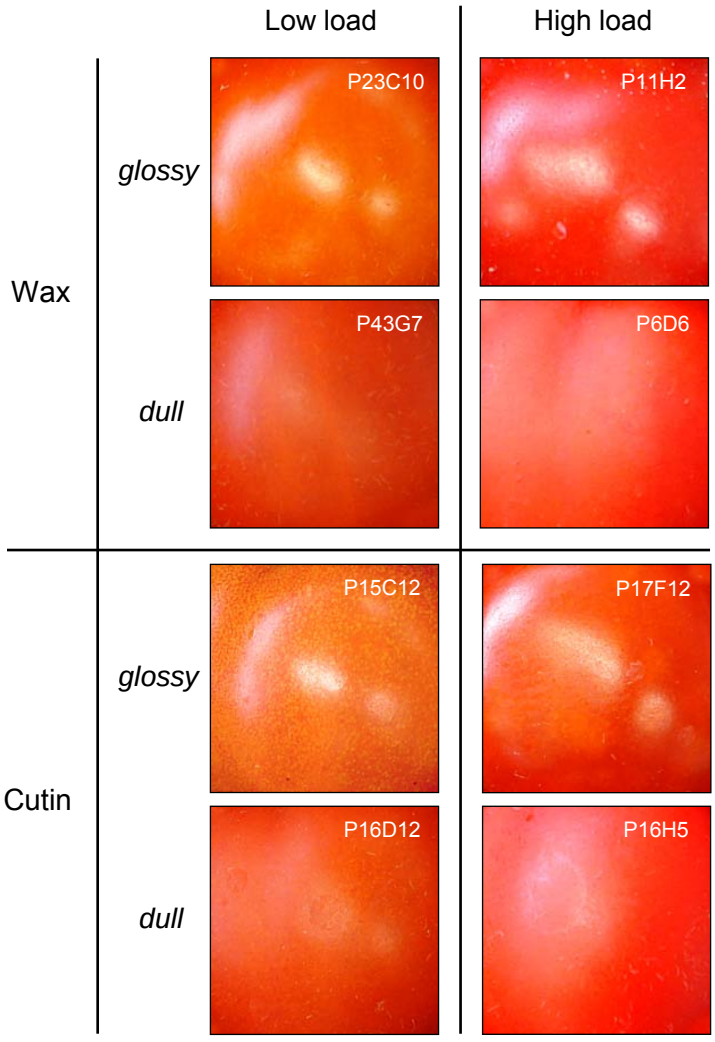
Yeats TH, Martin LB, Viart HM, Isaacson T, He Y, Zhao L, Matas AJ, Buda GJ, Domozych DS, Clausen MH, et al (2012b) The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. Nat Chem Biol **8:** 609–611

Yeats TH, Rose JK (2013) The formation and function of plant cuticles. Plant Physiol **163:** 5–20

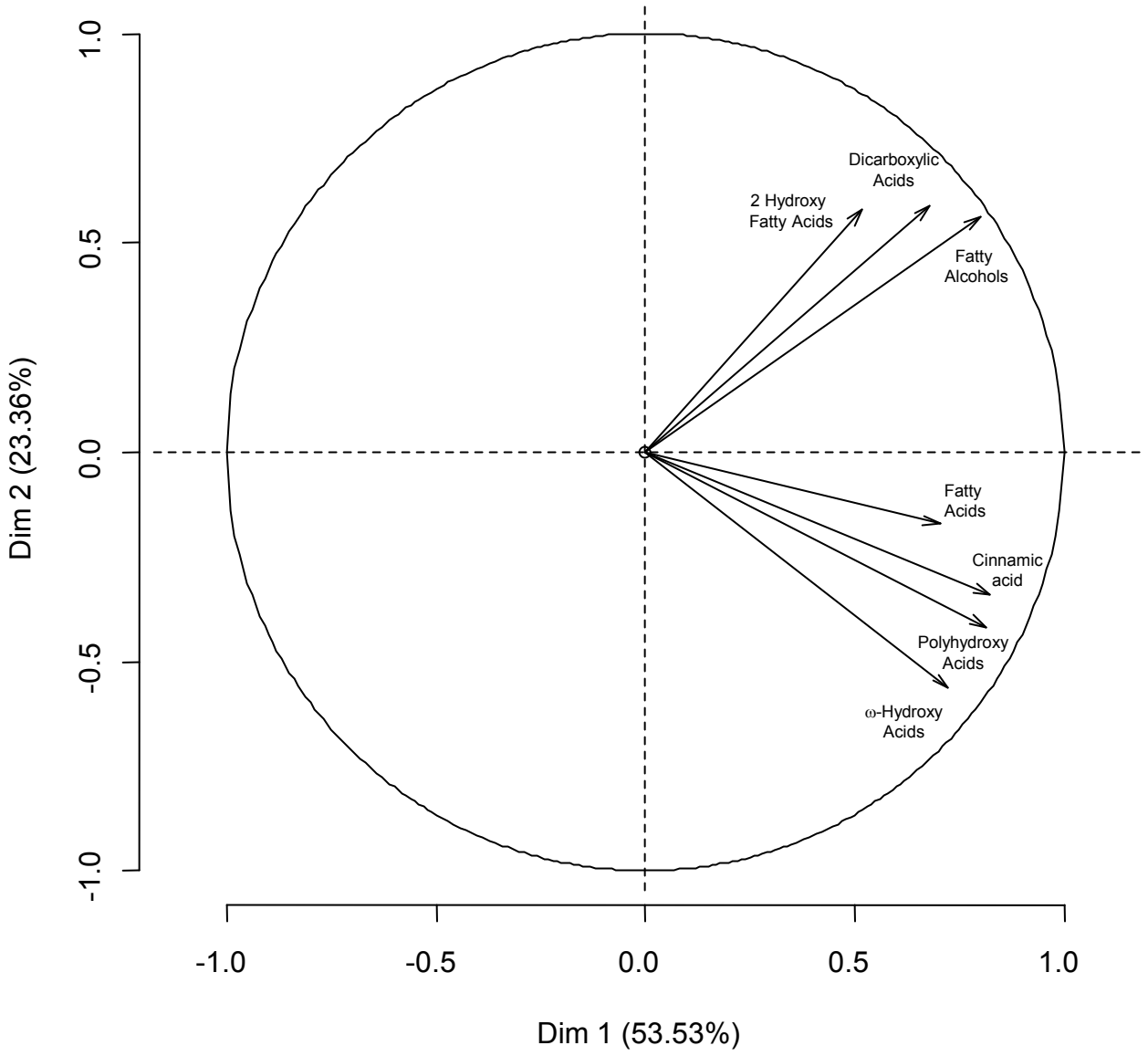
Downloaded from www.plantphysiol.org on February 6, 2014 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.



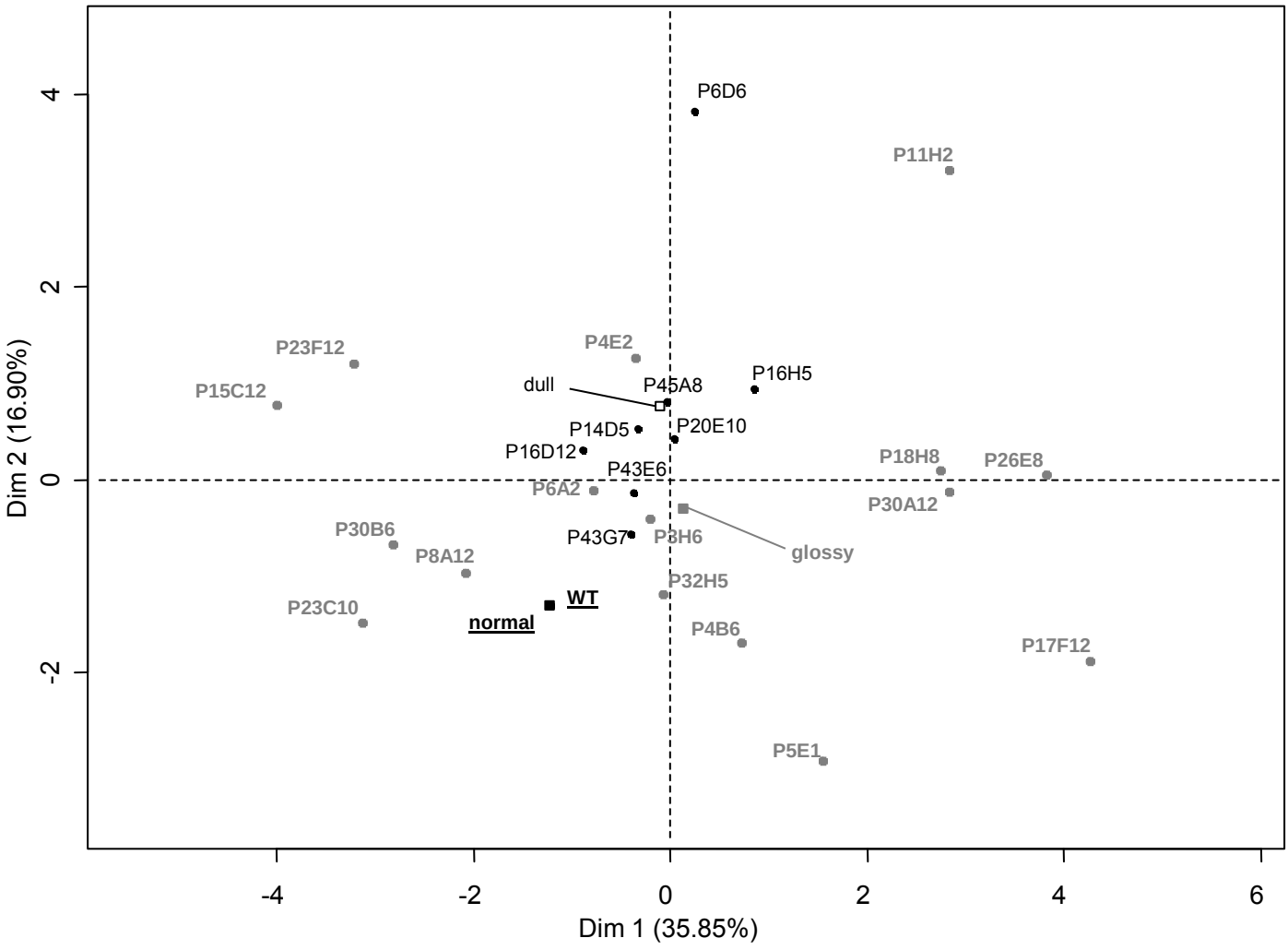
Supplemental Figure S1: Comparison of fruit brightness from selected *glossy* and *dull* mutants at Red Ripe stage. Wild type reference fruit is shown on the left; *glossy* mutants are shown in the upper panel; *dull* mutants are shown in the lower panel. Photographs were taken in standardized conditions.



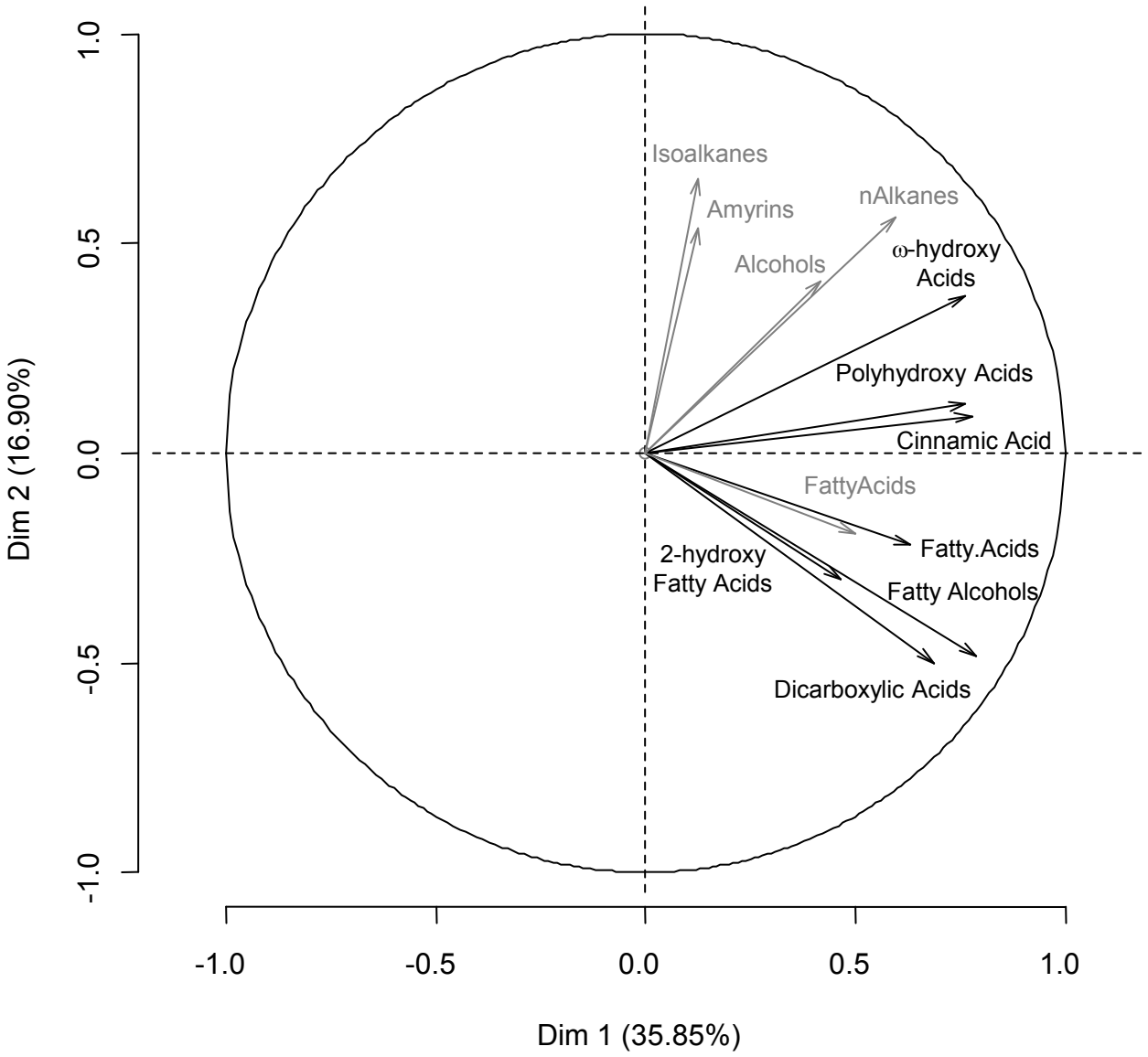
Supplemental figure S2. Comparison of the fruit brightness of mutants that showed the most extreme wax and cutin compositions.



Supplemental figure S3. Variables factor map for cutin components, after a centered PCA analysis.

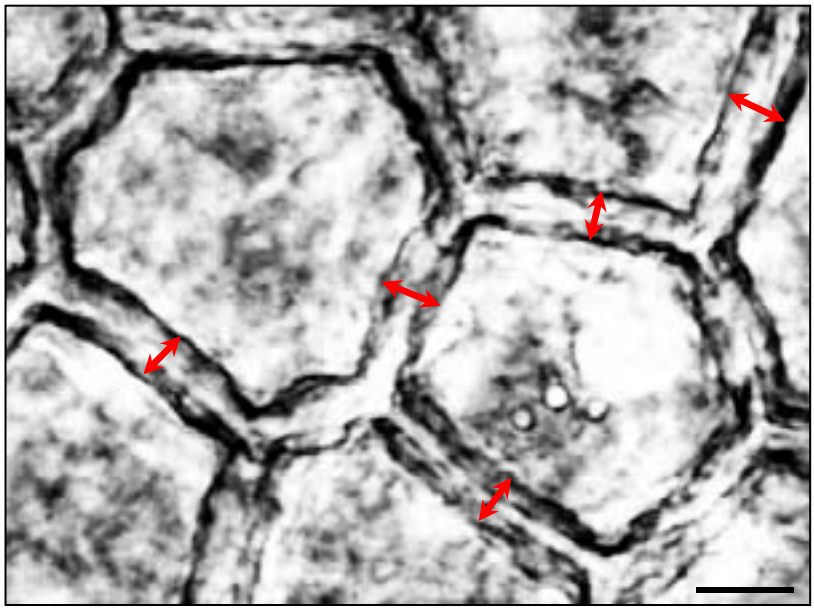


Supplemental figure S4. Individual factor map after Principal Component Analysis (PCA) of the wax and cutin compositions. X and Y axes are the two principal components with the percentage of contribution to the two dimensions indicated between brackets. The brightness and associated samples are indicated in bold and underlined for the reference, in black for dull brightness and in bold grey for glossy brightness. The data were centered and scaled for the PCA.

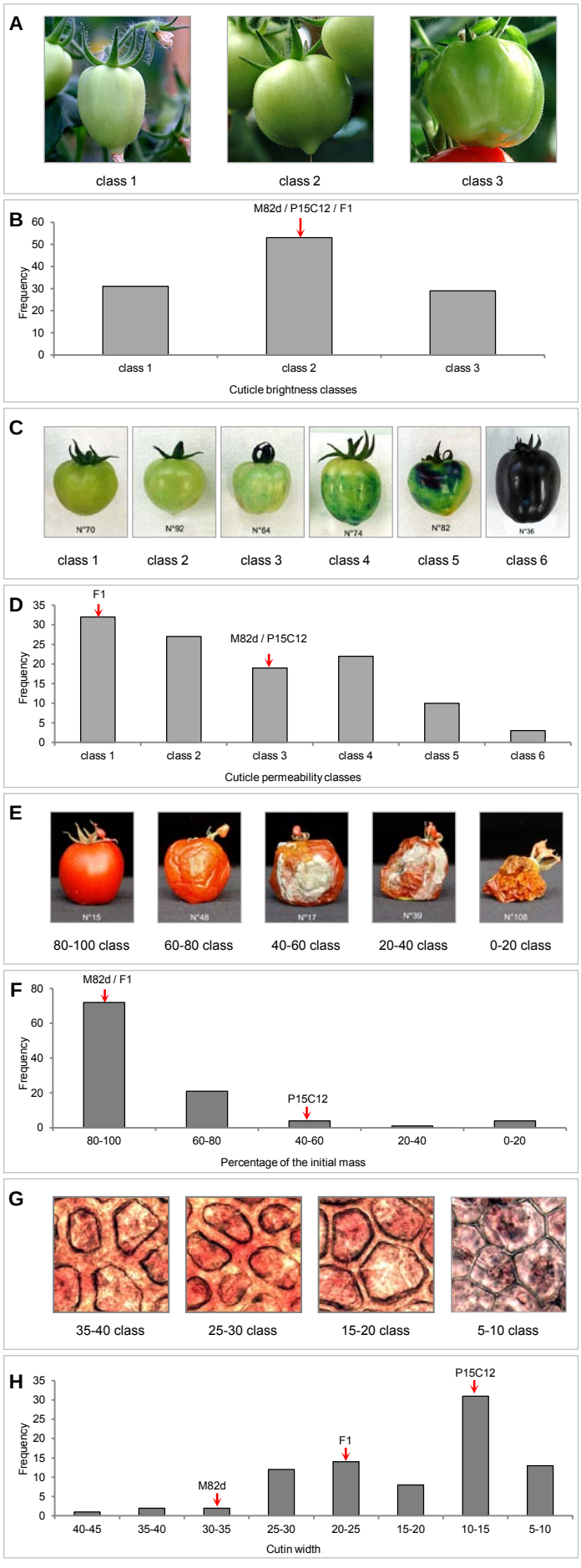


Supplemental figure S5. Variables factor map for wax and cutin components, after a centered PCA analysis. Black arrows and text: variables for cutin data; grey arrows and text: variables for wax data.

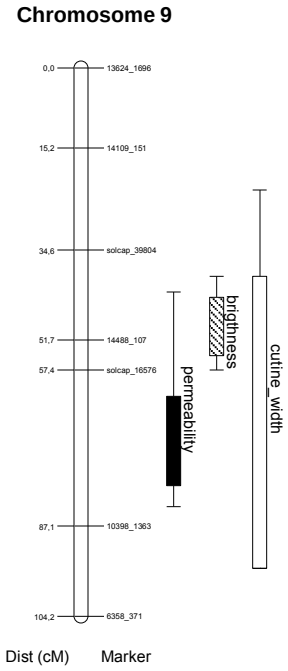
Supplemental figure S6. Photograph of fruits from the P26E8 mutant showing suberin deposition at the distal end of the fruit.



Supplemental figure S7. Microscopic observation of fresh pealed outer epidermis from Red Ripe fruit. Twelve independent measures of the width of the cutinized cell walls were done as indicated by the red arrows. Scale bar = 10 µm.



Supplemental Figure S8. Phenotyping the F2 progeny from the cross M82d x P15C12 . A, Visual scoring of fruit brightness performed on Mature Green fruits. B, Distribution of the F2 progeny for fruit brightness. C, Visual scoring of cuticle permeability to toluidine blue. Intensity of the blue coloration of the fruit surface was visually assessed for scoring fruit permeability. D, Distribution of the F2 progeny for cuticle permeability. E, Water loss in fruit kept for 6 weeks in ambient air at room temperature. Fresh weight of the fruit was measured initially and after the 6 weeks storage period. F, Distribution of the F2 progeny for water loss. Results are expressed as percentage of the initial mass of the fruit. G, Photographs of epidermal cells from fruits from the F2 progeny ranged in the different cutin width classes. Measurements were done as indicated in Supplemental Fig. S6 on fresh pealed outer epidermis of Red Ripe fruits. Twelve independents measures of the width of the cutinized cell wall were done (20x magnification). H, Distribution of the F2 progeny for cutin width. Red arrows indicate the values for M82d, P15C12 mutant and their F1 hybrid.

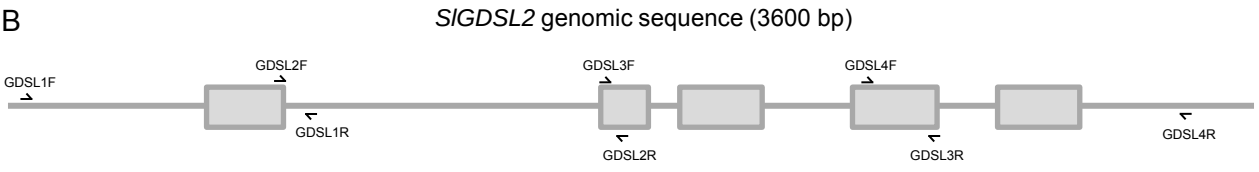


Supplemental Figure S9. Mapping of the P23F12 *glossy* mutant. The three cuticle-related traits (brigthness, permeability, cutin width) were mapped to chromosome 9 as indicated in Materials and Methods for the P15C12 mutant. Genetic distance (cM) is indicated on the left. Markers are indicated on the right. 1-LOD and 2-LOD support intervals of each QTL are marked by boxes and thin bars, respectively.

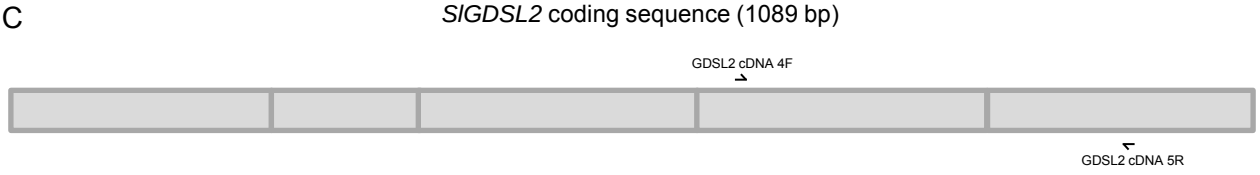
A

Primer name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)
GDSL1F	GCGCAAGACCTCGTAACATT	837
GDSL1R	CCTGATGCAAACATCAGTAACC	
GDSL2F	TGGCTACAACATTCCTGACA	983
GDSL2R	AGTGGTGACTCTGATGAACCAA	
GDSL3F	TCGATCGATCAACTTCGATTATT	978
GDSL3R	TGCATTTGTTGTGTATTTGCAG	
GDSL4F	TAATCTTGGAGCTCGTCGTGTA	907
GDSL4R	CATGCCATGAAACACTGAAAAT	
GDSL2-cDNA-4F	GGAGCTCGTCGTGTAATTGT	342
GDSL2-cDNA-5R	CGCGTAAACATCTCTATTCGG	
GDSL2-53	GCAACACTTCATGTTGTGCTACTT	110
GDSL2-34	CAATATCACACTCCACCCTACAAA	

B



C



Supplemental Figure S10. Nucleotide sequences of the primers used in this study. A, Table of the primer sequences. B, Representation of the *SlGDSL2* genomic sequence with the position of the primers used for mutation detection. C, Representation of the *SlGDSL2* coding sequence with the primers used for cDNA sequencing.

		P3A3	P9H7	P30C12	P1D1	P3H6	P4B6	P5D9	P5E1	P6A2	P6D1
	MMDB fruit brightness data	transparent	transparent	transparent	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy
Brightness	Fruits	normal	glossy	glossy	normal	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy
	Leaves	glossy	normal	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy

		P8A12	P30B6	P18H8	P23F12	P26G3	P26E8	P29G6	P30A12	P11H2	P17F12
	MMDB fruit brightness data	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy
Brightness	Fruits	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy	glossy
	Leaves	normal	normal	glossy	normal	normal	glossy	glossy	glossy	normal	normal

		P45A8	P43E6	P43G7	P30E8	P32H5	P20E10	P23C10	P16D12	P17E3	P14D5
	MMDB fruit brightness data	dull	dull	dull	dull	dull	dull	dull	dull	dull	dull
Brightness	Fruits	dull	dull	dull	dull/glossy	glossy	dull	glossy	dull/glossy	normal/glossy	dull
	Leaves	normal	glossy	glossy	glossy	normal	normal	glossy	normal	normal	glossy

		P16H5	P17A6	P13E8	P15C12	P12H4	P13C12	P6D6	P7H8	P4E2	P5G11
	MMDB fruit brightness data	dull	dull	dull	dull	dull	dull	dull	dull	dull	dull
Brightness	Fruits	dull	dull	normal/dull	glossy	normal/glossy	dull	dull	glossy	glossy	glossy
	Leaves	normal	normal	glossy	normal	normal	normal	glossy	normal	glossy	normal

Supplemental Table S1. Comparison of the plant and fruit brightness data obtained from the MMDB database and from the subsequent observation of the 40 selected families grown in the greenhouse. Fruit brightness was visually assessed by comparison with wild type fruit at Mature Green and Red Ripe stages.

A

		WT		P5E1		P26E8		P15C12		P23F12	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Fatty Acids	C16	1,7	0,8	1,2	0,2	2,9	0,6	0,4	0,1	ND	
	C18:0	4,6	2,8	2,7	1,8	2,2	0,6	0,4	0,0	ND	
	C18:1	2,1	0,5	2,0	0,2	2,3	0,3	ND		ND	
	C18:2	1,2	0,2	1,4	0,6	1,5	0,0	ND		ND	
	C20:0	19,9	13,5	12,4	8,0	7,2	1,5	0,9	0,1	11,77	1,95
	C20:1	6,0	3,4	14,5	1,5	15,8	5,0	0,6	0,1	ND	
	C22:0	5,5	2,3	2,4	0,6	3,6	1,1	6,9	0,5	ND	
Dicarboxylic Acids	C16:0 DCA	15,1	4,0	35,5	7,7	40,2	11,8	1,4	0,1	7,21	1,13
	C18:1 DCA	19,5	11,6	98,7	20,0	98,7	28,4	1,9	0,3	ND	
ω-Hydroxy Acids	C16 WOH	20,1	2,3	22,7	3,5	31,7	4,1	0,8	0,2	ND	
	C18:1 WOH	40,5	25,9	25,5	7,3	34,4	5,4	3,4	1,5	11,95	1,47
	C18:2 WOH	2,7	0,9	7,0	2,4	7,2	2,0	ND		ND	
	C22 WOHdelta	3,7	0,7	3,7	0,8	4,2	0,2	2,1	0,1	7,15	1,47
Cinnamic Acid		14,4	4,7	17,1	3,5	26,2	4,5	5,1	0,8	6,32	0,95
Polyhydroxy Acids	C16diOH	347,9	95,3	308,8	28,6	375,4	40,9	45,1	6,0	74,25	6,97
	C18polyOH	34,6	17,9	38,7	31,4	55,6	37,1	11,4	1,7	26,52	3,44
2-Hydroxy Fatty Acids	2 OH C20:0	5,9	1,5	12,4	2,0	12,8	0,5	0,5	0,0	ND	
	2 OH C24:0	1,5	0,4	1,3	0,5	1,4	0,2	1,0	0,3	ND	
Fatty Alcohols	1OH C20:0	18,2	6,1	55,3	11,5	62,4	14,9	1,8	0,4	10,35	1,59
	1OH C22 delta	25,0	18,3	56,6	13,4	67,7	18,1	0,4	0,0	ND	
	1OH C22:0	3,5	1,2	3,9	1,3	7,2	4,7	1,2	0,1	5,70	0,39

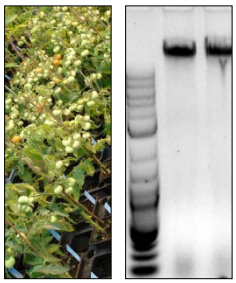
B

	WT		P5E1		P26E8		P15C12		P23F12	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Fatty Acid C16	0,58	0,18	0,90	0,55	0,80	0,28	0,77	0,44	0,89	0,09
Fatty Acid C18	0,43	0,17	1,43	0,52	0,69	0,23	ND		0,69	0,29
Fatty Acid C24	1,00	0,26	1,72	0,53	1,75	0,42	0,28	0,12	0,29	0,00
Alcohol C24	0,66	0,35	0,83	0,28	2,96	1,33	0,82	0,34	2,14	0,22
Alcohol C26	0,34	0,15	0,42	0,14	1,85	0,69	0,51	0,17	0,12	0,00
Alcohol C32	0,53	0,20	0,55	0,10	1,27	0,12	1,70	0,57	0,08	0,00
Alkane C25	0,42	0,19	0,65	3,84	0,49	0,14	0,37	0,17	0,94	0,45
Alkane C26	4,07	1,21	7,55	3,53	6,46	1,11	ND		3,00	0,10
Alkane C27	0,86	0,73	1,23	0,20	0,54	0,24	1,85	0,61	1,77	0,40
Alkane C28	1,13	0,31	1,36	3,66	1,04	0,37	2,10	0,70	2,92	0,82
Alkane C29	5,53	1,29	7,89	2,76	6,18	0,85	10,29	2,53	7,96	1,24
Alkane C30	2,14	0,32	3,11	8,78	1,46	0,13	1,72	0,69	3,00	0,37
Alkane C31	20,14	2,68	19,02	8,58	67,27	5,18	28,17	3,44	26,79	6,09
Alkane C32	2,63	0,58	3,46	2,37	2,23	0,33	1,35	0,28	3,27	0,46
Alkane C33	4,04	1,19	7,77	3,96	4,03	0,30	5,91	0,67	9,34	2,29
Alkane C34	0,58	0,22	0,53	0,14	0,84	0,06	1,61	0,30	1,86	0,42
Alkane C35	0,40	0,15	0,29	0,22	0,90	0,19	0,44	0,08	0,21	0,00
Iso Alkane C26	0,35	0,15	0,57	0,23	0,38	0,03	0,54	0,24	0,76	0,27
Iso Alkane C29	0,62	0,34	0,87	0,26	0,52	0,19	1,27	0,32	1,16	0,29
Iso Alkane C30	0,34	0,11	0,41	1,32	0,63	0,16	1,13	0,40	0,20	0,00
Iso Alkane C31	2,44	0,54	2,78	1,12	2,63	0,32	1,98	0,37	2,67	0,24
Iso Alkane C32	0,94	0,18	0,78	0,43	1,27	0,05	0,91	0,19	0,87	0,23
Tocopherol	ND		ND		0,41	0,09	ND		0,11	0,00
Gamma Tocopherol	0,54	0,22	0,72	0,31	0,89	0,05	ND		0,51	0,43
Alpha Amyrin	2,79	2,15	1,19	2,20	10,00	1,18	12,07	1,46	3,56	1,04
Beta Amyrin	4,63	2,07	5,19	0,75	5,22	0,29	9,71	1,32	17,22	4,17
Delta Amyrin	3,57	0,93	4,09	6,32	11,80	1,58	4,07	0,70	9,98	1,96

Supplemental Table S2. A, Cutin composition of fruit cuticle from wild type and 4 selected tomato mutants. Mean values (µg.cm-²) of each compound are given with SD (n=4). B, Wax composition of fruit cuticle from wild type and 4 selected tomato mutants. Mean values (µg.cm^{-2} x10) of each compounds are given with SD (n=4). ND: not detected. Unidentified compounds are not included in the table.

	cell number
WT	18,0 ± 0,8
P18H8	21,8 ± 0,5
P17F12	20,8 ± 1,0
P23F12	17,8 ± 1,0
P15C12	18,5 ± 1,9
P6D6	29,8 ± 0,5
P16H5	40,0 ± 2,2

Supplemental Table S2. Mean density of fruit epidermal cells in the indicated mutants. Cell counting was performed on 4 independent sections (0.09 mm²) of Red Ripe fruit pericarp observed under microscope at 10x magnification after staining with 0.1% toluidine blue. Mean values are given with SD (n=4).



Partie 2

Etude de 3 mutants cuticulaires remarquables issus du crible de la collection EMS Micro-Tom

Chapitre 2 : Résultats & discussion

Partie II

Etude de 3 mutants cuticulaires remarquables issus du criblage de la collection EMS Micro-Tom

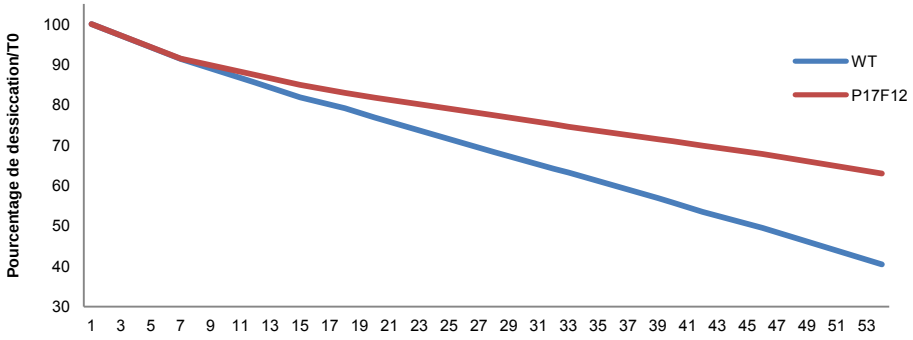
Le criblage de la collection EMS Micro-Tom a permis d'identifier 24 mutants à la brillance de surface modifiée (Cf. chapitre 2, partie I). La mutation du candidat P15C12, le plus affecté au niveau de son contenu en cutine, a été identifiée comme étant un nouvel allèle hypomorphique du gène *GDSL2*, codant pour une enzyme lipase hydrolase à motif GDSL. D'autres candidats ont montré des profils cuticulaires remarquables, avec des propriétés associées à la cuticule modifiées. Une sélection de mutants à analyser de façon plus approfondie a été réalisée avec pour objectif la détection de la mutation responsable du phénotype. Une des conclusions de l'étude des mutants de brillance est que la quantité de cutine semble l'élément discriminant chez les mutants de tomate affectés au niveau de la cuticule Ce sont donc naturellement les mutants aux valeurs les plus extrêmes qui ont été privilégiés avec le choix du mutant à la teneur en cutine la plus élevée, le P17F12 (1175,5 µg cm^{-2}) et les 2 mutants encore inconnus présentant les valeurs les plus faibles, P30B6 (285 µg cm^{-2}) et P23F12 (162,6 µg cm^{-2}).

Pour les différents mutants étudiés de façon plus approfondie, la stratégie était la même que celle préalablement adoptée pour la caractérisation et l'identification du mutant gdsl2-b : *(i)* caractérisation physiologique du mutant et plus particulièrement de la cuticule du fruit (brillance, déshydratation, perméabilité à un colorant, architecture de la cuticule) et *(ii)* , lorsque cela était possible (P30B6, P23F12), génération d'une population de cartographie par croisement avec le génotype M82 dwarf, phénotypage de la population F2 étudiée et analyse QTL des caractères étudiés. Comme indiqué précédemment (Partie I), celle-ci vise à identifier la où les régions chromosomiques contrôlant les variations quantitatives des caractères étudiés (brillance, déshydratation, perméabilité …) et à rechercher le QTL majeur correspondant à la mutation causale.

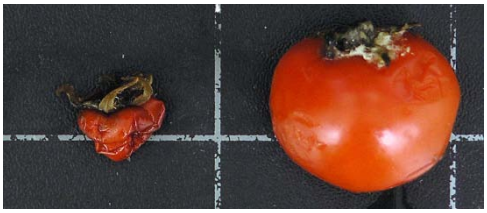
1. Mutant P17F12

Le mutant P17F12 présente des caractéristiques exceptionnelles quant à sa composition cuticulaire. Par rapport au fruit de Micro-Tom de type sauvage, la charge en cires de P17F12 est 1,7 fois supérieure et sa charge en cutine est doublée. De façon surprenante, l'épaisseur de la cuticule du mutant n'est pas significativement augmentée. Des analyses ont été menées afin d'évaluer les conséquences de ces variations de composition sur les propriétés de la cuticule du mutant P17F12.

A



B



WT **P17F12**

Figure 59 : Comparaison de la dessiccation des fruits de Micro-Tom WT et de P17F12. A. Suivi de la masse d'un fruit RR conservé à T°C ambiante pendant 53 jours, exprimé en pourcentage de dessiccation par rapport à la masse d'origine. B. Illustration de fruits de Micro-Tom WT et de P17F12 après conservation 1 an à 4°C.

1.1 Analyse de la résistance à la dessiccation

Une des propriétés majeures de la cuticule est de limiter les pertes en eau astomatiques (Kerstiens, 1996). Afin d'étudier la relation existant entre la composition de la cuticule et sa résistance à la dessiccation (Bargel et Neinhuis, 2004 ; Vogg *et al*., 2004), un test de dessiccation a été réalisé sur un fruit représentatif du mutant P17F12, comparé à un fruit de Micro-Tom WT, au stade RR. Le fruit du mutant P17F12 présentant une augmentation en cutine et en cires, l'analyse des conséquences de cette composition sur la résistance à la dessiccation du fruit peut s'avérer informative. Les 2 fruits ont été conservés 53 jours à température ambiante dans une enceinte close et des mesures de masse ont été réalisées à intervalles réguliers. Il est intéressant de noter que le comportement des 2 fruits est pratiquement identique pendant les 6 premiers jours, où la perte en masse est estimée à 8,6% pour le fruit de type WT et 8,5% pour le fruit de P17F12 (figure 59A). A partir de là, la résistance à la dessiccation des 2 fruits diffère et le WT perd en moyenne 1,1 % de sa masse par jour pour arriver à 40,5 % de sa masse initiale au bout de 53 jours, alors que le fruit de P17F12 subit une perte moyenne de 0,6 % de sa masse par jour. Au bout de 53 jours, le fruit de P17F12 a conservé 63 % de sa masse initiale. Une autre illustration des propriétés de résistance à la dessiccation des fruits du mutant P17F12 est donnée par la conservation de fruits WT et P17F12 de diamètre et de masse équivalent à 4°C pendant 1 an. Alors que le fruit du WT est pratiquement sec, le fruit du P17F12 a gardé la majeure partie de son eau. Quelques zones à la surface montrent un flétrissement et le fruit a perdu une partie de sa rigidité, mais il reste remarquablement bien conservé (figure 59B).

La composition de la cuticule et les propriétés de résistance à la dessiccation sont liées mais la part relative de la cutine et des cires dans le phénomène ne peut être assignée avec ces expériences (Parsons *et al*, 2012). Les mutants affectés au niveau de la cuticule décrits dans la littérature sont généralement caractérisés par une sensibilité accrue à la dessiccation, chez *Arabidopsis* avec le mutant *att1* (Xiao *et al*., 2004) ou chez la tomate avec les mutants Micro-Tom *Slcer6* (Vogg *et al*., 2004) ou M82 *cd1* (Issacson *et al*., 2009). Cependant, un cultivar de tomate appelé Delayed Fruit Deterioration (DMD), présente des caractéristiques de dessiccation, et par extension de conservation, hors du commun (Saladié et al., 2007), qui peuvent être rapprochées de celles de P17F12. Le cultivar DMD présente également des propriétés mécaniques modifiées, avec une cuticule plus rigide et plus solide. Il a été mentionné précédemment que l'épaisseur de la cuticule n'est que faiblement augmentée dans le fruit de P17F12, ce qui pourrait suggérer une densité accrue du polymère, par un niveau de réticulation supérieur par exemple. Lors des prélèvements de

cuticule du fruit de P17F12, un niveau de rigidité exceptionnel a été constaté chez ce mutant, avec une cuticule présentant une texture proche d'un revêtement plastique (données non présentées). Cette notion de densité de polymère peut d'ailleurs être reflétée indirectement par la mesure de la masse de la cuticule, pour une surface donnée, comme réalisée avec le mutant *Slcyp86a69* (Shi *et al.*, 2013). Le cultivar DMD a été caractérisé par une accumulation tardive de monomères de cutine au cours de la maturation, modifiant ainsi sa charge totale de cutine. Les auteurs suggèrent que la densité du polymère de cutine du cultivar DMD serait à l'origine des propriétés de résistance accrue à la dessiccation, sans en connaître les déterminismes génétiques ou moléculaires (Saladié *et al*., 2007). Une analyse précise du développement des fruits de P17F12 pourrait permettre de déterminer si le délai de maturation est affecté chez ce mutant. De plus, une cinétique de la synthèse des monomères de cutine au cours des phases tardives de développement du fruit, liées à la maturation, pourrait indiquer si des mécanismes d'accumulation sont communs avec DMD.

1.2 Analyse de l'expression des gènes cuticulaires chez P17F12

L'analyse de la composition lipidique de la cuticule du mutant P17F12 a montré une augmentation de la quantité globale de cutine, avec une modification de la répartition de certains composés par rapport au WT (Cf. Chapitre 2, partie I Table II). Afin d'évaluer si une modification du niveau d'expression des gènes associés à la cutine était détectée chez P17F12, l'expression des gènes liés à la biosynthèse de la cutine, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cuticule a été réalisée sur des ARN extraits des cellules épidermiques de fruits au stade RR. Les gènes choisis pour cibler la synthèse des composés cuticulaires sont *Long Chain Acyl CoA Synthetase 1* (*LACS1*), intervenant dans l'activation des acides gras (Lü *et al*., 2009), *Glycérol-3 Phosphate Acyltransférase 4* (*GPAT4*), permettant le transfert des groupements acyl sur un résidu glycérol (Chen *et al.*, 2011), *Hothead* (*HOT*) et 2 gènes proches *Hothead like 1* et *Hothead like 2* (*HTH1* et *HTH2*), intervenant dans la synthèse des acides dicarboxyliques (Krolikowski *et al*., 2003). Pour étudier le transport des composés cuticulaires, le transporteur à ATP Binding Cassette de la sous famille G (*ABCG12*), transporteur localisé au niveau de la membrane plasmique (Bird *et al*., 2007) et 2 gènes codant pour des Non-Specific Lipid Transfer Protein (*nsLTP1* et *nsLTP2,* Le *et al*., 2006), des transporteurs de lipides apoplastiques, ont été utilisés. Pour l'analyse des gènes liés à la polymérisation, les gènes *BODYGUARD* (*BDG*), codant pour une enzyme de type α/β-hydrolase liée à la mise en place du polymère de cutine (Kurdyukov *et al*, 2006a), et *GDSL2*, codant pour une protéine lipase hydrolase à motif GDSL, permettant l'estérification des monomères de cutine dans le squelette de cutine (Girard *et al.*, 2012 ; Yeats *et al*., 2012b) ont été choisis. Enfin, 2 gènes de régulation de la voie ont été

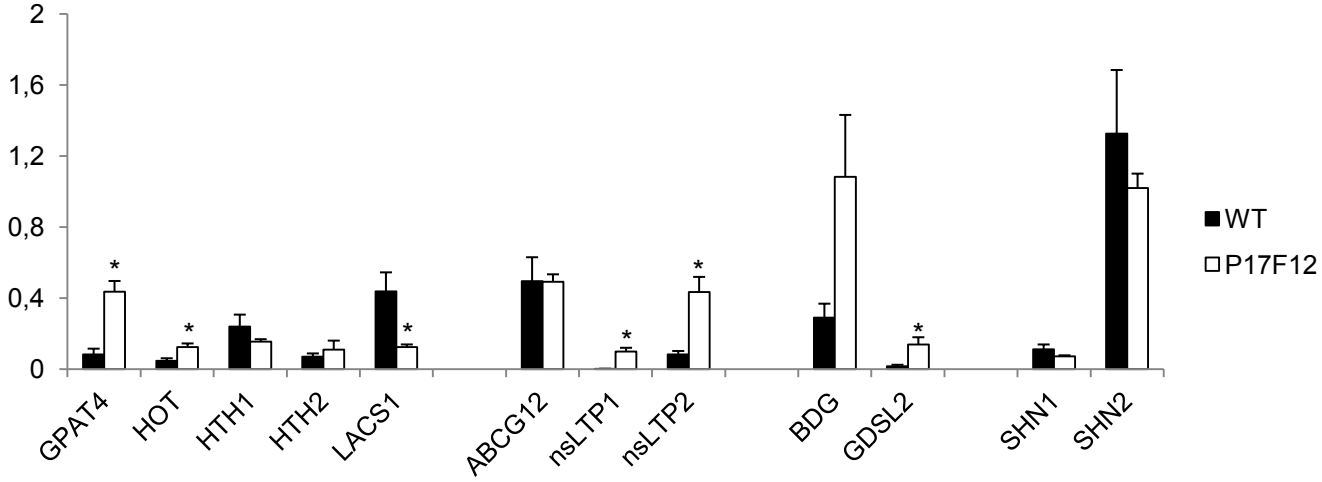


Figure 60 : Analyse de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cutine sur de la cuticule de fruits de tomate au stade RR, chez Micro-Tom WT et le mutant P17F12. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des répétitions avec les barres d'erreurs (n=2). L'astérisque indique une différence significative par rapport au control WT ($P<0.01$) obtenue par un test *t* de Student.

sélectionnés, *SHN1* et *SHN2*, codant pour des facteurs de transcription de type AP2/ERBP (Broun *et al*., 2004 ; Aharoni et *al*., 2004 ; Mintz-Oron *et al*., 2008).

Les analyses récentes et l'avancement des connaissances montrent que la sélection des gènes opérée au moment de l'étude ne s'avère plus aussi pertinente sur plusieurs points. Tout d'abord, la protéine HOTHEAD intervient dans la synthèse des acides dicarboxyliques chez *Arabidopsis* (Krolikowski *et al*., 2003) mais la composition de la cutine des parties végétatives d'*A*. *thaliana* est très particulière. En effet, chez les autres plantes, et notamment la tomate, les acides dicarboxyliques sont des composés très minoritaires. Le gène *LACS2* est associé à la synthèse de la cutine (Weng *et al*., 2010) mais son homologue n'a pas été identifié chez la tomate au moment de l'étude. *LACS1* code pour une protéine dont l'activité est assez ubiquitaire, intervenant dans la synthèse des cires chez *Arabidopsis* mais pouvant remplacer LACS2 pour la synthèse des monomères de cutine (Weng *et al*., 2010) et LACS9 dans la synthèse des triacylglycérols, au niveau des plastes (Zhao *et al*., 2010). L'analyse de l'expression de ce gène peut donc être intéressante à étudier dans le contexte d'un mutant cuticulaire. Par contre, l'étude de l'expression du transporteur ABCG12 ne peut pas apporter d'information sur le transport des monomères de cutine puisqu'il a été associé par la suite à l'export des cires, en complexe avec ABCG11 (McFarlane *et al*., 2010). Il aurait été intéressant d'évaluer l'expression de *CYP86A8* / *LACERATA*, l'ω-hydroxylase majeure chez *Arabidopsis* (Wellesen *et al*., 2001) mais son homologue n'avait pas été identifié chez la tomate au moment de la mise en place de cette étude. La recherche d'orthologues entre les gènes d'*Arabidopsis* et de tomate s'est avérée difficile de par l'indisponibilité du génome de la tomate avant 2012 et l'appartenance de nombreux acteurs de la voie de synthèse de la cuticule à des familles multigéniques, aux séquences très proches. La recherche dans les bases de données ne permettait pas d'identifier un candidat potentiel au sein des familles multigéniques.

Pour ce qui concerne les résultats d'expression des gènes impliqués dans la synthèse des monomères de cutine, ils indiquent que les gènes *HOT* et *GPAT4* sont surexprimés de façon significative (figure 60). L'enzyme GPAT4 est une acyltransférase spécifique des tissus aériens, localisée dans le RE des cellules épidermiques, permettant l'estérification des groupements acyl à la position 2 du glycérol (Suh *et al*., 2005 ; Chen *et al*., 2011). GPAT4 intervient plus particulièrement dans la synthèse de la cutine (Li *et al*., 2007). Le mutant P17F12 présentant une charge de cutine augmentée d'un facteur 2 par rapport au type sauvage, la surexpression de *GPAT4* semble cohérente. Le gène *HOT* intervient potentiellement dans la synthèse des acides dicarboxyliques chez *Arabidopsis* et sa surexpression se traduit chez P17F12 par une quantité triplée par rapport à un fruit WT. Le gène *LACS1* voit son expression diminuée de façon significative mais il n'est pas

forcément le candidat le plus adéquat à analyser de par son rôle assez ubiquitaire. Cependant, *LACS1* intervient également dans la formation de la tryphine du pollen (Jessen *et al*, 2011) et sa sous-expression serait susceptible d'avoir des conséquences sur la fertilité du mutant P17F12. Il est donc intéressant de constater que certains gènes impliqués dans la synthèse de cutine sont surexprimés, comme *GPAT4* et *HOT,* mais les informations d'expression concernant des gènes spécifiques de la cutine sont manquantes, tels *CYP86A8* (Wellesen *et al*., 2001), l'ω-hydroxylase des acides gras en C16 ou bien *CYP77A4*, l'expoxydase de milieu de chaîne (Sauveplane *et al*., 2009).

En ce qui concerne l'expression des gènes impliqués dans le transport, le gène ABCG12 ne montre pas de différence d'expression, mais son rôle concerne le transport des cires. Pourtant, le mutant P17F12 montre une augmentation significative de sa quantité de cires cuticulaires par rapport au WT (+70%) ce qui aurait pu laisser penser que les gènes liés au transport seraient perturbés. Le transporteur ABCG12, de par son implication dans le transport des cires à travers la membrane plasmique, semblait être un candidat intéressant (Pighin *et al*., 2004 ; McFarlane *et al*., 2010). Il est possible que d'autres acteurs interviennent dans le transport des cires ou bien que le système d'ABCG transporteur en place soit suffisamment efficace pour prendre en charge un transport d'une quantité majorée de cires.

De façon très intéressante, l'expression des 2 gènes codant pour les nsLTP est significativement augmentée chez le mutant P17F12 par rapport au WT. Les nsLTP sont des protéines basiques de petites tailles qui ont la capacité de transférer des phospholipides (Kader *et al*., 1984). Ils sont des candidats pour le transport apoplastique de par leur capacité de liaison à des substrats lipidiques variés et leur localisation extracellulaire (Yeats et Rose, 2008). Cette surexpression peut traduire la conséquence d'un flux plus important de composés à exporter dans le milieu apoplastique.

Les données fournies par l'analyse de l'expression des gènes liés à la polymérisation de la cutine sont aussi remarquables. En effet, les 2 gènes étudiés, *BDG* et *GDSL2* montrent une forte surexpression (bien que non significative à $P<0.01$ pour *BDG*). La protéine codée par *BDG* est étroitement liée à la formation du polymère de cutine (Kurdyukov *et al*, 2006a) et à la régulation de la biosynthèse de l'acide abscissique par le stress osmotique (Wang *et al.*, 2011 ; Lisso *et al*., 2012). Son rôle est encore aujourd'hui difficile à établir dans le contexte d'une modification de la quantité de cuticule. Par contre, GDSL2 est identifiée comme l'enzyme responsable de la polymérisation des monomères de cutine (Girard *et al.*, 2012 ; Yeats *et al*., 2012a). Sa surexpression semble cohérente chez un mutant présentant des taux de cutine plus importants que chez le WT.

Les gènes de régulation *SHN1* et *SHN2* codent pour des facteurs de transcription intervenant dans une modulation globale des voies de synthèses cuticulaires (Kannangara *et al*., 2007 ; Shi *et al*., 2011). Chez la tomate, il a été montré que SHN2 active les voies de synthèses des cires et de la cutine (Mintz-Oron *et al*., 2008). Cependant, l'analyse de l'expression de ces gènes ne montre aucun différentiel par rapport aux expressions mesurées chez le WT. Un très grand nombre de gènes de régulation ont été identifiés depuis, tels que *SlMYB12* (Adatao *et al*., 2009), *MYB106* et *MYB16* (Oshima *et al*., 2013), *SHN3* (Shi *et al*., 2013) ou *HDG1* (Wu *et al*., 2011), qui pourraient s'avérer être des candidats intéressants à tester chez P17F12.

Ces résultats d'analyse d'expression montrent que des acteurs impliqués dans la voie de synthèse de la cutine sont fortement surexprimés, dans un contexte de production de cutine très augmentée. Cependant, le choix restreint de candidats entraîne une vision parcellaire des mécanismes mis en jeu et rend l'interprétation des résultats délicate. Récemment, des données issues d'analyses du transcriptome à haut débit sur tissus ciblés de tomate (Matas *et al*., 2011 ; Filippis *et al*., 2013) et la séquence du génome de la tomate (Tomato Genome Consortium, 2012) sont disponibles. Ces données permettront de définir un ensemble de gènes candidats plus exhaustif mais le choix des gènes orthologues entre *Arabidopsis* et tomate reste entier. Considérer l'ensemble des gènes de chaque famille multigénique serait une tâche complexe et coûteuse, difficile à réaliser en qPCR. Les techniques de RNA Sequencing sont aujourd'hui plus accessibles en terme de coût et de nombreux travaux démontrent la puissance de cette approche pour mettre en évidence des transcrits différentiels, même peu exprimés (Martin *et al*., 2013 ; Filippis *et al*., 2013 ; Yazawa *et al.*, 2013 ; Sekhon *et al*., 2013). Une analyse du transcriptome à haut débit du mutant P17F12 est donc à envisager pour obtenir l'ensemble des données d'expression, évitant ainsi la recherche des gènes cibles.

Enfin, une autre limite des analyses d'expression effectuées réside dans le choix du stade des fruits. Le stade RR a été choisi pour les analyses biochimiques car en fin de développement du fruit, la quantité de cuticule est maximum (Bargel et Neinhuis, 2005) et la maturation provoquant une dégradation des parois, elle facilite le prélèvement de la cuticule et l'élimination des cellules du péricarpe. Par contre, au niveau moléculaire, même si la facilité d'élimination des cellules sous épidermiques permet une meilleure sélection des couches cuticulaires, l'activité transcriptionnelle des gènes liés à la cuticule est assez faible (Yeats *et al*., 2012a). Des analyses d'expression de gènes sur des tissus à des stades plus jeunes, comme des fruits à 20 JAA, permettraient d'obtenir des informations plus pertinentes.

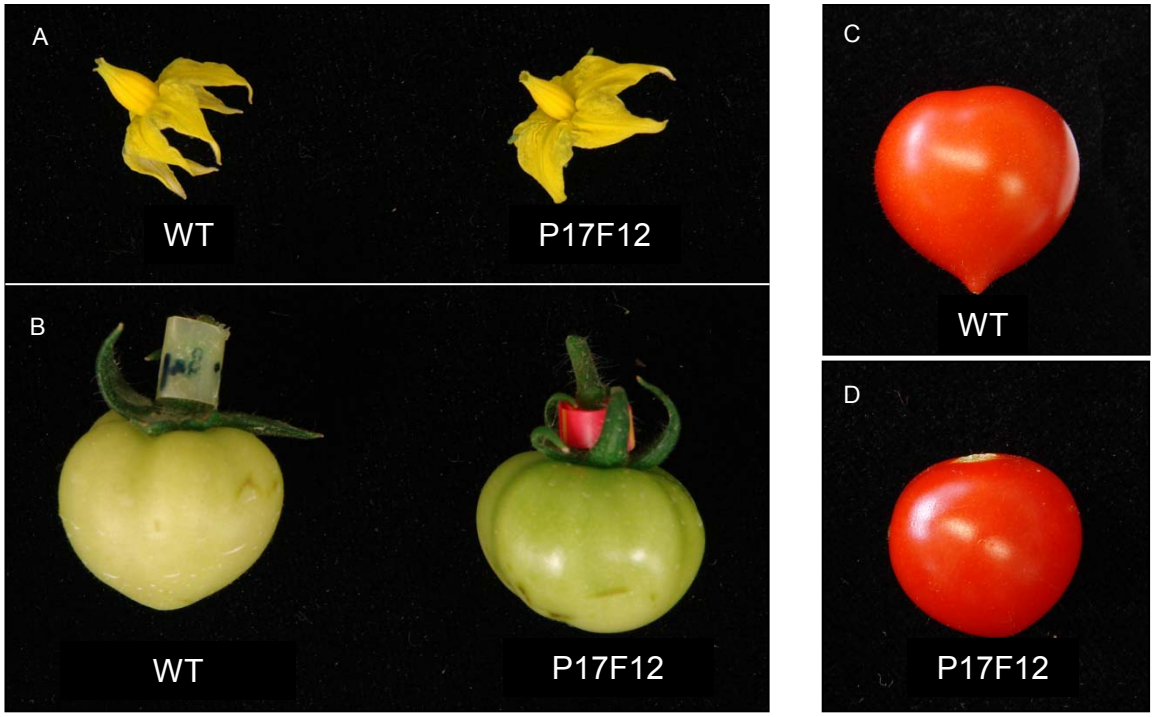


Figure 61 : Illustration des différences morphologiques entre les fleurs d'une plante Micro-Tom WT et du mutant P17F12. A : Aspect fleur entière; B. Aspect du fruit au stade MG; C : Aspect du fruit WT au stade RR; D : Aspect du fruit P17F12 au stade RR.

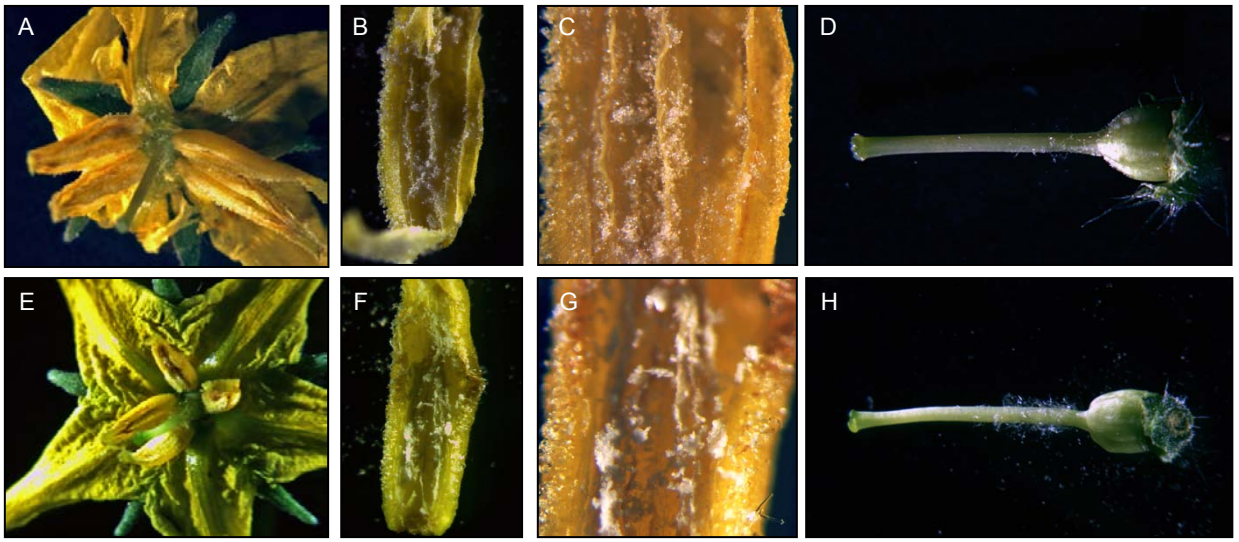


Figure 62 : Illustration des différences morphologiques entre les fleurs d'une plante Micro-Tom WT et du mutant P17F12. A-D. WT; E-H : P17F12. A, E : Fleur ouverte avec anthères écartées; B, C : Anthère ouverte ; F, G : idem grossissement supérieur; D, H : Ovaire, style et stigmate.

1.3 Analyses morphologiques des fleurs et des fruits de P17F12

Afin de pouvoir identifier la mutation affectant P17F12, une approche de cartographie est envisagée qui nécessite la génération d'une descendance en ségrégation. Or, la formation des fruits de P17F12 semble systématiquement avoir lieu sans fécondation de la plante, l'ensemble des fruits étant parthénocarpique. Les fruits du mutant P17F12 sont caractérisés par une brillance remarquable, que ce soit au stade MG (figure 61B) ou stade RR (figure 61C-D). Les fruits présentent un aspect moins cordiforme que les fruits de type sauvage quel que soit le stade de développement considéré avec, au stade MG, une coloration verte plus soutenue que le WT. Des analyses phénotypiques et morphologiques des fruits et des fleurs ont été réalisées afin de cerner une cause potentielle de la parthénocarpie. L'examen phénotypique des fleurs (figure 61A) montre un cône d'anthère plus court et plus fin que celui de la fleur du type sauvage. Un examen morphologique des parties florales de P17F12 montre des anthères peu volumineuses (figure 62E), caractérisées par une absence de pollen (figure 62F-G). Cette parthénocarpie est retrouvée chez certains mutants cuticulaires de tomate, comme *Slcer6*, dont la mutation d'une β-Ketoacyl-Coenzyme A Synthase (KCS) perturbe la gamétogénèse (Smirnova *et al*, 2013). De plus, le mutant *Slcer6* présente des pièces florales soudées mais chez le mutant P17F12, lors des observations macroscopiques, aucun organe floral n'est apparu fusionné. Il est intéressant de noter que lors des analyses de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, le gène *LACS1* était significativement réprimé chez le mutant P17F12. Ce gène intervient dans la formation de la tryphine du pollen (Jessen *et al*, 2011), une couche protéo-lipidique déposée à la surface de l'exine du pollen (Dickinson et Lewis, 1973), essentielle au bon développement du pollen, notamment lors de l'hydratation (Preuss *et al*., 1993). Des mutants alléliques de *cer1*, *cer3* et *cer6* trouvés chez *Arabidopsis* ont également montré des défauts liés à la tryphine, conduisant à une stérilité mâle (Hülskamp *et al*., 1995). Il est donc possible que les modifications cuticulaires affectant le mutant P17F12 perturbent aussi la mise en place de ses gamètes mâles. Des essais de croisements avec du pollen WT sur des fleurs P17F12 ont également été réalisés mais n'ont donné aucun résultat. La cuticule étant présente à la surface des cellules épidermiques différenciées des papilles stigmatiques, il a été montré que des différences dans les compositions cuticulaires étaient susceptibles d'affecter la fertilité (Lolle et Pruitt, 1999). Enfin, le style du mutant P17F12 semble aussi affecté, avec une présence systématique de trichomes en nombre élevé sur la partie proche de l'ovaire (figure 62H). Cet effet sur la morphogénèse n'est pas un cas isolé chez les mutants cuticulaires, dont certains peuvent présenter des phénotypes pléiotropiques comme *bodyguard* (Kurdyukov *et al*, 2006a) ou *fiddlehead* (Lolle et al., 1992), avec des perturbations

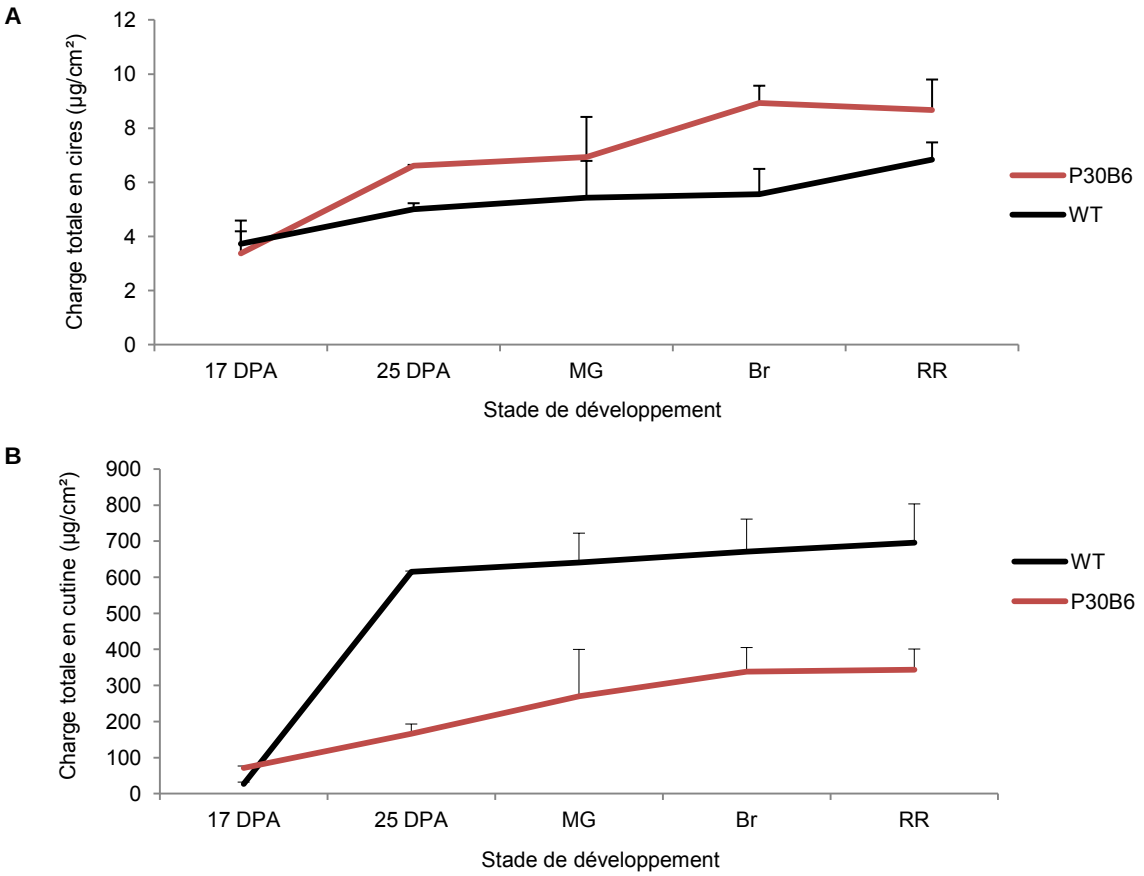


Figure 63 : Charge totale en cires et en cutine de fruits Micro-Tom WT et du mutant P30B6, au cours du développement. A. Charge totale en cires. Les valeurs moyennes sont exprimées en µg/cm² et sont données avec écart type (n=4). Les composés non identifiés ne sont pas inclus dans l'analyse. B. Charge totale en cutine. Les valeurs moyennes sont exprimées en µg/cm² et sont données avec écart type (n=4). Les composés non identifiés ne sont pas inclus dans l'analyse

au niveau des tissus et des organes (Voisin *et al*., 2009). Des effets sur la morphogénèse des trichomes sont également décrits chez des mutants tels que *cutin deficient2* (*cd2* ; Isaacson *et al*., 2009 ; Nadakuduti *et al*., 2012) et *desperado* (*dso* ; Panikashvili *et al*., 2007), illustrant les connections entre les mécanismes de morphogénèse et ceux liés à la mise en place de la cuticule.

Devant l'impossibilité d'obtenir une descendance, l'analyse du mutant P17F12 n'a pas été poussée plus avant.

2. Mutant P30B6

Le mutant P30B6 est un des mutants les plus affectés dans son contenu en cutine, avec une charge réduite de 50%. Cette diminution de la teneur en cutine est due à une baisse de l'ensemble des monomères de cutine, puisque les proportions entre composants sont respectées entre le WT et le mutant P30B6 (cf. Chapitre 2, partie I Table II). La charge en cire est augmentée de 27,7% par rapport au WT, et comme pour la cutine, l'ensemble des proportions entre composés reste préservé.

2.1 Cinétique d'accumulation des composés cuticulaires au cours du développement

Une analyse de l'accumulation des composés cuticulaires, cires et cutine, a été réalisée sur 5 stades de développement du fruit, du stade 17 jours après anthèse (JAA) jusqu'au stade RR. La cinétique d'accumulation peut permettre de voir si les variations observées par rapport au WT dans le chapitre 2 partie I, lors du crible des mutants, sont le résultat d'une perturbation précoce ou bien d'un phénomène plus tardif dans le développement.

L'analyse de la charge en cires cuticulaires au cours du développement montre que les cires sont accumulées de façon très précoce aussi bien chez le fruit WT que chez le mutant P30B6 (figure 63A). A 17 JAA, la charge est presque identique entre les 2 génotypes, avec une moyenne de 3,7 µg/cm² pour le WT et 3,4 µg/cm² pour P30B6, ce qui représente pour le WT près de 54% de sa charge finale au stade RR. La charge en cires chez le type sauvage va augmenter progressivement au cours du développement pour atteindre une valeur de 6,84 µg/cm² au stade RR. Le mutant P30B6 va connaître une augmentation de sa charge en cires plus rapide que le WT au stade 25 DPA, avec une charge plus élevée de 32% par rapport au WT. L'accumulation des cires s'effectuera ensuite à des vitesses plus ou moins constantes entre le WT et le mutant P30B6 au cours du développement avec une charge totale au stade RR de 8,67 µg/cm² pour P30B6, soit une différence de 22% avec le WT. Les résultats d'accumulation des cires chez le WT Micro-Tom sont à rapprocher de

ceux obtenus pour le génotype Ailsa Craig (AC), qui montrent également une accumulation progressive des cires épicuticulaires au cours du développement (Kosma *et al.*, 2009). L'accumulation de cires chez le mutant P30B6 semble peu affectée même si une légère différence semble s'établir à 25 JAA. Peu de données d'accumulation de cires sont disponibles à des stades aussi précoces chez des mutants cuticulaires mais des analyses du génotype M82 montrent que les mutants *cd1*, *cd2* et *cd3* connaissent une augmentation de leur charge en cires entre les stades MG et RR comparable à celle mesurée chez P30B6 (Isaacson *et al*., 2009). Les quantifications effectuées sur des stades verts chez les mutants cuticulaires ne révèlent pas de cinétiques profondément modifiées. L'accumulation des cires semble être un phénomène progressif au cours du développement du fruit, partagé par les génotypes décrits dans la littérature.

L'analyse de la charge en cutine chez le fruit de type sauvage montre un profil d'accumulation très différent par rapport à celui des cires (figure 63B). A 17 JAA, la charge en cutine de la cuticule de type WT est de 26,5 µg/cm², soit moins de 4% de la charge finale du stade RR. L'accumulation de la cutine va alors être plus rapide que celle des cires puisqu'au stade suivant, à 25 JAA, la charge de cutine est passée à 614,9 µg/cm², soit 88,5% de la charge finale. A partir de ce stade, la cutine va s'accumuler progressivement pour atteindre une valeur de 695 µg/cm² au stade RR. Chez le mutant P30B6, l'accumulation de la cutine ne va pas connaître cette accélération entre 17 et 25 JAA. A 17JAA, la charge en cutine du mutant P30B6 est de 71,5 µg/cm² (20,8% de la charge finale) mais une accumulation très progressive va avoir lieu jusqu'au stade RR, avec une charge finale de 343 µg/cm², soit une charge inférieure de moitié par rapport au WT. Les valeurs obtenues chez le WT Micro-Tom entre 25 JAA et le stade RR sont comparables aux cinétiques d'accumulation de la cutine observées dans d'autres génotypes comme AC et M82 (Kosma *et al*., 2009 ; Isaacson *et al*., 2009). Cependant, aucune donnée n'est disponible pour des stades antérieurs à 25 JAA, ne permettant pas d'observer l'accumulation très précoce et très rapide des composés comme lors de cette étude. Le mutant P30B6 accumule peu de cutine au cours du développement par rapport au WT mais il parvient toutefois à augmenter entre les stades 17 JAA et RR sa charge en cutine d'un facteur 5. En cela, le mutant P30B6 se révèle très différent des mutants *cd1*, *cd2* et *cd3*, dont les charges en cutine n'évoluent pas entre les stades 25 JAA, MG et RR, et restent respectivement 20, 66 et 25 fois plus basses que la charge du WT, (Isaacson *et al*., 2009).

Ces cinétiques d'accumulation des composés cuticulaires montrent que les différences entre WT et mutant P30B6 s'établissent de façon précoce, avant le stade 25 JAA, principalement pour la cutine. Il est intéressant de noter également que la très forte accumulation de cutine chez le WT entre 17 et 25 JAA est suivie par une progression

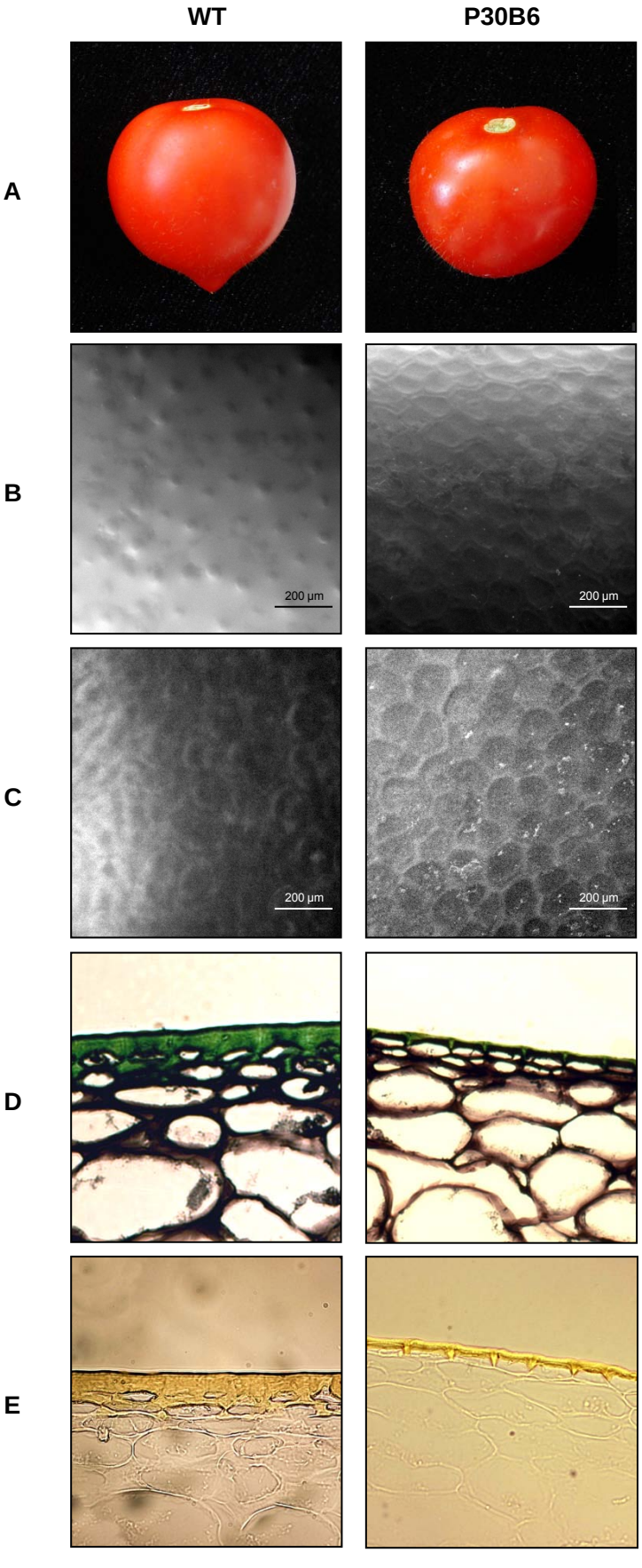


Figure 64 : Observations de la surface et de la cuticule de fruits Red Ripe de Micro-Tom WT et du mutant P30B6. A. Illustration de la brillance de la surface des fruits. B. Microscopie électronique environnementale de la surface de la cuticule couverte par les cires. C. La même zone après 30 sec d'incubation dans du chloroforme. D. Observations en microscopie photonique de sections de péricarpe de fruit colorées en bleu de Coomassie. E. Observations en microscopie photonique de sections de péricarpe de fruit colorées au rouge Soudan IV. F. Mesures de l'épaisseur de la cuticule de sections de péricarpe après coloration au Rouge Soudan IV. Les données représentent la moyenne de 40 mesures sur 3 sections différentes.

beaucoup plus lente de la charge en cutine sur les stades suivants. Ce ralentissement de la vitesse d'accumulation de la cutine correspond à la fin de la période du développement précoce du fruit. Il serait intéressant de pouvoir analyser la charge en cutine sur des stades plus précoces que 17 JAA pour voir si la vitesse d'accumulation de la cutine est corrélée à la vitesse de grandissement du fruit (Chapitre 1, figure 8).

Cependant, la limite de l'isolement manuel de la cuticule sur des fruits plus jeunes se pose, et des solutions basées sur des digestions enzymatiques devront alors être envisagées (Schönherr et Riederer, 1986 ; Shi *et al*., 2013).

2.2 Caractérisation cytologique de P30B6

L'observation macroscopique de la surface de fruits RR de P30B6 montre une brillance accrue par rapport à un fruit contrôle Micro-Tom de type sauvage (figure 64A), comme chez d'autres mutants cuticulaires tels que *cd1* (Isaacson *et al*., 2009), *Slcer6* (Vogg *et al*., 2004) ou *Slcyp86a69* (Shi *et al.*, 2013). Une observation en microscopie électronique à balayage de type environnemental (ESEM) permet d'observer la surface du fruit, recouverte par la cuticule, sans avoir à recourir à des étapes de fixation chimique. Ces observations montrent qu'un fruit de type sauvage se caractérise par une surface ponctuée de dômes réguliers, correspondant aux cellules épidermiques pointant sous la cuticule (figure 64B). Le même type de relief est observé chez des génotypes différents, comme Ailsa Craig (Mintz-Oron *et al.*, 2008). Une fois les cires de surface enlevées par incubation dans du chloroforme, la cutine apparait, formant une surface aux reliefs plus marqués, avec notamment des structures en forme de cadre autour des cellules épidermiques (figure 64C). Celles-ci s'affaissent rapidement sous le faisceau d'électrons du microscope et le dôme est rapidement remplacé par une surface plate voire creuse au centre des cadres. Chez le mutant P30B6, la surface du fruit révèle une surface plane où l'on peut déjà distinguer les cadres de cutine même avec les cires en place. Les cadres apparaissent très nettement une fois les cires enlevées, exhibant des structures géométriques de type polygonal, souvent représentées par des pentagones ou hexagones. L'observation cytologique de coupes de péricarpe après coloration au bleu de Coomassie (figure 64D) ou rouge Soudan IV (figure 64E), colorant spécifique des lipides, illustre bien les différences cuticulaires entre le WT et le mutant P30B6. En effet, l'épaisseur de la cutine de P30B6 est réduite de moitié par rapport au WT (14,0 ± 1,4 au lieu de 26,7 ± 2,2), ce qui se traduit par l'apparition de parties saillantes au dessus des zones intercellulaires des cellules épidermiques, comme des crêtes. Ce type de relief a déjà été caractérisé dans la lignée RNAi *GDSL2* n°4 dont le taux de cutine est réduit de près de 50% (Girard *et al*., 2012) correspondant à des caractéristiques similaires au mutant P30B6. Vues de dessus, ces parties saillantes

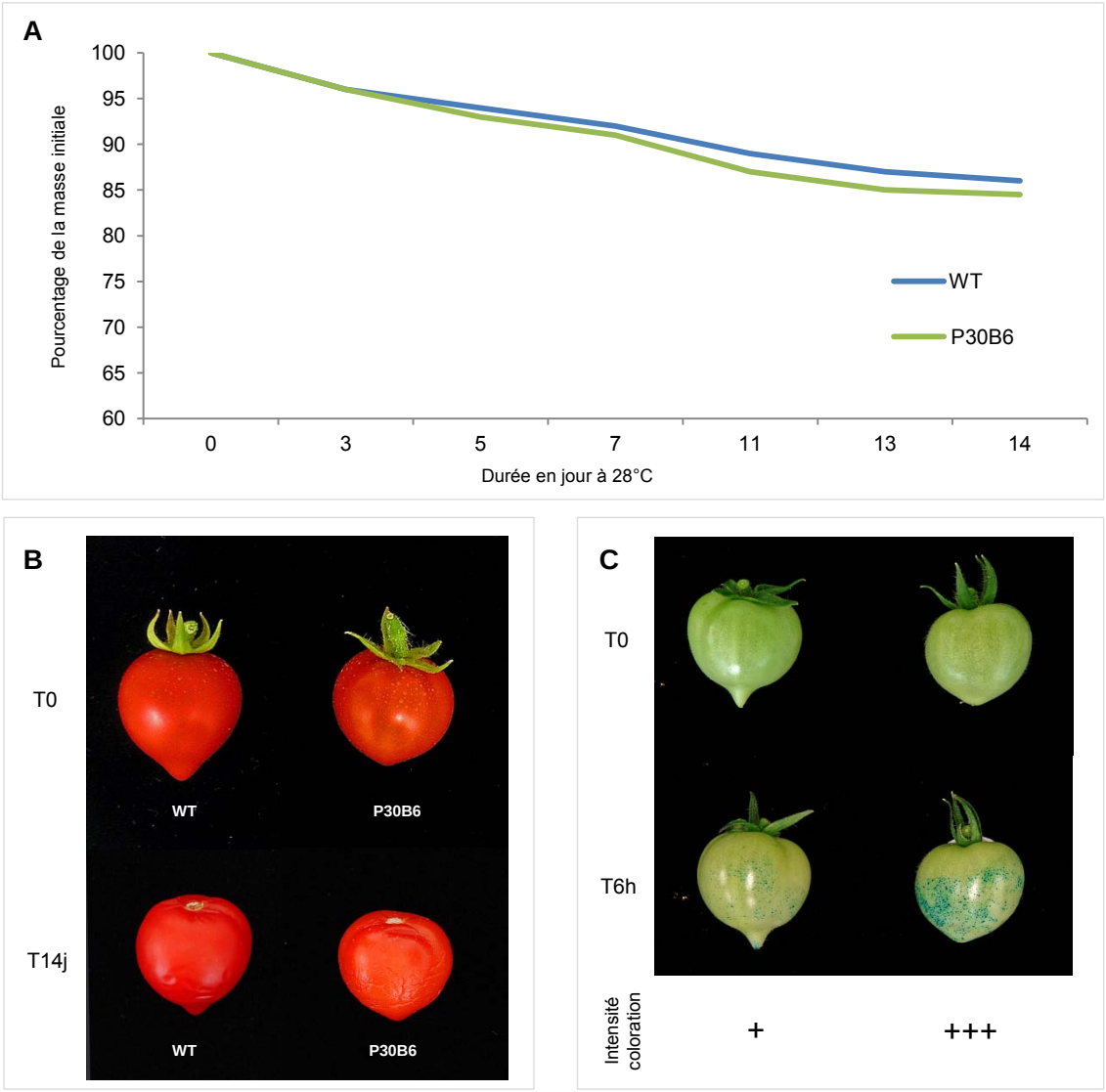


Figure 65 : Analyse de la résistance à la dessiccation et du niveau de perméabilité de fruits de tomate Micro-Tom WT et P30B6. A. Suivi de la dessiccation de fruits au stade Red Ripe, issus du WT et du mutant P30B6, conservé à 28°C pendant 14 jours. B. Aspect des fruits à T0 et T 14 jours. C. Analyse de la perméabilité de fruits de tomate Micro-Tom WT et P30B6 au stade 38 DPA, immergés à 75% dans une solution de bleu de Toluidine à 1%, pendant 6h à T°C ambiante. Les symboles + correspondent à l'intensité de coloration estimée visuellement.

correspondent aux cadres de cutine. Il semble d'après les analyses cytologiques menées dans le Chapitre 2 partie I et chez les mutants *cd2, cd3* (Isaacson *et al*., 2009) et *cyp86a69* (Shi *et al.*, 2013) que ces crêtes disparaissent chez les mutants les plus lourdement déficients en cutine, entrainant un relief parfaitement lisse.

2.3 Propriétés de la cuticule du mutant P30B6

2.3.1 Résistance à la dessiccation

Des analyses ont été entreprises pour caractériser les conséquences des différences compositionnelles et structurelles sur les propriétés cuticulaires des fruits de P30B6. Un test de dessiccation a été réalisé en enceinte close sous air pulsé à 28°C, pendant 14 jours, sur un fruit représentatif de Micro-Tom WT et du mutant P30B6, aux stades RR (figure 65A). De façon surprenante, le mutant P30B6 résiste à la dessiccation de façon quasi identique au fruit de type WT, avec une perte de 15,5% par rapport à sa masse à l'origine, contre 14% pour le WT. L'observation des fruits à la sortie du test montre de fins plissements de l'épiderme, plus nombreux sur le mutant P30B6 que sur le WT, qui peuvent être du à l'épaisseur plus fine de la cuticule (figure 65B). La résistance à la dessiccation de P30B6 ne semble pas affectée alors que ce mutant présente une baisse de moitié de sa teneur en cutine. Un comportement similaire est observé chez les mutants *cd2* et *cd3* (Isaacson *et al*., 2009) pourtant plus fortement affectés dans leur contenu en cutine que le mutant P30B6. Cependant, les génotypes entre les mutants *cd* et les mutants de brillance (M82 et Micro-Tom) sont différents et il a été montré que les propriétés associées à la dessiccation peuvent varier considérablement entre génotypes (Whab-Allah *et al*., 2011). Le mutant P30B6 a une charge en cires au stade RR augmentée de 22% par rapport au WT, ce qui peut permettre à la cuticule de conserver son étanchéité, malgré une quantité de polymère réduite de moitié. Pourtant, les mutants *cd* ne présentent pas de modifications de leur charge en cires (Isaacson *et al.*, 2009) mais résistent efficacement à la dessiccation. Les résultats observés chez P30B6 et ceux obtenus avec les mutants *cd2* et *cd3* semblent montrer que la charge en cutine n'est pas un élément déterminant pour résister à la perte en eau.

2.3.2 Perméabilité cuticulaire

La cuticule forme une barrière étanche permettant de limiter la perte en eau par évaporation. Cette barrière fonctionne aussi dans l'autre sens, en empêchant l'entrée de liquides, de solutés ou de microparticules dans les tissus (Tanaka *et al*., 2004). Cette propriété de protection face à l'entrée de solutés est utilisée pour évaluer le niveau de perméabilité de la cuticule. Le test consiste à incuber un fruit dans du bleu de toluidine 1% et d'évaluer après rinçage le niveau d'entrée du colorant à travers la cuticule. Le test effectué

pendant 6 h sur un fruit Micro-Tom WT révèle que la cuticule du fruit est discontinue par endroit, avec des ponctuations réparties de façon assez homogène sur la surface de la cuticule en présence du colorant (figure 65C). Ces ponctuations peuvent correspondre à d'anciens trichomes, des piqûres d'insectes, des micro-impacts ou bien à des zones présentant un défaut de cuticule. Elles peuvent aussi être dues à des microfissures comme chez le mutant *cwp1*, mais les effets sur la perméabilité sont alors plus importants (Hovav *et al.*, 2007). L'expérience réalisée avec un fruit du mutant P30B6 montre un niveau de coloration bien supérieur au WT, avec une grande densité de ponctuations ainsi que des zones de diffusion autour de ces ponctuations. Ce niveau de perméabilité supérieur suggère un état de la cuticule différent, avec des zones de discontinuité plus importantes chez P30B6 que chez le WT.

Ces résultats sont surprenants car, à la différence du mutant *gdsl2-b* qui présentait une faible résistance à la dessiccation corrélée à une faible perméabilité (Chapitre 2, partie 1, figure 6C), le mutant P30B6 découple ces 2 propriétés qui semblaient jusqu'à présent traduire le même phénomène. L'étude des mutants *cutin deficient* a montré que les 3 mutants *cd* résistaient bien à la dessiccation (plus particulièrement *cd2* et *cd3*) et qu'ils étaient très imperméables au bleu de toluidine (Isaacson *et al*., 2009). Cependant, ces analyses sont réalisées sur un autre génotype que Micro-Tom et des variations importantes dans les propriétés liées à la cuticule peuvent exister. En effet, l'analyse du transformant RNAi *GDSL2* chez WVa106 montre une perméabilité très importante de la cuticule (Girard *et al.*, 2012) alors que *cd1* isolé dans le génotype M82, affecté également au niveau de *GDSL2*, est très imperméable (Isaacson *et al*., 2009). Dans le cas du mutant P30B6, il est important de noter que les tests de dessiccation et de perméabilité ne sont pas réalisés aux mêmes stades de développement (RR et MG) mais le niveau d'écart entre compositions cuticulaires du WT et de P30B6 est constant entre les stades MG et RR. Par rapport à la perméabilité, il est possible que des points d'entrée aux solutés soient plus nombreux en surface, par l'intermédiaire de brèches ou de zones appauvries en cuticule, mais que le soluté ne puisse pas traverser la cuticule jusqu'aux cellules. Cette hypothèse pourrait expliquer la coloration de la surface du fruit et le maintien de son niveau d'étanchéité, permettant de résister à la dessiccation.

2.4 Analyse de l'expression des gènes cuticulaires

Le mutant P30B6 présente des fruits brillants et une charge en cutine diminuée de moitié par rapport au type sauvage, sans bouleversement des proportions des différents constituants de la cutine. Ces caractéristiques phénotypiques et biochimiques du mutant P30B6 peuvent être rapprochées de celles d'une lignée RNAi affectée au niveau du facteur

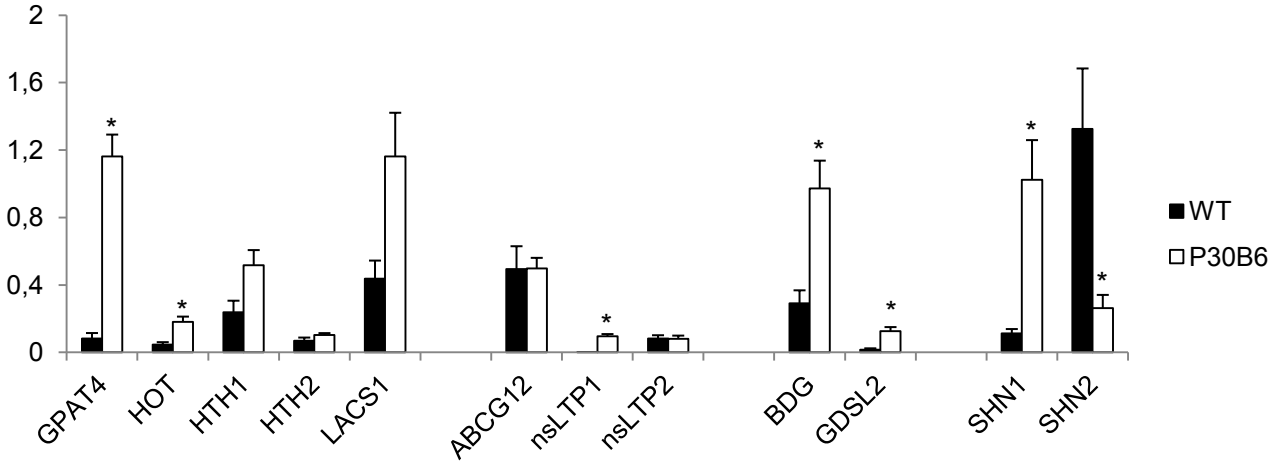


Figure 66 : Analyse de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cutine sur de la cuticule de fruits de tomate au stade RR, chez Micro-Tom WT et le mutant P30B6. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des répétitions avec les barres d'erreurs (n=2). L'astérisque indique une différence significative par rapport au control WT ($P<0.01$) obtenue par un test *t* de Student.

de transcription SHINE3 (Shi *et al*., 2013). La lignée RNAi *SlSHN3* montre une diminution de l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse de la cutine, conduisant à une baisse de la charge en cutine de près de 40% par rapport au type sauvage (Shi *et al*., 2013).

Une analyse de l'expression du même ensemble de gènes étudiés au paragraphe 1.2 a été réalisée sur des ARN extraits de cellules épidermiques, à partir de fruits au stade RR de Micro-Tom WT et du mutant P30B6. Les gènes étudiés, malgré les limitations décrites précédemment, peuvent toutefois permettre d'évaluer les variations d'expressions de gènes impliqués à des niveaux différents de la voie de synthèse. De façon très surprenante, la plupart des gènes étudiés montrent une surexpression par rapport au WT, notamment les gènes liés à la biosynthèse et à la polymérisation (figure 66), suggérant que le cas de figure du mutant P30B6 est différent de la lignée RNAi *SlSHN3*. Cependant, les effets de la mutation sur les gènes *SHN1* et *SHN2* sont intéressants, puisqu'ils adoptent un comportement opposé, avec une surexpression très forte de *SHN1* et une sous-expression très forte de *SHN2*. La lignée RNAi SlSHN3 présente également une sous-expression significative de *SHN2*, mais aucune donnée n'est disponible pour *SHN1* (Shi *et al*., 2013). Au vue de la surexpression de la grande majorité des gènes étudiés, l'hypothèse de l'implication d'un régulateur négatif de la voie ne peut pas être écartée. Des régulateurs négatifs se retrouvent dans de nombreuses voies de biosynthèse comme celle des flavonoïdes, avec l'intervention du gène *atMYBL2* d'*Arabidopsis* (Matsui *et al*., 2008), ou bien celle de la vitamine C avec le gène *AMR1* (Zhang *et al.*, 2009). Des régulateurs négatifs de la voie de synthèse de la cuticule ont été également été caractérisés, comme *atMYB41*, qui en conditions de stress peut inhiber la transcription de gènes impliqués dans la synthèse de cutine (*AAT1*, *LACS2*) ou de la paroi (*EXP10*) (Cominelli *et al*., 2007). De plus, la caractérisation de *CER7* a mis en évidence un complexe protéique responsable de la dégradation d'ARN simple brin, responsable de la régulation négative des transcrits du gène *CER3*, impliqué dans la synthèse des cires (Hooker *et al*., 2007 ; Lam *et al*., 2012). Au-delà de ces candidats, une étude d'expression en RNA Seq pourrait permettre d'isoler d'autres acteurs potentiels, comme des microARN dont le rôle dans la régulation négative post transcriptionnelle a été fréquemment montré (Baulcombe *et al.*, 2004 ; Zhang *et al*., 2006). Comme aucun gène candidat putatif n'a été mis en évidence par l'analyse d'expression de gènes liés à la cuticule, une localisation de la mutation a été recherchée par une approche de cartographie.

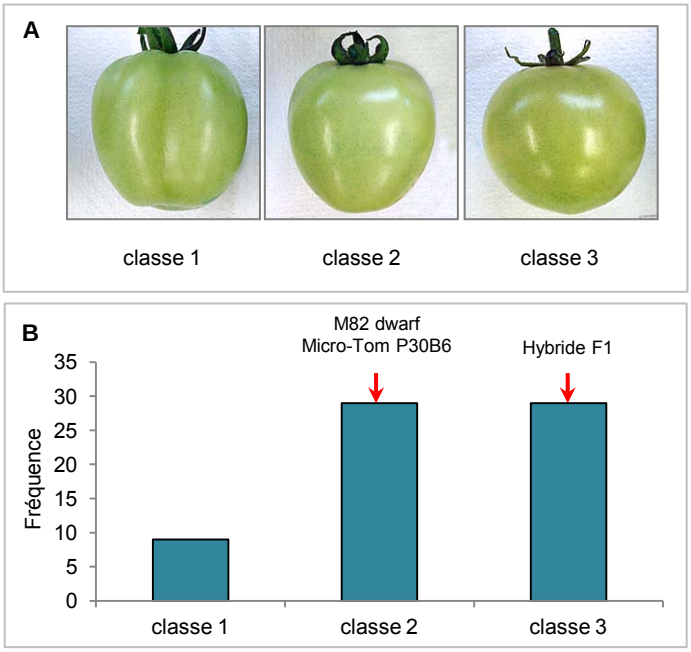


Figure 67 : Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6. Les fruits ont été évalués visuellement au stade MG. A. Illustration de chaque classe de brillance. B. Fréquence des classes de brillance de la cuticule. Les flèches rouges indiquent les classes des parents et de l'hybride.

2.5 Cartographie de la mutation

Afin d'identifier une zone chromosomique associée à la mutation portée par P30B6, une approche de cartographie génétique de la mutation et de détection de QTL a été mise en place. Une population de 100 plantes F2 en ségrégation, issue d'un croisement entre M82 dwarf et le mutant Micro-Tom P30B6 a été constituée et les fruits ont été phénotypés de façon systématique.

2.5.1 Phénotypage de la brillance

La brillance est le caractère phénotypique utilisé lors du crible des mutants EMS et son évaluation s'effectue par comparaison avec un échantillonnage de fruits homogènes issus des plantes Micro-Tom de type sauvage. Le phénotypage de la brillance s'effectue au stade MG car les différences sont plus facilement identifiables, d'autant plus que la brillance au stade RR semble évoluer au cours du temps chez certains individus. La plante M82 dwarf de type sauvage produit des fruits qui s'avèrent brillants, d'un niveau assez comparable à la brillance des fruits issus du mutant P30B6. L'hybride obtenu après croisement entre M82 dwarf et P30B6 produit quant à lui des fruits à la brillance très intense, bien supérieure à celles observées chez les 2 parents. Le phénotypage de la population F2 M82 dwarf x MT P30B6 pour la brillance des fruits au stade Mature Green donne une répartition du caractère non Mendélienne (figure 67B). En effet, 14% des plantes présentent des fruits à la brillance moyenne (notée classe 1, figure 67A), 43% une brillance élevée comme les 2 parents (notée classe 2) et 43% une brillance très forte, comme l'hybride F1 (noté classe 3). Le phénotypage de la classe 2 s'avère relativement délicat avec des variations de brillance ténues dans cette même classe. L'établissement de classes supplémentaires n'a pas été envisagé car les fruits de la classe 2 sont très difficiles à distinguer et à hiérarchiser. La brillance accrue (surbrillance) de l'hybride F1 et de près de la moitié de la population F2 semble traduire une ségrégation de type non mendélienne chez laquelle seuls les hétérozygotes ayant reçu la mutation de P30B6 expriment le phénotype de surbrillance. Les mécanismes responsables de ce phénomène, qualifié de surdominance, chez lequel les hybrides sont supérieurs aux deux parents (phénotype transgressif), commencent à peine à être élucidés chez les plantes, notamment chez la tomate (Shivaprasad et al., 2012). Cette difficulté à réaliser un phénotypage plus précis des fruits de la classe intermédiaire a conduit à l'intégration dans l'analyse QTL de la population F2 de critères phénotypiques supplémentaires caractérisant l'architecture et les propriétés de la cuticule.

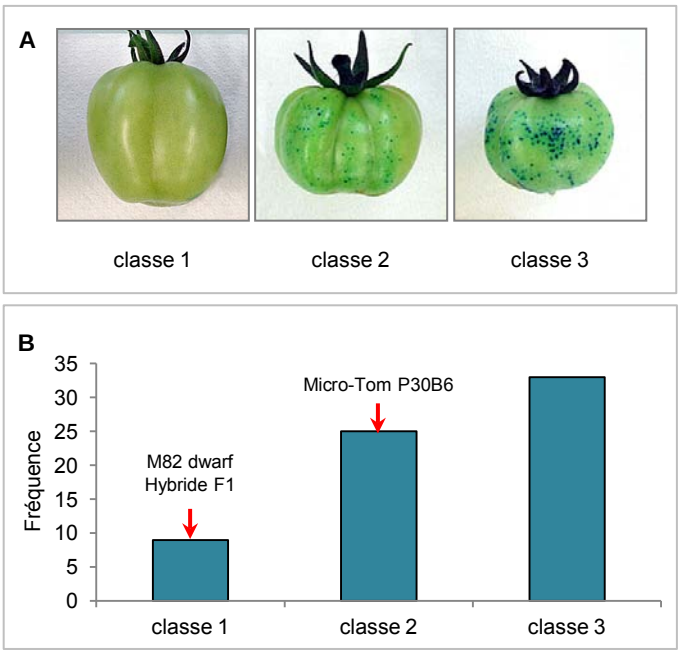


Figure 68 : Evaluation de la perméabilité réalisée sur des fruits de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6. Les fruits au stade MG ont été incubés 1 nuit dans une solution de bleu de toluidine à 0,1% et l'intensité de coloration a été estimée visuellement. A. Illustration de chaque classe de perméabilité. B. Fréquence des classes de perméabilité de la cuticule. Les flèches rouges indiquent les classes des parents et de l'hybride.

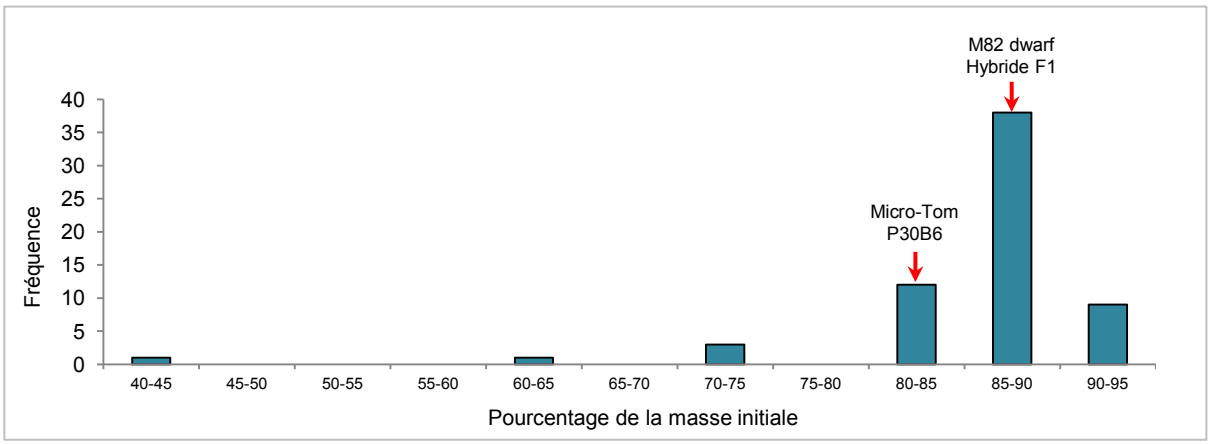


Figure 69 : Mesures de dessiccation réalisées sur des fruits RR de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6. La masse des fruits a été déterminée à T0 et T6 semaines, après conservation à T°C ambiante. Les classes correspondent au pourcentage de la masse initiale après 6 semaines. Les flèches rouges indiquent les classes des parents et de l'hybride.

2.5.2 Phénotypage de la perméabilité

Un test de perméabilité sur 2 fruits de chaque plante de la population F2 est mis en place, avec une incubation de 16h dans du bleu de toluidine 0,1% (figure 68). Les 2 parents ont montré des niveaux de perméabilité différents, permettant de les placer dans des classes distinctes. La cuticule du parent M82 dwarf est apparue plutôt imperméable comparée à celle du mutant P30B6. L'hybride F1 se montre également peu perméable à l'entrée de soluté. La fréquence de la classe la moins perméable qui contient le parent M82 dwarf et l'hybride est de 14% (classe 1), 37% des fruits ont montré un niveau de perméabilité plus élevés (classe 2), d'un niveau équivalent au parent Micro-Tom P30B6, et 49% des fruits sont apparus très perméables (classe 3). La mutation portée par Micro-Tom P30B6 semble récessive pour ce caractère puisque l'hétérozygote F1 montre des propriétés de perméabilité identique à M82 dwarf.

2.5.3 Résistance à la dessiccation

Les mesures de dessiccation ont été réalisées sur 1 fruit représentatif prélevé au stade RR, sur 65 plantes F2 issues du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6. L'ensemble des fruits a été conservé à température ambiante sur une durée de 6 semaines. La masse des fruits a été déterminée à T0, après 31 jours de conservation (données non montrées) et à la fin du test (figure 69). Onze classes différentes ont été constituées d'après la masse des fruits après 6 semaines de conservation, par rapport à leur masse d'origine. Très peu d'individus ont montré une faible résistance à la dessiccation puisque la classe 40-45 (fruit ayant perdu entre 55 et 60% de sa masse par rapport au T0) ne comporte qu'1 individu, tout comme la classe 60-65. La classe 70-75 regroupe 3 individus alors que 92% des individus testés font partis des 3 dernières classes les plus résistantes. Le parent Micro-Tom P30B6 appartient à la classe 80-85 et le parent M82 dwarf, ainsi que l'hybride F1, appartiennent à la classe 85-90, la classe majoritaire puisque regroupant 59% des individus testés. La mutation portée par Micro-Tom P30B6 semble récessive pour ce caractère puisque l'hybride présente des caractéristiques identiques au parent M82 dwarf. La bonne résistance à la dessiccation de la population F2 M82 dwarf x Micro-Tom P30B6 peut avoir plusieurs explications. Les 2 parents présentent d'une part une cuticule assez résistante à la dessiccation, aussi bien le fruit de M82 dwarf que celui du mutant P30B6 (paragraphe 2.3.1). D'autre part, le test a été moins stringent qu'initialement prévu puisque la température ambiante estimée en laboratoire proche de 20°C n'a pas été respectée lors du test, qui s'est déroulé à des températures oscillant entre 10 et 15°C. Ces températures fraîches ont favorisé la conservation des fruits et n'ont pas mis en exergue les faiblesses potentielles des cuticules des fruits de la population en ségrégation. La fiabilité relative de ce phénotypage

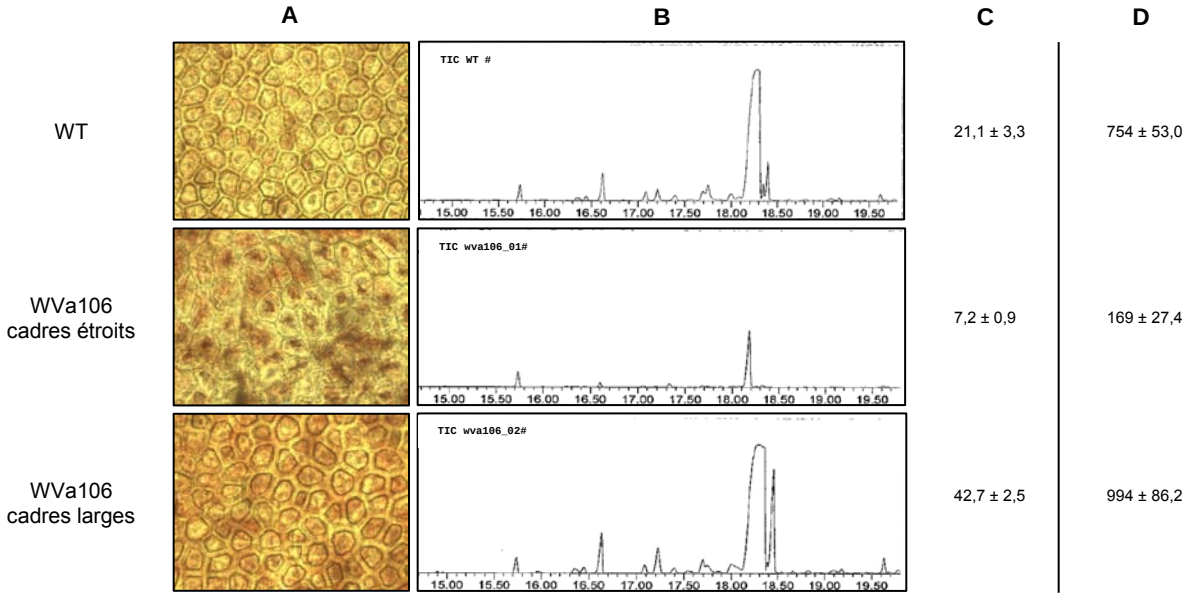


Figure 70 : Analyse de la largeur des cadres de cutine et de la charge en cutine par GC-MS sur cuticule isolée. A. Observation des cadres de cutine sur des épidermes de fruits WVa106 de type WT, d'un transformant à cadres étroits et d'un transformant à cadres larges. B. Spectres de GC-MS sur cutine isolée. C. Moyenne des mesures de la largeur des cadres de cutine (unité arbitraire), avec écart type (n=20). D. Mesure de la charge totale en monomère de cutine. Les valeurs sont des moyennes présentées avec écart type (n=4).

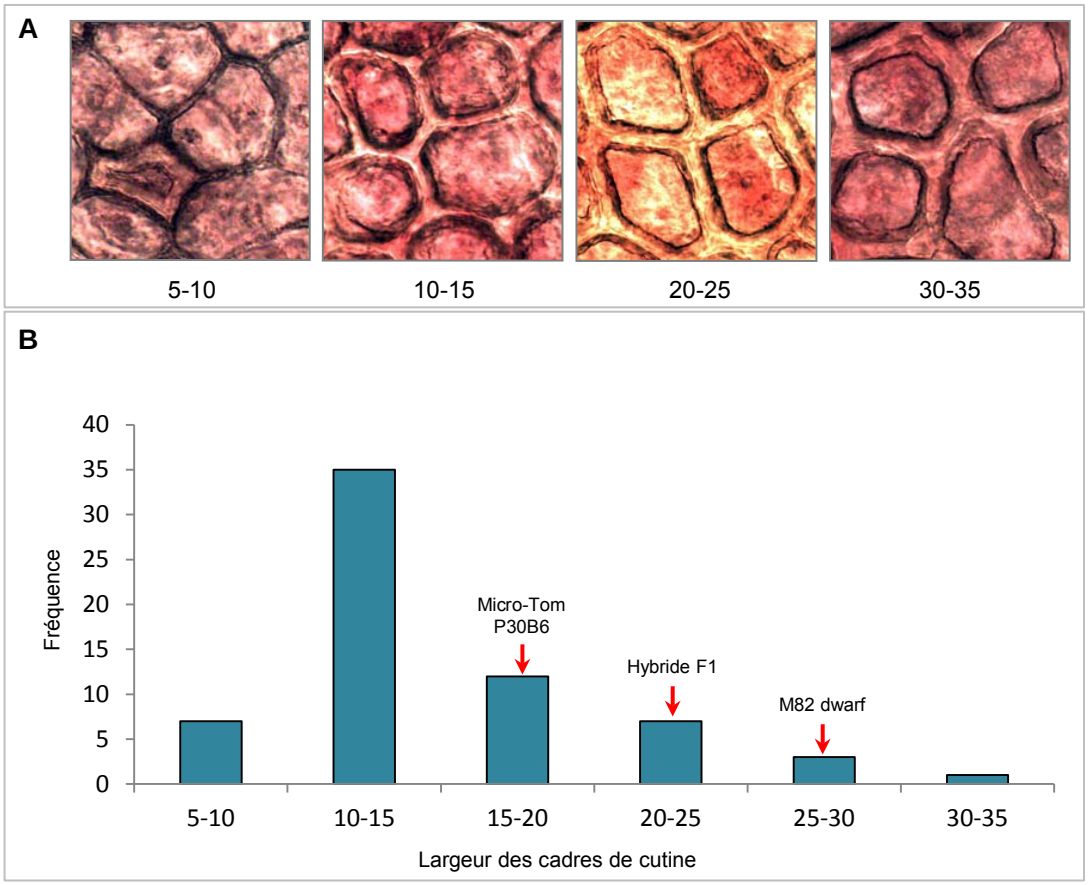


Figure 71 : Mesures de la largeur des cadres de cutine réalisées sur les fruits des plantes de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P30B6. L'observation des cuticules est effectuée sur de l'épiderme externe fraîchement pelé de fruits au stade RR. Douze mesures indépendantes sont effectuées après acquisition de l'image (microscope optique, grossissement x20). A. illustration de 4 classes de largeur de cadre de cutine (5-10, 10-15, 20-25 et 30-35). Les unités sont arbitraires. B. Fréquence des classes de largeur de cutine. Les flèches rouges indiquent les parents et l'hybride F1.

basé sur la résistance à la perte d'eau a poussé à mettre en place un dernier phénotypage, permettant d'obtenir également des valeurs continues.

2.5.4 Largeur des cadres de cutine

La seule technique permettant de quantifier de façon fiable la cuticule est de réaliser une extraction des lipides cuticulaires puis de les analyser en chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (Kolattukudy, 1981; Holloway, 1982). Cette technique se révèle lourde à mettre en œuvre sur un grand nombre d'échantillons. De plus, l'analyse des spectres et les quantifications associées représentent un travail complexe qui engendre des délais d'analyse importants. Cette technique s'avère donc incompatible avec le phénotypage d'une population de cartographie. Une autre technique permettant d'obtenir une estimation assez intéressante de la quantité de cuticule est de réaliser une analyse cytologique après fixation de la partie externe du péricarpe et coloration spécifique des lipides (Buda *et al*., 2009). La cuticule ayant une épaisseur rarement supérieure à 10 µm, l'observation de la coupe et l'estimation de l'épaisseur de la cuticule s'effectue sous microscope. Cette technique s'avère donc inadaptée à la gestion d'un grand nombre d'échantillons sur une fenêtre de temps réduite.

Les espaces inter cellulaires des cellules épidermiques se traduisent, sur des coupes transversales de cuticule, par l'existence de massifs au dessus des pieds cuticulaires (Girard *et al*., 2012 ; Yeats *et al*., 2012b). Ces massifs forment des cadres de cutine autour des cellules épidermiques. Des observations par transparence de cuticules isolées mécaniquement sur des mutants présentant des phénotypes cuticulaires contrastés a montré qu'il existait de grandes variations de largeur de ces cadres de cutine. Ces variations de largeur ne semblent pas aléatoires puisque des quantifications de cutine réalisées sur des transformants de tomate cerise WVa106, aux compositions cuticulaires différentes ont montré une corrélation nette entre teneur en cutine et largeur des cadres de cutine (figure 70).

A partir de ces conclusions, une détermination de la largeur des cadres de cutine a été réalisée sur les fruits de la population F2. Ces mesures ont révélé de grandes variations entre les individus de la population F2, avec des valeurs comprises entre 6,7 et 35,7 (unité arbitraire, UA). Six classes distinctes ont pu être constituées et les 2 parents, ainsi que l'hybride, ont été répartis dans des classes séparées (figure 71). La distribution des individus ne suit pas une loi normale, avec la classe 10-15 regroupant 51,5% des individus. L'ensemble des classes inférieures représente 10,3% et l'ensemble des classes supérieures regroupe 38,2% des individus. L'hybride F1 présente un phénotype intermédiaire par rapport

	chromosome	position marqueur sur Chr	marqueur/68	LOD	R² (%)
perméabilité	5	1-2	30-31	4	79,5
	8	2-4	46-48	3,7	79,4
	9	3-4	52-53	3,7	79,4
brillance	8	1-2	45-46	2	19,2
	9	3-4	52-53	2,3	48,3
cadre cutine	1	5-6	5-6	2,2	17
	1	6-7	6-7	2,3	24
	3	4-8	16-20	2,9	24,5
	3	8-9	20-21	3	38,8
	6	2-3	36-37	2,95	52,1
dessiccation	3	8-9	20-21	10,2	58,6
	3	9-10	21-22	4,6	67,7
	5	1-2	30-31	9,45	68
	7	1-2	39-40	9	63,4
	9	1-3	50-52	2,2	18,4

Table 8 : Résultats de l'analyse QTL pour la population F2 M82 dwarf x P30B6 par MapMaker QTL (Lander *et al.*, 1987). Pour chaque critère phénotypique évalué, les QTL sont indiqués par le numéro du chromosome, la position du marqueur sur le chromosome, la valeur de LOD correspondant au maximum de vraisemblance, la valeur de R², exprimant le pourcentage de la variation observée expliquée par le QTL.

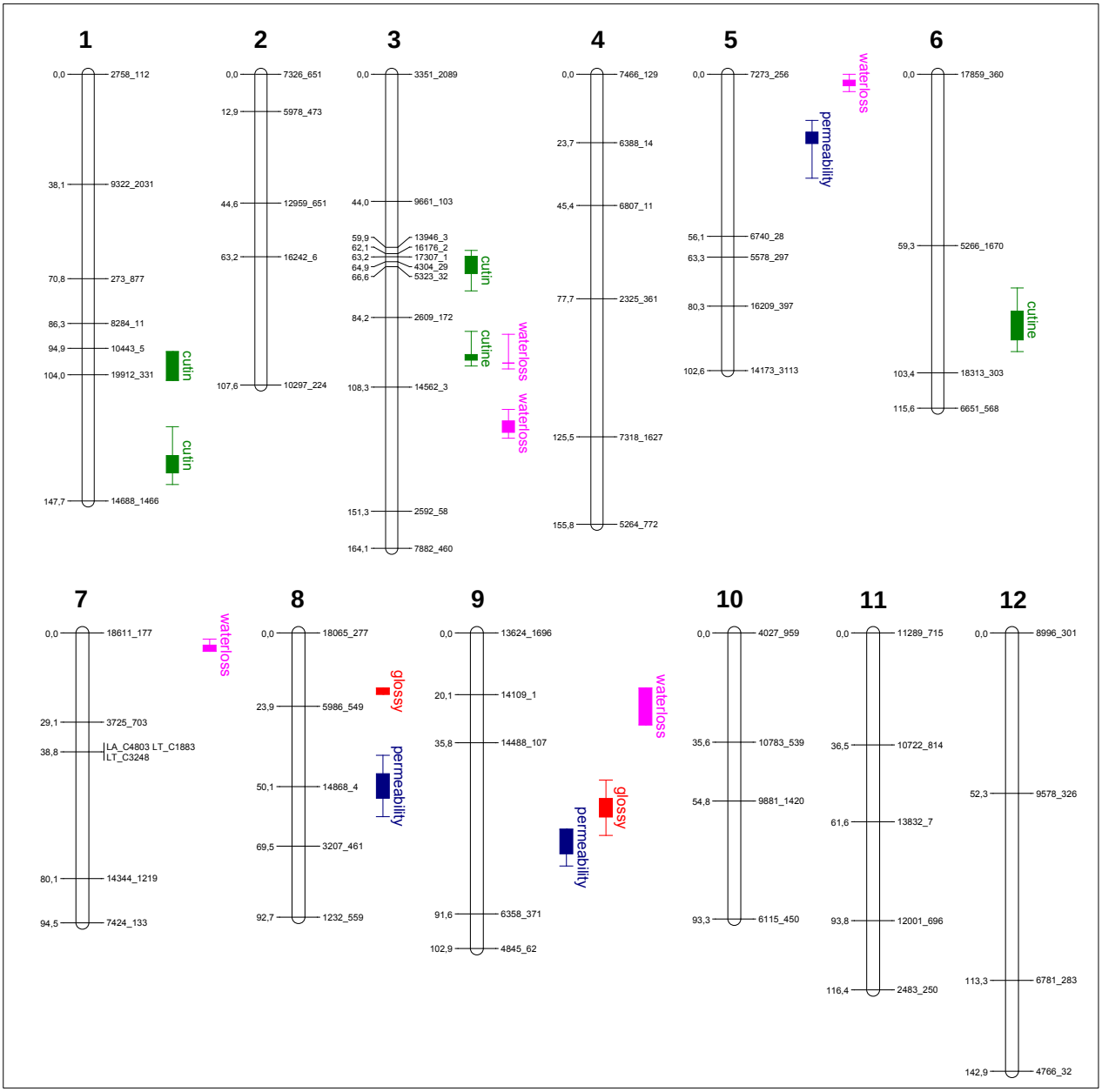


Figure 72 : Représentation schématique des chromosomes de la tomate avec le positionnement de 68 marqueurs SNP. Les QTL identifiés chez P30B6 correspondant à la dessiccation, à la brillance, à la largeur des cadres de cutine et à la perméabilité sont représentés respectivement de couleur rose, rouge, vert et bleu.

aux 2 parents suggérant cette fois qu'il n'y a pas eu dominance dans les interactions alléliques mais additivité.

2.5.5 Analyse Quantitative Trait Loci (QTL) de la population F2 M82 dwarf x P30B6

Un jeu de 68 marqueurs SNP, répartis de façon régulière sur les chromosomes de la tomate a été défini entre M82 dwarf et Micro-Tom, afin de génotyper les descendants F2 (Shirasawa *et al.*, 2010). L'étude de l'association entre les variabilités génotypiques et phénotypiques met en évidence 15 régions chromosomiques différentes, réparties sur 7 des 12 chromosomes (table 8). Trois QTL contrôlant le niveau de perméabilité sont localisés sur les chromosomes 5, 8 et 9, deux QTL contrôlant le niveau de brillance de la cuticule sont localisés sur les chromosomes 8 et 9, cinq QTL contrôlant la variation de largeur des cadres de cutine, sont localisés sur les chromosomes 1, 3 et 6 et enfin, cinq QTL correspondent à la résistance à la dessiccation, sur les chromosomes 3, 5, 7 et 9. Il est à noter que sur les 15 QTL mis en évidence par MapMaker QTL, seuls six d'entre eux sont liés à des marqueurs (figure 72). Les faibles associations se positionnent généralement au niveau de régions peu couvertes en marqueurs, ce qui rend les QTL non liés aux marqueurs généralement artéfactuels. De cette analyse, aucun QTL lié à un marqueur ne ressort pour le caractère de brillance, un QTL sur le chromosome 8 pour la perméabilité, un QTL sur le chromosome 1 pour la largeur des cadres de cutine et trois QTL pour la perte en eau. Ces résultats, difficiles à interpréter avec les données actuelles, suggèrent que, chez ce mutant, le caractère de brillance peut être découplé des autres caractères analysés comme l'indiquent les analyses physiologiques (figure 65). La détection de plusieurs QTL pour les caractères étudiés, basée sur l'analyse d'une descendance issue du croisement de deux variétés de tomate cultivée, montre que, bien que proches génétiquement, ces variétés sont encore trop éloignées pour ne pas montrer de variabilité phénotypique pour des caractères liés à la cuticule. Par ailleurs, les analyses génétiques effectuées et présentées figure 72 pourraient montrer leurs limites, du fait de l'existence d'un phénomène de surdominance de la brillance du fruit. Afin de vérifier ce point, d'autres analyses génétiques sont en cours (C. Bres, communication personnelle).

3. Mutant P23F12

P23F12 est le mutant issu du crible des plantes Micro-Tom EMS le plus affecté dans son contenu en cutine si on excepte *gdsl2-b*. Il présente en effet une réduction de sa charge en cutine de plus de 70% par rapport à la charge du WT, avec un total des composés identifiés s'élevant à 162,6 µg/cm² (Chapitre 2, partie 1, table II). Cette diminution de la charge en cutine touche l'ensemble des monomères analysés, sans modification des

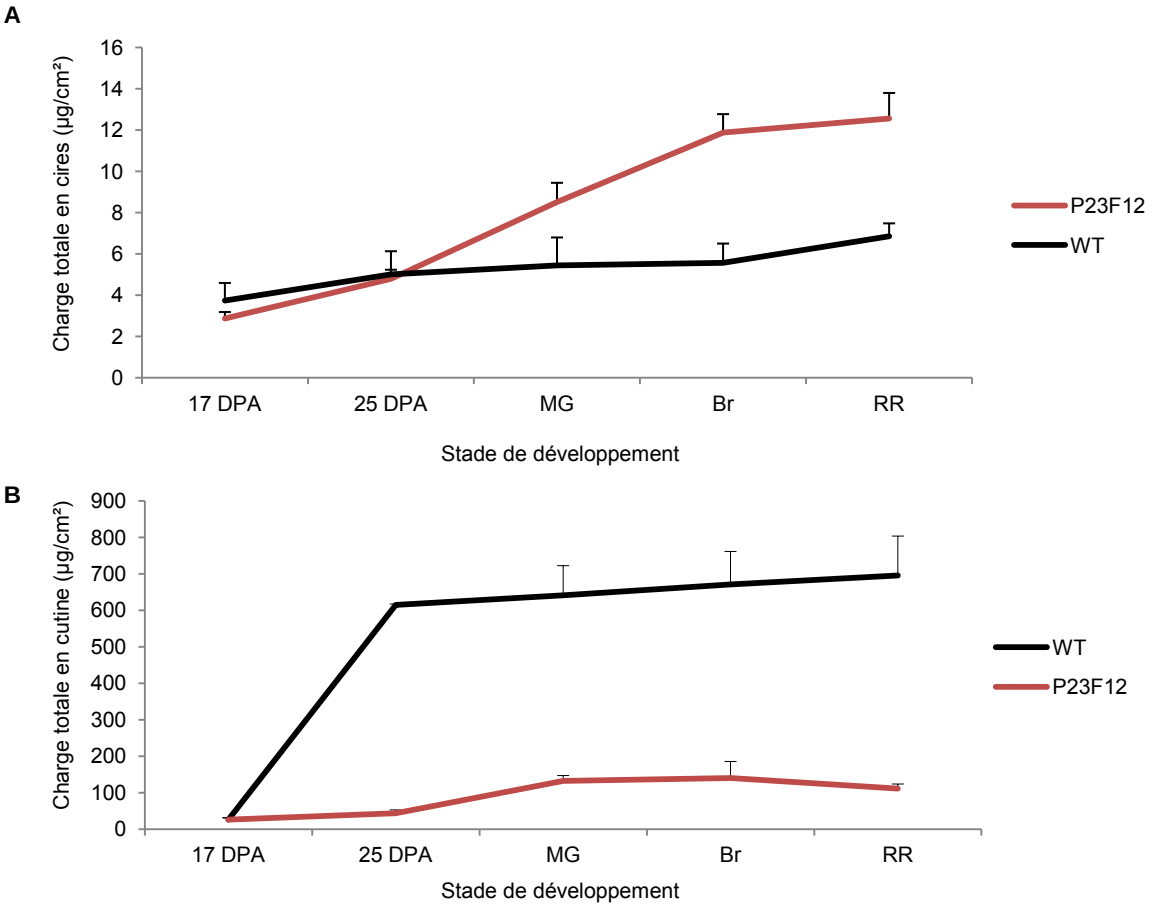


Figure 73 : Charge totale en cires et en cutine de la cutine de fruits Micro-Tom WT et de P23F12, au cours du développement. A. Charge totale en cires. Les valeurs moyennes sont exprimées en µg/cm² et sont données avec écart type (n=4). Les composés non identifiés ne sont pas inclus dans l'analyse. B. Charge totale en cutine. Les valeurs moyennes sont exprimées en µg/cm² et sont données avec écart type (n=4). Les composés non identifiés ne sont pas inclus dans l'analyse

proportions. Le mutant P23F12 est aussi un des individus analysés dont la charge en cires est la plus significativement augmentée, avec un total de 10,6 µg/cm², soit une augmentation de plus de 70% par rapport au WT (Chapitre 2, partie 1, table I). Cette augmentation de la quantité de cires est marquée par un doublement de la proportion des triterpénoïdes de type amyrines par rapport au WT.

La caractérisation cytologique du mutant, présentée dans le Chapitre 2, partie 1 en figure 5, montre une surface cuticulaire parfaitement lisse recouverte par les cires, alors que la surface de cutine présente des cadres de cutine fins et saillants. L'abondance faible de cutine se traduit par une diminution de l'épaisseur de la cutine de près de 50% par rapport au WT.

3.1 Cinétique d'accumulation des composés cuticulaires au cours du développement

Une analyse de l'accumulation des composés cuticulaires a été réalisée sur le mutant P23F12 afin de déterminer comment se mettaient en place les différences observées lors des analyses au stade RR. L'analyse des cires cuticulaires a révélé un profil lipidique similaire entre le WT et le mutant P23F12 pendant les stades précoces, jusqu'à 25 JAA (figure 73A). Passé ce stade, alors que l'accumulation des cires chez le fruit de type sauvage reste stable entre les stades MG et Br, le mutant P23F12 connait une forte accélération avec une augmentation du contenu en cires supérieure de 60% à la valeur du WT au stade MG, puis supérieure de 113% au stade Br. La production de cires du WT va connaître une augmentation au stade RR supérieure à celle de P23F12, qui limitera la différence finale à 83,5%. En terme d'accumulation de cires, le mutant P23F12 a un comportement très différent des mutants cuticulaires de génotype M82 *cd1*, *cd2* et *cd3*, dont l'accumulation en cires est proche du type sauvage M82 (Isaacson *et al.*, 2009). Par contre, le mutant P23F12 présente un profil d'accumulation de cires proche des mutants de maturation *nor* et *rin* (Kosma *et al*., 2009). En effet, alors que *rin* et *nor* ont des charges en cires équivalentes au type sauvage AC au stade 25 JAA, leur charge augmente fortement entre 25 JAA et le stade RR théorique (définit par le nombre de jours après anthèse), pour être supérieur de 50% par rapport au WT pour *nor* et 35% pour *rin*. Cependant, les modifications de compositions et de charge cuticulaires sont associées chez *rin* et *nor* à des perturbations de la maturation et celle-ci ne semble pas affectée chez P23F12.

L'accumulation des monomères de cutine au cours du temps ne suit pas du tout la même tendance (figure 73B). Alors que le WT accumule très tôt, dès le stade 25 JAA, la quasi-totalité de sa charge finale en cutine, le mutant P23F12 accumule très peu de cutine jusqu'à 25 JAA. Entre 25 JAA et le stade MG, le mutant P23F12, va tripler son contenu en

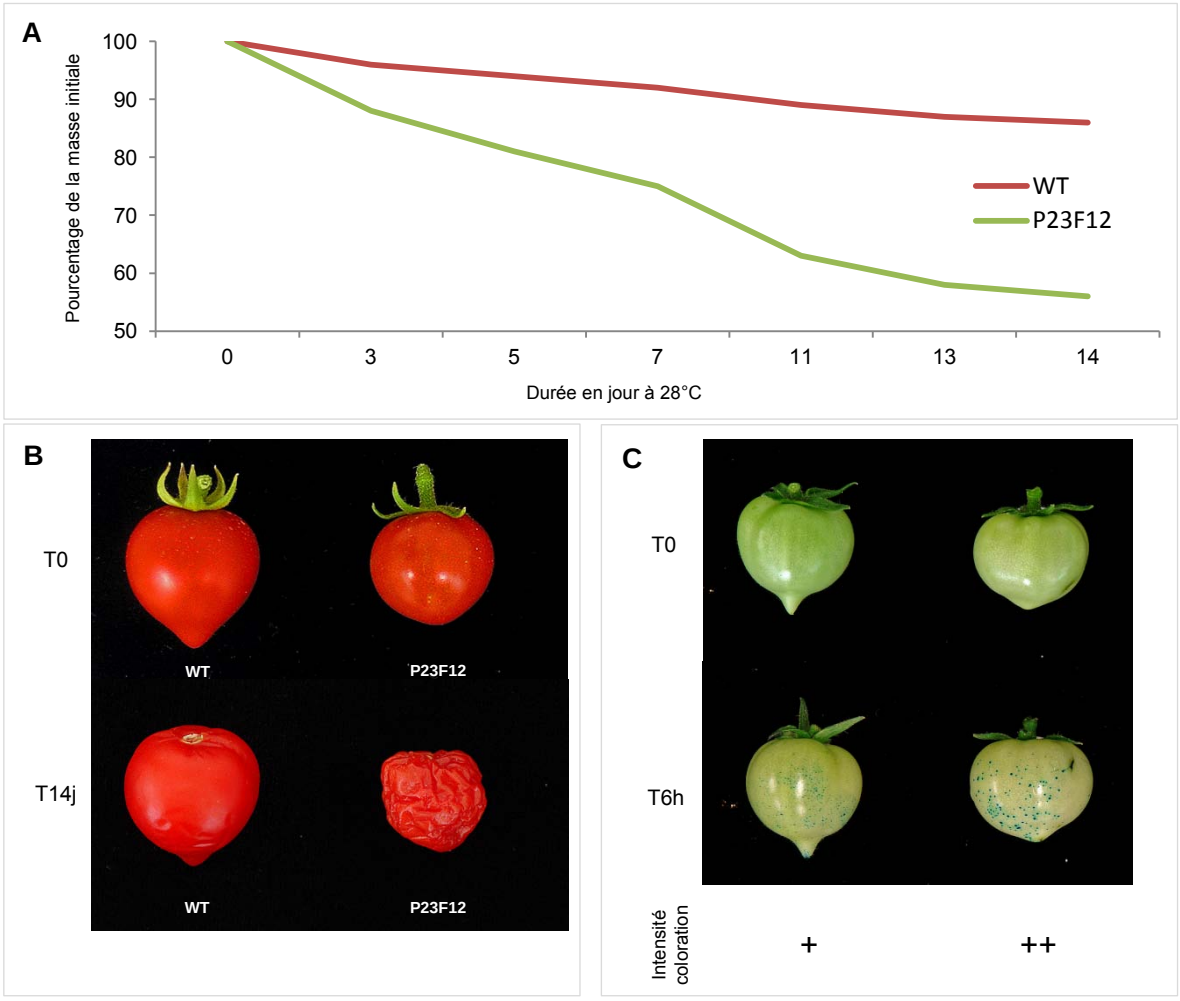


Figure 74 : Analyse de la résistance à la dessiccation et du niveau de perméabilité de fruits de tomate Micro-Tom WT et P23F12. A. Suivi de la dessiccation de fruits au stade Red Ripe, issus du WT et du mutant P23F12, conservé à 28°C pendant 14 jours. B. Aspect des fruits à T0 et T 14 jours. C. Analyse de la perméabilité de fruits de tomate Micro-Tom WT et P23F12 au stade 38 DPA, immergés à 75% dans une solution de bleu de Toluidine à 1%, pendant 6h à T°C ambiante. Les symboles + correspondent à l'intensité de coloration estimée visuellement.

cutine, pour passer de 4,35 µg/cm² à 13,24 µg/cm², accusant un retard de sa charge de près de 80% par rapport au WT, au stade MG. Le contenu en cutine de P23F12 ne va pas montrer de modification significative jusqu'au stade RR, tout comme le WT et la différence finale s'élève à 84%. Une faible accumulation de cutine tout au long du développement a également été observée chez les mutants *cutin deficient* (Isaacson *et al*., 2009) mais à des niveaux plus drastiques que chez P23F12.

Ces analyses cinétiques de l'accumulation des composés cuticulaires montrent que le mutant P23F12 semble déficient dans sa capacité à produire de la cutine dès les stades précoces du développement du fruit. En effet, le mutant P23F12 ne peut assurer la production plus rapide de monomères de cutine nécessaires entre les stades 17 et 25 JAA, là où le WT met en place près de 90% de sa charge en cutine finale. Le mutant P23F12 n'accumule que 6% d'une charge normale à ce stade. Il est intéressant de noter que c'est précisément au stade 25 JAA, là où la déficience en cutine est maximum, que le mutant P23F12 va connaître une augmentation considérable de sa quantité de cires, à la différence du WT. Ces analyses montrent qu'il n'y a pas de modifications de l'accumulation de la cutine qui reste faible tout au long du développement, à la différence de la production de cires qui est augmentée à partir de 25 JAA. Ce type de profil d'accumulation différentielle entre cires et cutine n'a pas encore été décrit dans la littérature.

3.2 Propriétés de la cuticule du mutant P23F12

Comme pour le mutant P30B6, des analyses des propriétés de la cuticule de P23F12 ont été menées afin de déterminer les conséquences des modifications d'accumulation de cires et de cutine.

3.2.1 Résistance à la dessiccation

Pour évaluer le niveau de perte en eau des fruits issus des plantes WT et P23F12, une analyse de la résistance à la dessiccation durant 14 jours a été mise en place sur des fruits au stade RR (figure 74A). Le test montre que le mutant P23F12 se révèle très sensible à la dessiccation puisque dès 3 jours à 28°C, le mutant a perdu 22% de sa masse d'origine contre 4% pour le WT. A la fin du test, le mutant a perdu 44% de sa masse contre 14% pour le WT, ce qui donne une perte moyenne de 3,1% / jour pour P23F12 contre 1% / jour pour le contrôle. L'effet sur le fruit est assez drastique avec une perte de volume très importante (figure 74B). Cette sensibilité 3 fois supérieure à la dessiccation du mutant P23F12 peut avoir plusieurs explications. D'une part, le squelette de cutine du mutant est réduit de plus de 80% par rapport au type sauvage, ce qui peut représenter un déficit trop important pour maintenir l'intégrité de la cuticule, comme chez le mutant *att1* (Xiao *et al*., 2004). P23F12

présente pourtant un contenu en cires largement majoré, de près de 80% supérieur au WT, qui ne semble cependant pas suffisant pour maintenir les propriétés de la cuticule. Même si l'intégrité du polymère de cutine est importante pour maintenir l'étanchéité de la cuticule (Bessire *et al.*, 2001 ; Chen *et al*., 2011), les cires jouent un rôle prépondérant dans la résistance à la dessiccation (Leide *et al*., 2007 ; Zhang *et al*., 2005 ; Schrieber, 2010). Cependant, la composition des cires de P23F12 montre une augmentation considérable de la proportion des amyrines. Or, la proportion entre triterpénoïdes et composés aliphatiques au niveau de la couche cireuse est un des éléments clés du maintien de l'étanchéité de la cuticule (Vogg *et al*., 2004 ; Leide *et al*., 2011). Il est donc possible que la présence importante d'amyrines dans les cires du mutant P23F12 perturbe la résistance à la dessiccation de sa cuticule.

3.2.2 Perméabilité cuticulaire

La perméabilité cuticulaire des fruits du mutant P23F12 a été comparée à celle des fruits de type sauvage (figure 74C). A la différence du mutant P30B6, le mutant P23F12 présente une cuticule relativement peu perméable. Ces résultats de perméabilité sont proches de ceux observés chez les mutants de génotype M82 *cutin deficient*, qui présentent également des contenus en cutine très faibles (Isaacson *et al*., 2009). Le nombre de ponctuations observées chez le mutant P23F12 est limité mais leur coloration est assez intense. Une nouvelle fois, les niveaux de perméabilité et de dessiccation ne sont pas forcément corrélés, mais la quantité importante de cires peut permettre de limiter l'entrée de liquide dans la cuticule. Les domaines cristallins formés par les amyrines sont des zones de faiblesse et ont des conséquences sur la perte d'eau par transpiration (Leide *et al*., 2011). Cependant, il semble que la cuticule de P23F12 puisse jouer son rôle de barrière pour empêcher l'entrée de soluté.

3.3 Analyse de l'expression des gènes cuticulaires

Le mutant P23F12 présente une accumulation faible de l'ensemble des monomères de cutine au niveau de sa cuticule, sans que les proportions entre ces composés soient affectées. Une analyse de l'expression des gènes liés à la synthèse des monomères de cutine, à leur transport, leur polymérisation et leur régulation a été réalisée sur des ARN de cellules épidermiques de fruits à 20 JAA plutôt qu'à RR, afin d'obtenir un meilleur niveau d'expression des gènes liés à la cuticule.

De nouvelles séquences de gènes liés à la cuticule étant disponibles, des gènes supplémentaires ont été testés dans cette analyse. Pour la synthèse des monomères de cutine, il s'agit de *Long Chain Acyl CoA Synthetase 4* (*LACS4*), intervenant dans l'activation

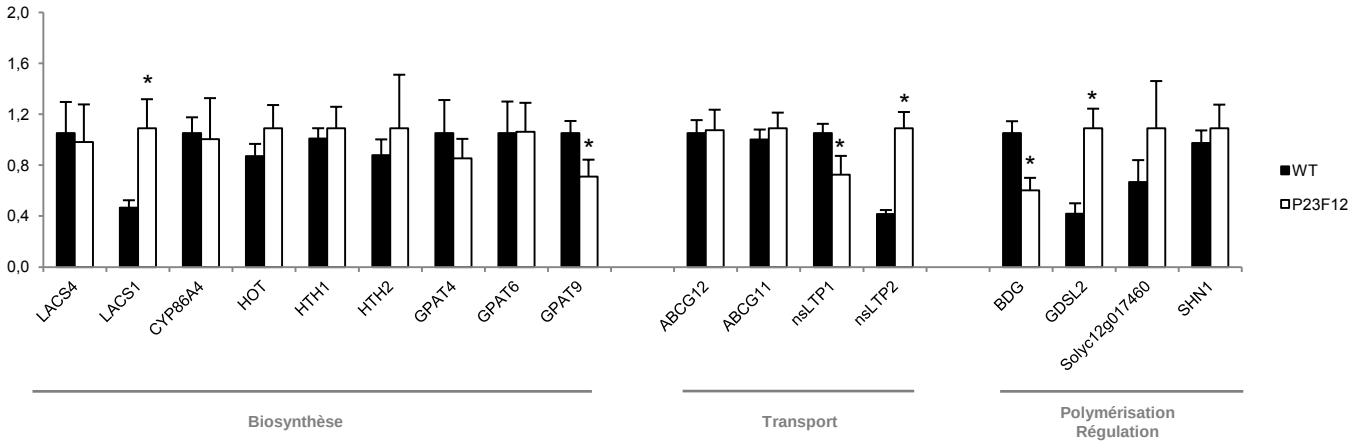


Figure 75 : Analyse de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cutine dans des cellules épidermiques de fruits WT et P23F12, au stade 20 DPA. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des répétitions avec les barres d'erreurs (n=4). L'astérisque indique une différence significative par rapport au contrôle WT ($P<0.01$) obtenue par un test *t* de Student.

des acides gras lors de la formation de l'enveloppe du pollen chez *Arabidopsis* (Jessen *et al*., 2011), *Glycérol-3 Phosphate Acyltransférase 6* et *9* (*GPAT6* et *GPAT9*), codant pour des acyltransférases impliquées dans la formation de la cutine du pollen (Li *et al*., 2012) et des pétales d'*Arabidopsis* (Li-Beisson *et al*., 2009) pour GPAT6, et dans la formation d'huile chez le tabac pour GPAT9 (Gidda *et al*., 2009). Le gène *CYP86A4* code pour une ω-hydroxylase, qui interviendrait dans la synthèse du 16-hydroxypalmitate, au niveau des fleurs d'*Arabidopsis* (Li-Beisson *et al*., 2009). L'étude du transport se voit complétée par le transporteur ABC ABCG11, un hémi transporteur impliqué aussi bien dans l'export membranaire des cires que de la cutine (Panikashvili *et al*., 2007; Mc Farlane *et al*., 2010). Pour l'étude de la polymérisation, un autre gène codant pour une enzyme à motif GDSL a été choisi, le gène *Solyc12g017460*, correspondant à une enzyme fortement exprimée lors des phases précoces de développement du fruit (Lemaire-Chamley, communication personnelle).

L'analyse montre que les gènes sélectionnés liés à la biosynthèse de la cuticule sont peu affectés chez le mutant P23F12 (figure 75). Cependant, le gène *LACS1*, impliqué dans la synthèse des cires chez *Arabisopsis* (Lü *et al*., 2009) montre une surexpression significative par rapport au WT et pourrait être lié à l'augmentation de 70% de la quantité de cires cuticulaires. Le gène *GPAT9* voit par contre son expression significativement diminuée chez P23F12, mais aucun rôle précis n'est dévolu à ce gène, supposé intervenir dans le métabolisme des glycérolipides (Gidda *et al*., 2009). L'expression des transporteurs ABC n'est pas affectée chez le mutant P23F12 mais les transporteurs lipidiques de type nsLTP subissent des modifications importantes de leur niveau d'expression. Alors que *SlnsLTP1* voit son expression chuter chez P23F12, *SlnsLTP2* est fortement surexprimé. En mettant en parallèle les gènes liés à la polymérisation, on peut s'apercevoir que *SlGDSL2* est également fortement surexprimé. Les expressions des gènes codant pour le transporteur nsLTP2 et pour la lipase hydrolase SlGDSL2 semblent co-régulées. Il a également été montré chez une lignée RNAi *SlGDSL2* que l'extinction de *SlGDSL2* entraine une chute de l'expression de *SlnsLTP2* (Girard *et al.,* 2012). Le gène *BDG* montre une forte réduction de son expression mais son rôle dans la synthèse de la cuticule n'étant pas encore défini, il est difficile de conclure quant à son implication dans ce mécanisme. Les changements dans la teneur en cutine, avec des proportions relatives non modifiées, pourrait suggérer l'intervention d'un facteur de transcription, comme pour *Slshn3* (Shi *et al*., 2013). Chez P23F12, l'expression de *SHN1*, gène de régulation majeur de la voie de synthèse de la cutine et des cires (Aharoni *et al*., 2004, Kannangara *et al*., 2007) n'est pas modifiée. Un grand nombre de gènes de régulation sont désormais identifiés (Yeats et Rose, 2013) et une

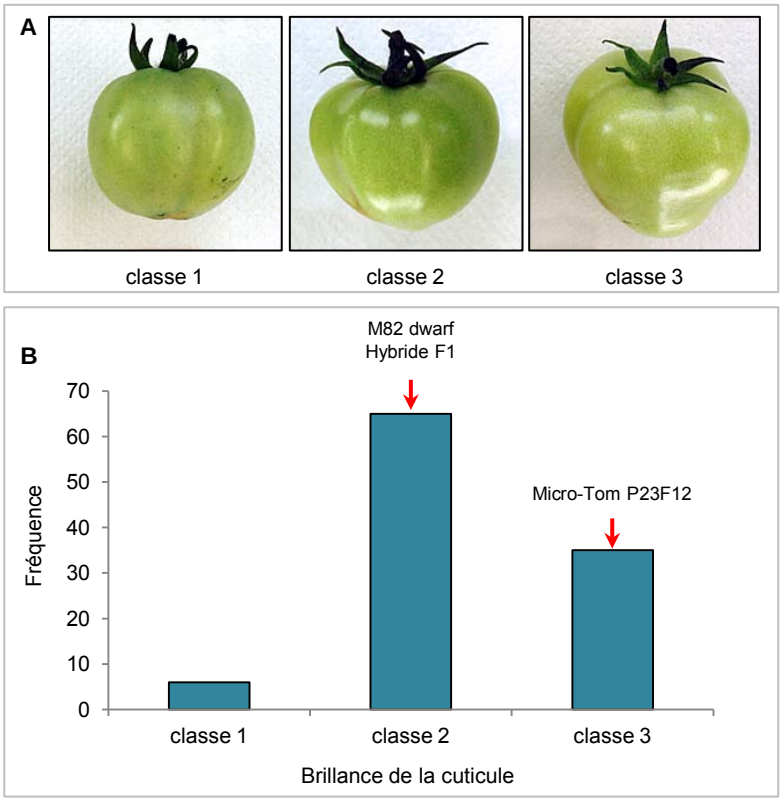


Figure 76 : Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P23F12. Les fruits ont été évalués visuellement au stade MG. A. Illustration de chaque classe de brillance. B. Fréquence des classes de brillance de la cuticule. Les flèches rouges indiquent les classes des parents et de l'hybride.

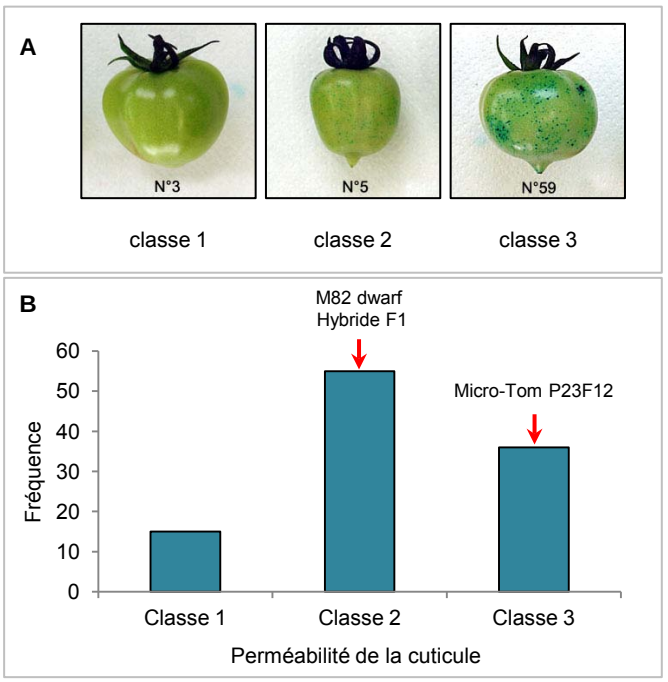


Figure 77 : Evaluation de la perméabilité réalisée sur des fruits de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P23F12. Les fruits au stade MG ont été incubés 1 nuit dans une solution de bleu de toluidine à 0,1% et l'intensité de coloration a été estimée visuellement. A. Illustration de chaque classe de perméabilité. B. Fréquence des classes de perméabilité de la cuticule. Les flèches rouges indiquent les classes des parents et de l'hybride.

analyse plus exhaustive permettrait de savoir si un facteur de transcription est impliqué dans les différences observées chez P23F12.

Une nouvelle fois, les gènes étudiés dans cette analyse se sont révélés *a posteriori* peu informatifs. En effet, leurs rôles ont été progressivement précisés au cours de cette étude, identifiant des territoires d'expression de *CYP86A4* ainsi que *GPAT6* dans les pétales (Li-Beisson *et al*., 2009), ce dernier pouvant être aussi impliqué au niveau du pollen (Li *et al*., 2012), tout comme *LACS1* et *LACS4* (Jessen *et al*., 2011). Le séquençage du génome de la tomate et les données d'analyses de transcriptome effectuées sur la tomate (Matas *et al.,* 2011 ; Filippis *et al*., 2013) sont désormais des outils qui vont permettre de cibler les gènes les plus pertinents impliqués dans la voie de biosynthèse de la cuticule.

3.4 Cartographie de la mutation

Comme aucun gène candidat putatif n'a été mis en évidence par l'analyse d'expression de gènes liés à la cuticule, une localisation de la mutation a été recherchée par une approche de cartographie. Une population F2 issue du croisement de M82 dwarf et de Micro-Tom P23F12 a été obtenue puis phénotypée.

3.4.1 Phénotypage de la brillance

La plante M82 dwarf présente au stade MG des fruits relativement brillants et le mutant P23F12 des fruits très brillants, l'hybride F1 ayant des fruits d'une brillance proche de M82 dwarf. L'allèle porté par le parent M82 dwarf semble être dominant sur l'allèle venant du parent Micro-Tom P23F12. La population F2 présente des fruits avec un niveau moyen de brillance assez élevé, avec un écart entre le fruit le moins brillant et le fruit le plus brillant assez réduit. Trois classes ont pu être constituées (figure 76), avec une classe 1 contenant les fruits les moins brillants de la population (5,7% des fruits), une classe 2 majoritaire, équivalente à la brillance des fruits M82 dwarf et de l'hybride F1, représentant 61,3% de la population. Enfin, la classe 3 correspond aux fruits les plus brillants et contient le parent P23F12, et regroupe 33% des individus.

3.4.2 Phénotypage de la perméabilité

Le niveau de perméabilité de la cuticule des fruits issus de la population F2 M82 dwarf x Micro-Tom P23F12 a été évalué au stade MG, sur 2 fruits de chaque plante. Les 2 parents présentent des niveaux de perméabilité différents, la cuticule des fruits de M82 dwarf se révélant assez imperméable. L'hybride F1 présente les mêmes caractéristiques de perméabilité que le parent M82 dwarf, suggérant une dominance de l'allèle du parent M82 dwarf. Trois classes de perméabilité ont pu être constituées (figure 77), la première

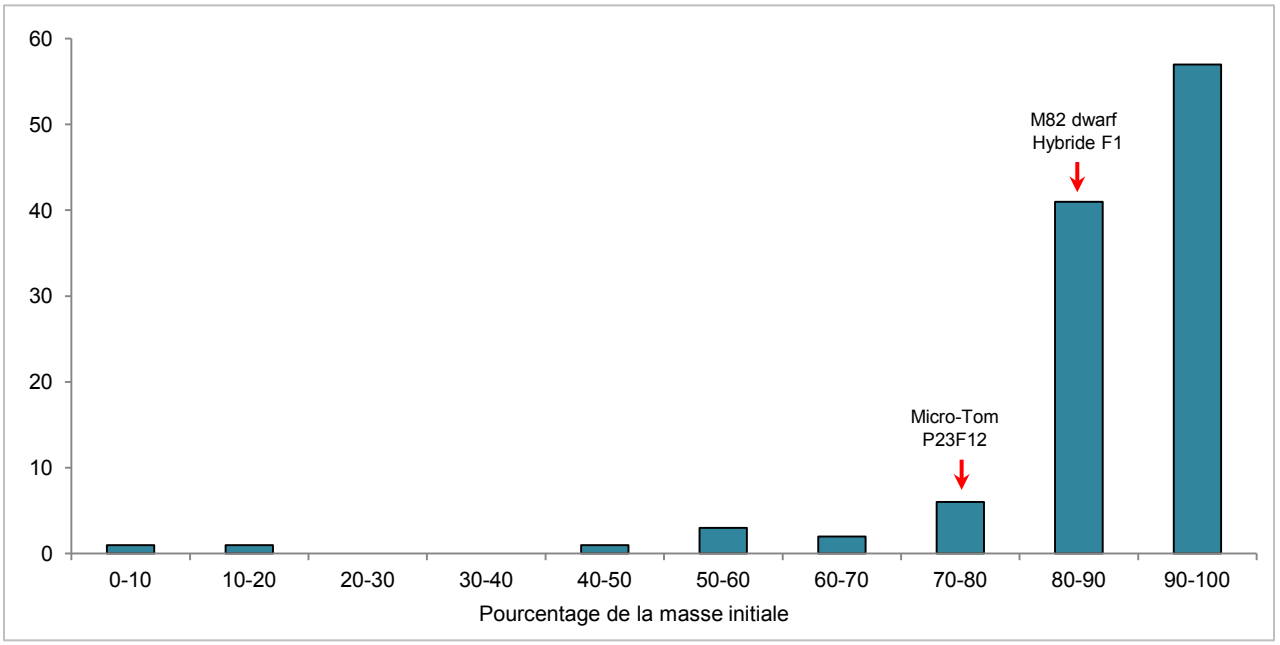


Figure 78 : Mesures de dessiccation réalisées sur des fruits RR de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P23F12. La masse des fruits a été déterminée à T0 et T6 semaines, après conservation à T°C ambiante. Les classes correspondent au pourcentage de la masse initiale après 6 semaines. Les flèches rouges indiquent les classes des parents et de l'hybride.

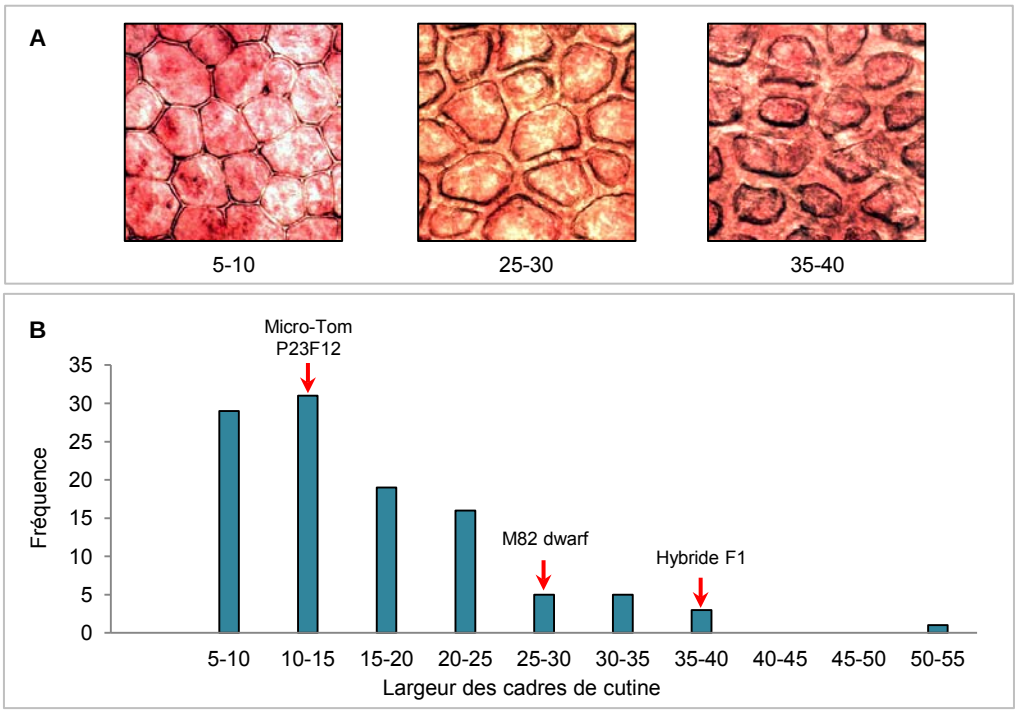


Figure 79 : Mesures de la largeur des cadres de cutine réalisées sur les fruits des plantes de la population F2 issue du croisement entre M82 dwarf et Micro-Tom P23F12. L'observation des cuticules est effectuée sur de l'épiderme externe fraîchement pelé de fruits au stade RR. Douze mesures indépendantes sont effectuées après acquisition de l'image (microscope optique, grossissement x20). A. illustration de 3 classes de largeur de cadre de cutine (5-10, 28-30 et 35-40). Les unités sont arbitraires. B. Fréquence des classes de largeur de cutine. Les flèches rouges indiquent les parents et l'hybride F1.

regroupant des fruits pratiquement imperméables où le colorant n'a pratiquement pas pénétré (classe 1) représentant 14,1% des individus, la classe 2 correspondant à la classe du parent M82 dwarf et de l'hybride F1 est la classe majoritaire avec 51,9% des individus et la classe 3, regroupe les fruits aux cuticules les plus perméables, notamment le parent Micro-Tom P23F12, et représente 34% des individus.

3.4.3 Résistance à la dessiccation

Un test de dessiccation a été mené sur 6 semaines à T°C ambiante. Dix classes ont été constituées par rapport au pourcentage de masse perdue après 6 semaines par rapport à la masse initiale (figure 78). Les 8 premières classes, de la classe 0-10 à 70-80, ne représentent que 12,5% des individus, la classe 70-80 comprenant le parent Micro-Tom P23F12. Les 2 classes 80-90 et 90-100 regroupent les 87,5% restants, repartis en 36,6% et 50,9% respectivement. Le parent M82 dwarf et l'hybride F1 appartiennent à la classe 80-90, semblant confirmer la récessivité de l'allèle mutant.

Le test de dessiccation a été réalisé en parallèle avec celui de P30B6 et les conclusions sont similaires. Les conditions de stockage n'ont pas été suffisamment stringentes pour que les différences de compositions cuticulaires soient mises en évidence. En effet, le mutant P23F12, pourtant très sensible à la dessiccation, a conservé 70,73% de sa masse d'origine. Il est quand même intéressant de noter que malgré ces conditions de conservation peu drastique, des fruits ont perdu jusqu'à 83% de leur masse initiale, voire 97,8% dans le cas le plus extrême. Le niveau de dessiccation de ces fruits a vraisemblablement été accentué par l'arrivée de pathogènes opportunistes, qui ont pu pénétrer l'épiderme en raison de l'état de faiblesse de la cuticule de ces individus en ségrégation (données non présentées).

3.4.4 Largeur des cadres de cutine

L'analyse de la largeur des cadres de cutine a été effectuée sur les individus de la population F2 M82 dwarf x P23F12 (figure 79). Elle révèle une très grande hétérogénéité de mesures entre les individus de la population testée, avec une amplitude proche d'un facteur 10, comprise entre 5,2 et 53,8 (UA). Le parent P23F12 présente des cadres de cutine fins (14,4 ± 2,8), en accord avec son faible contenu en cutine alors que le parent M82 dwarf a des cadres de cutine mesurés à 26,8 ± 4,0. De façon surprenante, l'hybride F1 qui présente des caractéristiques similaires au parent M82 dwarf sur les autres mesures, présente des cadres très larges mesurés à 38,3 ± 6,9, qui pourrait suggérer un effet surdominant pour ce caractère. Cependant, dans la population F2, la répartition des classes est décalée vers les faibles valeurs, avec les deux classes correspondant aux cadres les plus fins regroupant

	chromosome	position marqueur sur Chr	marqueur/49	LOD	R² (%)
perméabilité	9	1-4	33-36	8,25	65,2
brillance	4	1-2	13-14	4,55	56
	4	2-3	14-15	8,64	84,2
	4	3-4	15-16	2,3	16,2
	5	1-2	17-18	7,52	84,2
	9	1-3	33-35	4,19	25,5
cadre cutine	5	1-2	17-18	4,93	51,6
	6	2-4	22-24	2,45	16
	9	1-4	33-36	2,72	19
dessiccation	2	3-4	7-8	9,68	59,1
	7	1-2	25-26	17,5	63,2
	9	4-5	36-37	16,77	63,2

Table 9 : Résultats de l'analyse QTL pour la population F2 M82 dwarf x P23F12 par MapMaker QTL (Lander *et al*., 1987). Pour chaque critère phénotypique évalué, les QTL sont indiquées par le numéro du chromosome, la position du marqueur sur le chromosome, la valeur de LOD correspondant au maximum de vraisemblance, la valeur de R^2, exprimant le pourcentage de la variation observée expliquée par le QTL.

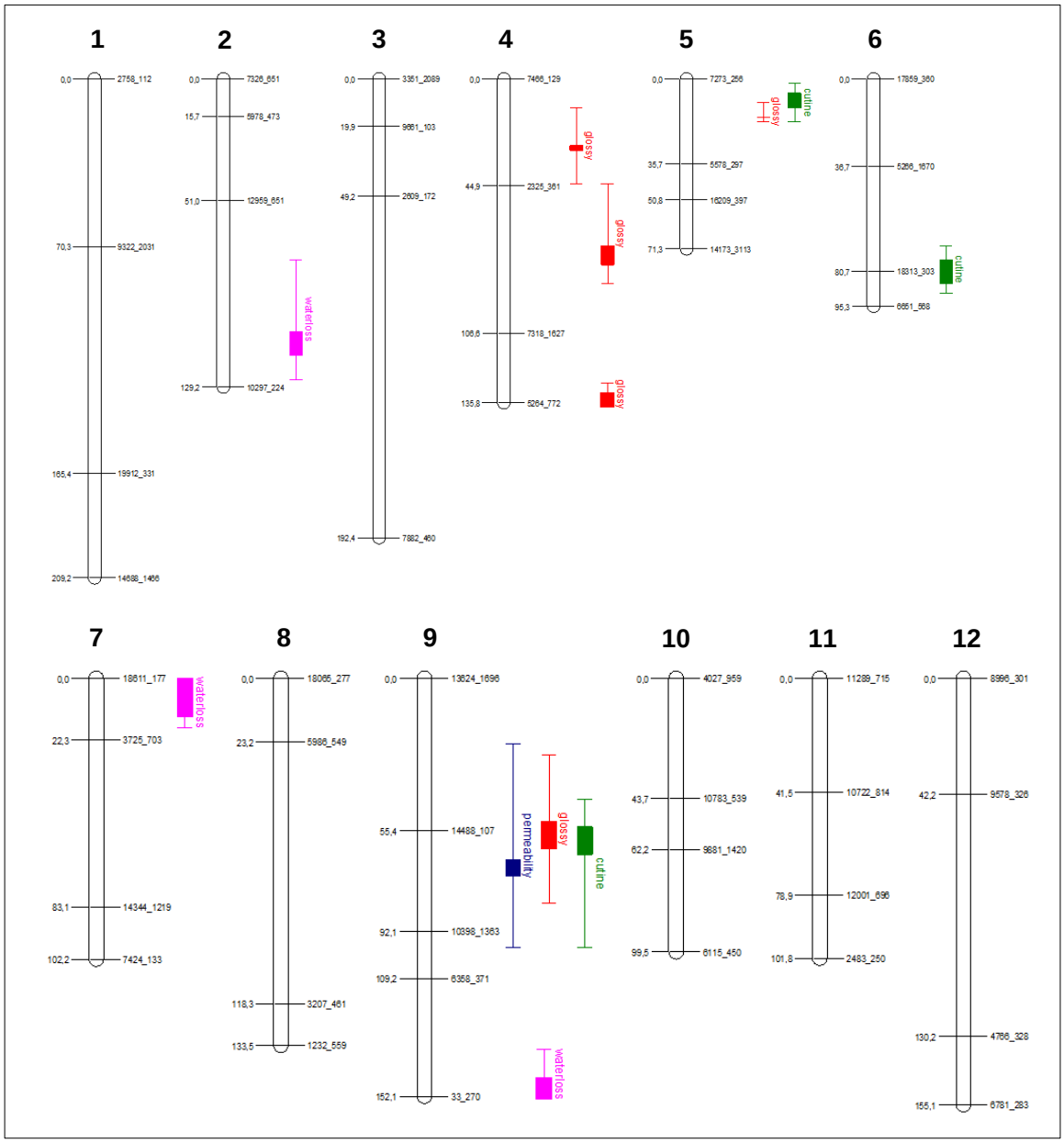


Figure 80 : Représentation schématique des chromosomes de la tomate avec le positionnement de 49 marqueurs SNP. Les QTL identifiés chez P23F12 correspondant à la dessiccation, à la brillance, à la largeur des cadres de cutine et à la perméabilité sont représentés respectivement de couleur rose, rouge, vert et bleu.

près de 55% des individus, avec 26,6% pour la classe 5-10 et 28,4% pour la classe 10-15, majoritaire, qui comprend le parent P23F12. Peu d'individus présentent des cadres très larges comme l'hybride F1 puisque la classe 35-40 ne comporte que 3 individus et la classe 50-55, 1 seul individu.

La largeur des cadres de cutine de l'hybride F1 est très particulière dans le cas du croisement entre M82 dwarf et P23F12. En effet, dans l'ensemble des cas de figures traités en cartographie jusqu'à présent entre M82 dwarf et Micro-Tom, l'hybride F1 a systématiquement une valeur de largeur de cadre de cutine comprise entre les 2 parents, suggérant une additivité des allèles parentaux. C'est le cas pour le croisement M82 dwarf x P30B6 (Cf figure 71) et pour le croisement M82 dwarf x gdsl2-b (Chapitre 2, partie I, figure S7). Pour la population issue du croisement avec P23F12, les propriétés du parent M82 dwarf et de l'hybride F1 sont proches et se retrouvent localisées dans les mêmes classes pour la brillance, la perméabilité et la dessiccation.

3.4.5 Analyse Quantitative Trait Loci (QTL) de la population F2 M82 dwarf x P23F12

Dans le cas du mutant P23F12, un jeu de 49 marqueurs SNP a été utilisé pour génotyper les plantes de la population F2. L'analyse identifie 12 QTL, répartis sur 6 chromosomes différents (table 9). Cinq QTL contrôlent la brillance, avec 3 QTL localisés sur le chromosome 4, un QTL localisé sur le bras supérieur du chromosome 5 et un QTL sur le chromosome 9. L'analyse de la perméabilité permet d'identifier un QTL unique localisé sur le chromosome 9, celle de la perte en eau permet d'identifier 3 QTL, un sur le bas du chromosome 2, un sur le haut du chromosome 7 et un QTL sur le bas du chromosome 9. L'analyse de la largeur des cadres de cutine permet de mettre en évidence 3 QTL, localisés sur le haut du chromosome 5, le bas du chromosome 6 et sur le chromosome 9. Excepté le QTL correspondant à la brillance localisé sur le haut du chromosome 5, l'ensemble des QTL sont ancrés à un marqueur SNP. Cette analyse révèle une co-localisation de 3 QTL sur le chromosome 9, correspondant à la perméabilité, la brillance et la largeur des cadres de cutine (figure 80). Seule la résistance à la dessiccation n'est pas localisée à cette position sur le chromosome 9. Cependant, la fiabilité des mesures de dessiccation est remise en cause par les températures faibles intervenues pendant le test. La présence de 9 autres QTL expliquant une partie plus faible de la variabilité peut être en partie due à une couverture insuffisante de marqueurs sur la carte et aux variations phénotypiques liées aux 2 parents.

La détection QTL met donc en évidence une zone chromosomique localisée sur le chromosome 9 dont la distance génétique est proche de 75 cM. De nouveaux marqueurs polymorphes entre M82 dwarf et Micro-Tom ont été identifiés pour enrichir la carte au niveau

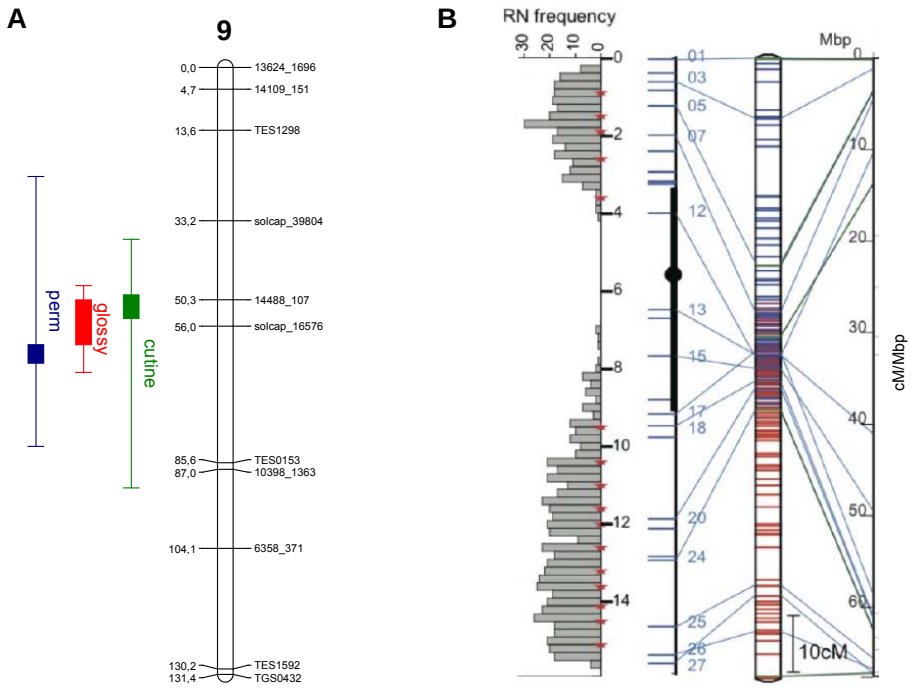


Figure 81 : Représentation schématique du chromosome N°9 de la tomate. A. Positionnement des 12 marqueurs SNP utilisées lors de l'analyse QTL par MapMaker QTL. Les QTL identifiés chez P23F12 correspondant à la brillance, à la largeur des cadres de cutine et à la perméabilité sont représentés respectivement de couleur rouge, vert et bleu. B. Représentation schématique des fréquences de recombinaison du chromosome 9. Chaque nodule de recombinaison représente un crossing over. Les distances entre chaque étoile rouge correspondent à 5 cM (d'après Tomato Genome Consortium, 2012).

du chromosome 9. Douze marqueurs ont été positionnés le plus régulièrement possible sur le chromosome et un nouveau génotypage a été réalisé. Celui-ci permet de réduire la distance génétique de la zone d'intérêt à 67,3 cM (figure 81A). La difficulté de préciser la zone d'intérêt s'explique par la présence d'une zone de faible recombinaison, très pauvre en marqueur. Cette zone se situe entre les marqueurs 14109_151 et 10398_1363 et semble correspondre à une zone centromérique, comme le montre le diagramme de fréquence de recombinaison (figure 81B ; Tomato Genome Consortium, 2012). L'approche de cartographie fine dans une telle zone est limitée par la faible recombinaison, évaluée à 2-3% dans les zones à l'extrémité du QTL et quasi nulle dans la zone centromérique (Tomato Genome Consortium, 2012).

3.5 Approche gène candidat - QTL

L'approche de cartographie a permis de définir une zone candidate responsable du phénotype de P23F12. En combinant les résultats de cartographie avec une approche gène candidat, il est possible de mettre en évidence la mutation responsable du phénotype. Pour cela, il est nécessaire d'analyser les gènes présents dans la zone ciblée par l'analyse QTL. L'analyse du génome de la tomate indique que la zone physique comprise entre les marqueurs flanquants le QTL est proche de 60 Mb et comprend 488 gènes annotés. Il est relativement délicat de faire une sélection exhaustive sur un tel nombre de gènes mais le choix de certaines fonctions assignées aux gènes peut être une méthode de crible pertinente. De plus, des résultats d'expressions de gènes spécifiques des cellules épidermiques sont disponibles (Matas *et al.*, 2011 ; Filippis et al., 2013) et peuvent permettre de réaliser une nouvelle sélection dans les listes de gènes candidats, leur position sur le génome de la tomate étant disponible depuis le séquençage de celui-ci (Tomato Genome Consortium, 2012). Cette démarche a été utilisée avec succès pour l'identification du mutant *gdsl2-b* (Chapitre 2, partie I).

Le choix d'un gène candidat doit répondre à trois critères : le gène doit être impliqué dans le phénomène étudié, c'est-à-dire la synthèse ou la régultion des cires et de la cutine, son territoire d'expression doit être associé aux cellules épidermiques et enfin, la séquence du gène doit être localisée sur la zone ciblée par l'approche de cartographie. Etant donné qu'aucun gène issu des analyses de transcriptome sur tissus isolés (Matas *et al.*, 2011 ; Filippis *et al*., 2013) ne répond aux trois critères, une analyse *in silico* a été initiée sur les gènes annotés compris dans la zone ciblée par l'analyse QTL. La recherche de gènes dont les fonctions sont associées formellement aux mécanismes cuticulaires a abouti à la sélection de 9 candidats potentiels. Ils correspondent à deux GDSL esterase / lipase (Solyc09g008690 et Solyc09g009700), à trois cytochromes P450 (Solyc09g098620,

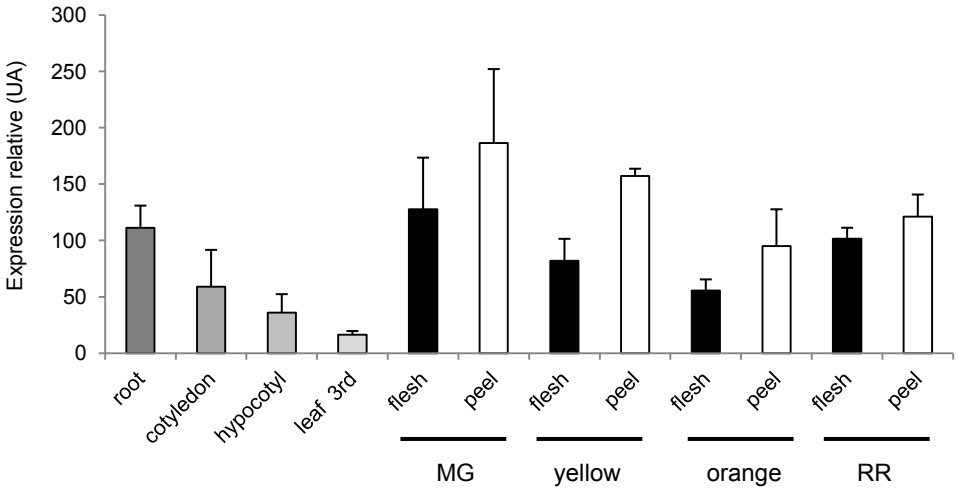


Figure 82 : Niveau d'expression de *CYP71B35* chez Micro-Tom dans les racines, les tissus végétatifs (racines, cotylédon, hypocotyle, 3ème feuille) et dans le fruit, entre la chair et la peau, à différents stades de développement. Données issues du Solanacae Genome Network (SGN : http://solgenomics.net/). UA : unité arbitraire

Solyc09g008910, Solyc09g014900), une Glycérol-3-phosphate acyltransférase6 (Solyc09g014350), un transporteur de lipides de type A à cassette ABC (Solyc09g009910) et deux Fatty Acyl CoA réductase (Solyc09g009570 et Solyc09g009580). Une analyse bioinformatique de leurs séquences nucléotidiques et protéiques, ainsi que les données d'expression disponibles dans les bases de données, aussi bien chez *Arabidopsis* que chez la tomate, ont montré que peu de candidats montraient un profil d'expression particulièrement associé aux cellules épidermiques. Seul le gène *Solyc09g014900* dont l'homologue chez *Arabidopsis AT3G26310* code pour une cytochrome P450, famille 71, sous famille B, polypeptide 35 (CYP71B35) montre un profil d'expression associé majoritairement à l'épiderme. Chez la tomate, le numéro d'accession de ce gène est SGN-U576459. Les données microarrays disponibles sur le site du Solanaceae Genomics Network (SGN : http://solgenomics.net) montrent que l'homologue de *CYP71B35* chez la tomate est fortement exprimé chez Micro-Tom, dans les racines et dans les fruits (figure 82). Son expression est plus modérée dans les tissus végétatifs que sont le cotylédon, l'hypocotyle et la 3ème feuille. Le gène *CYP71B35* n'est pas associé spécifiquement à la cuticule mais apparaît plus exprimé dans l'épiderme du fruit que dans la partie charnue, mais avec un différentiel variable, plus important dans les stades précoces que pour les stades tardifs de la maturation. Cependant, de nombreux gènes associés à la synthèse de la cuticule ne montrent pas un territoire d'expression très strict, comme *AtLACS2*, exprimés aussi bien dans les organes végétatifs que les racines (Schnurr *et al*., 2004) ou *SlCYP86A69*, une autre cytochrome P450, exprimée aussi bien dans l'exocarpe que le mésocarpe du fruit (Shi *et al.*, 2013).

Chez les plantes, les cytochromes P450 catalysent des réactions d'oxydation permettant la synthèse de métabolites secondaires comme des composés phénoliques, des stérols membranaires, des phytoallexines ou des terpénoïdes (Donaldson et Luster, 1991). La sous famille des CYP71 est peu documentée mais elle interviendrait dans l'hydroxylation des monoterpénoïdes chez l'avocat (Hallahan *et al*., 1992). La protéine CYP71B35 est une monoxygénase putative dont le plus proche partenaire serait CYP86A1, une hydroxylase d'acides gras en position Ω, plus particulièrement associée aux racines (d'après String 9.0 ; Szklarczyk *et al*., 2011). Ces données fragmentaires donnent assez peu d'indications sur un rôle de CYP71B35 dans la synthèse des cires ou de la cutine mais le profil d'expression du gène *CYP71B35* en fait un candidat potentiellement intéressant à analyser.

3.5.1 Analyse de la séquence de *CYP71B35*

La séquence nucléotidique du gène *CYP71B35* du mutant P23F12 a été comparée à celle du WT, du codon d'initiation jusqu'au codon stop. L'analyse des 1664 pb de la

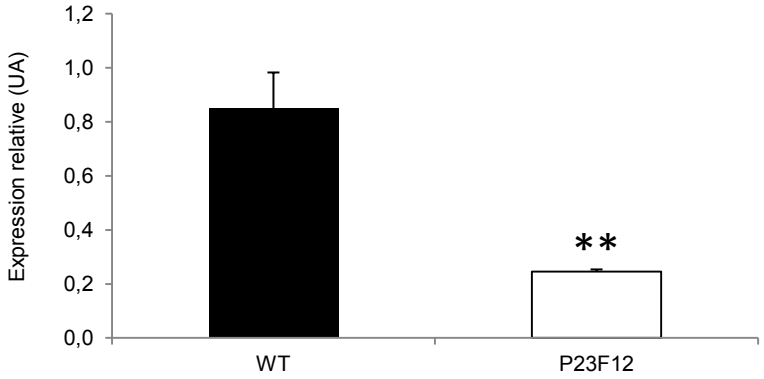


Figure 83 : Niveau d'expression du gène *CYP71B35* dans l'épiderme de fruits au stade MG du Micro-Tom WT et du mutant P23F12. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des répétitions et les barres d'erreurs (n=6). L'astérisque indique une différence significative par rapport au contrôle WT ($P<0.01$) obtenue par un test *t* de Student.

séquence codante du gène n'a pas révélé de modifications nucléotidiques de la séquence du mutant (résultat non montré). Afin de voir si l'expression du gène était modifiée chez P23F12, une analyse des transcrits de *CYP71B35* a été entreprise.

3.5.2 Analyse de l'expression de *CYP71B35*

Une analyse de l'expression du gène *CYP71B35* a été réalisée sur de l'épiderme de fruits au stade MG provenant de Micro-Tom WT et du mutant P23F12 (figure 83). De façon intéressante, l'expression de *CYP71B35* est réduite de façon significative chez le mutant, avec une baisse d'expression chez P23F12 de 70,5% par rapport au WT, sur 3 pools biologiques indépendants.

Différentes hypothèses peuvent être formulées quant à la baisse d'expression du gène CYP71B35 par rapport au WT : la mutation peut avoir touché la séquence régulatrice en cis, la mutation peut également avoir modifié un facteur de transcription agissant sur *CYP71B35*. Dans le but d'examiner si une mutation dans la séquence en cis (zones régulatrices putatives) est responsable de la diminution d'expression, une analyse bioinformatique et un séquençage de la zone en amont de *CYP71B35* ont été entrepris.

3.5.3 Recherche d'une mutation nucléotidique en *cis*

Une analyse *in silico* indique que le gène en amont de *CYP71B35* code pour une protéine DUF567 de fonction inconnue, et que le codon stop de ce gène est situé à 13000 bases environ du codon d'initiation de *CYP71B35*. L'intégralité de la zone intergénique n'a pas pu être couverte par le séquençage de par la présence de nombreuses zones riches AT, s'étendant sur près de 3000 pb. La zone a donc été couverte à près de 77% et aucune mutation dans la séquence nucléotidique n'a été observée (résultat non montré). Il est possible qu'une régulation par un facteur *trans* se fixant en *cis* soit responsable de la baisse d'expression du gène mais ce type d'analyse ne permettra pas de l'identifier.

Les analyses sur ce gène candidat se sont révélées infructueuses. Il y aurait beaucoup d'autres candidats à explorer mais aucun indice fort ne permet d'en sélectionner des préférentiels. Une autre approche génétique a alors été utilisée, appelée Next Generation Sequencing (NGS) – Mapping (Yang *et al*., 2013).

3.6 Approche Next Generation Sequencing (NGS) - Mapping

L'arrivée de méthodes de séquençage à haut débit permet de développer de nouvelles stratégies de cartographie pour identifier les mutations dans une population EMS. Ces technologies peuvent être couplées à une stratégie de « Bulked Segregant Analysis » (BSA, Michelmore *et al*., 1991) qui consiste à réaliser une population en ségrégation et un

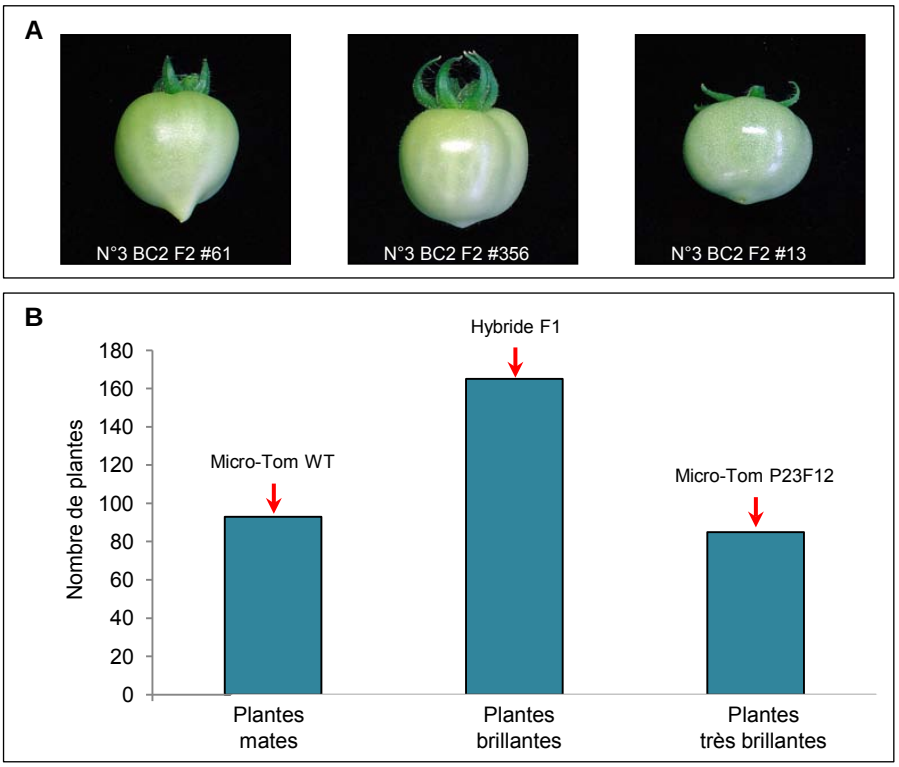


Figure 84 : Phénotypage de la population F2 issue du croisement entre Micro-Tom WT et le mutant P23F12. A. Illustration des 3 classes de brillance identifiées dans la population F2 au stade MG : plantes mates, plantes brillantes et plantes très brillantes. B. Fréquence des classes de brillance dans la population F2.

génotypage de 2 pools d'ADN, chacun contenant les individus aux phénotypes les plus opposés. Pour constituer cette population, le mutant P23F12 est rétrocroisé avec le Micro-Tom WT. L'hétérozygote F1 produit alors une descendance F2 et le phénotypage de la population en ségrégation est alors réalisée sur la base de la brillance du fruit. Les individus portant les fruits les plus brillants constitueront le premier pool, désigné sous le terme de bulk, et les plantes portant les fruits les plus mats constitueront le second. L'intérêt d'un croisement non polymorphe est de s'affranchir de la part de variabilité due aux fonds génétiques des parents, et de n'observer que les conséquences du locus d'intérêt. Ainsi, au travers d'une analyse BSA, la région d'intérêt contenant la mutation causale sera cartographiée par séquençage en comparant les 2 bulks. Dans le bulk mutant (individus portant les fruits les plus brillants), la mutation causale ainsi que les mutations EMS liées seront présentes dans toutes les lectures dans le cas d'une mutation récessive (fréquence proche ou égale à 1). Les autres mutations non liées vont au contraire ségréger dans le bulk mutant (fréquence inférieure à 1).

La brillance des fruits au stade MG a donc été utilisée comme critère phénotypique sur la descendance F2 de P23F12 x Micro-Tom WT et sur les 343 fruits analysés, 27% appartiennent à la classe « fruits mats » (soit 93 plantes) et 25% à la classe « fruits très brillants » (soit 85 plantes) (figure 84). Les fruits intermédiaires représentent donc 48% du total, soit une répartition de type Mendélienne ¼, ½, ¼, correspondant à un caractère récessif. Les 2 parents et l'hybride sont séparés dans des classes différentes. Afin de constituer des pools de taille équivalente, 85 plantes ont été sélectionnées pour composer le pool « brillant » (bulk mutant) et 85 plantes ont été choisies pour le bulk « référence ». Les résultats du séquençage des bulks sont en cours d'analyse.

L'utilisation de séquençage de type NGS offre la possibilité de séquencer de multiple fois un génome dans son intégralité pour un coût raisonnable et ainsi de permettre la mise en place de stratégie permettant d'exploiter la diversité génétique des collections EMS. L'approche NGS-Mapping repose sur l'association de la fréquence des SNP à un phénotype donné, définissant ainsi une région chromosomique contenant le SNP causal. La validation du SNP causal peut être réalisée par une approche fonctionnelle (analyse des gènes candidats associés aux SNP) et/ou par la recherche d'association entre le phénotype et le SNP (création d'une population en ségrégation plus grande permettant de casser les liaisons entre SNP et de diminuer le nombre de SNP associés au phénotype).

Cette approche a été utilisée avec succès chez *C. elegans*, avec l'identification de la mutation portée par *lsy-12*, un mutant présentant un SNP dans le gène *R07B5.9*, qui affecte l'évolution des cellules neuronales (Sarin *et al*., 2008). Depuis, cette stratégie a été validée

chez des plantes modèles comme *Arabidopsis* (Hartwig *et al*., 2012 ; Schneeberger *et al* , 2009) et le riz (Abe *et al*., 2011). Cette approche de NGS-Mapping peut être combinée avec le RNA sequencing, qui permet de quantifier les variations d'expressions des gènes localisés dans la zone d'intérêt et de déterminer si des transcrits présentes des modifications dans leur séquence. Une stratégie combinant une approche de NGS mapping associée avec la BSA et le RNA sequencing a été utilisée chez le blé hexaploïde (*Triticum aestivum*) et a permis de cartographier le gène *GPC-B1*, responsable du taux élevé de protéine dans le grain sur un intervalle de 0,4 cM (Trick *et al*., 2012).

4. Conclusions sur l'étude des mutants cuticulaires

4.1 Choix des caractères phénotypiques liés à la cuticule

Le premier critère lié à la cuticule choisi pour cette étude est la brillance du fruit. Ce critère constitue un caractère agronomique majeur pour la profession (Szczesniak, 1983) mais il existe peu de méthodes pour en réaliser des mesures précises. La plus adaptée est la mesure de la réflexion spéculaire de la lumière par la surface d'un objet (Hunter et Richard, 1987) donnée par des appareils de type brillance-mètres. Cependant, la plupart des brillance-mètres ne sont pas adaptés aux fruits puisqu'ils ne mesurent que des surfaces planes (Hutchings, 1999). Quelques appareils adaptés aux formes complexes ont été mis au point et évalués pour mesurer la brillance de fruits, uniquement pour des diamètres supérieurs à 65 mm (Mizrach *et al*., 2009). Les fruits de Micro-Tom au stade RR n'excédent pas 25 mm environ, empêchant leur mesures de brillance avec ce type d'appareil.

Des estimations de brillance ont également été réalisées avec des appareils de type chromamètre (Girard *et al*., 2012). Un chromamètre permet la caractérisation d'une couleur à l'aide d'un paramètre d'intensité correspondant à la luminance et de deux paramètres de chrominance qui décrivent la couleur. La luminance correspond dans le cas d'un chromamètre à un indice de clarté plutôt que de réflexion de la lumière. Des essais menés sur des fruits issus du crible de brillance des mutants EMS a montré qu'aucune relation ne pouvait être établie entre brillance visualisé et luminance (données non montrées).

La détermination de la brillance peut cependant s'effectuer par simple notation, en estimant visuellement l'intensité et la netteté du reflet. Cette méthode a été utilisée avec succès pour cribler la collection de mutants Micro-Tom et a permis d'isoler des mutants affectés au niveau de la cuticule. Cependant, la limite de cette évaluation visuelle, générant des valeurs discrètes, a été atteinte quand les différences de brillance sont devenues faibles entre les individus. En effet, pour les mutants à fortes charges en cutine, les individus présentant les différentiels les plus significatifs étaient P18H8, P30A12 et P17F12. Lors des

phases de choix des mutants à analyser, la brillance était l'unique caractère phénotypique. Des semis ont été effectués pour évaluer le niveau de brillance de la descendance de P18H8 et P30A12 par rapport au WT, et les différences sont apparues trop tenues pour se lancer dans la création de population pour cartographier les mutations. De plus, la précision du phénotypage d'une population en ségrégation pour cartographier une mutation est assujettie à la fiabilité des variables quantitatives, d'où l'importance de générer des valeurs continues pour améliorer la précion de la détection QTL.

Le choix des parents utilisés pour réaliser le croisement est également primordial. Dans notre cas, le parent M82 dwarf présente, tout comme les mutants testés, des fruits assez brillants. Le choix d'un parent présentant un fruit moins brillant comme Ailsa Craig (AC) pourrait être une option à considérer. En effet, une carte de marqueurs entre Micro-Tom et AC est disponible (Shirasawa *et al*., 2010) mais AC est une plante aux dimensions importantes (2 m de haut, 50 cm d'envergure), qui permet difficilement de générer de grandes populations de cartographie en serre. M82 dwarf et Micro-Tom apparaissent donc comme des outils majeurs dans une démarche de cartographie mais le caractère étudié doit avoir des effets phénotypiques marqués et aisément quantifiables dans la descendance.

Au cours de ce travail, d'autres critères phénotypiques associés à la cuticule ont du être mis en place pour évaluer les fruits de la descendance.

La perméabilité de la cuticule au bleu de toluidine, un colorant hydrophile de sel de phénothiazinium, s'est avérée être une méthode simple à mettre en œuvre permettant de tester un grand nombre d'échantillons de façon simultanée (Tanaka *et al*., 2004). L'estimation de la perméabilité ne permet pas de faire de liens entre composition ou structure de la cuticule (Tanaka *et al*., 2004) et ne se révèle pas forcément discriminante dans certaines études menées sur la tomate (Isaacson *et al*., 2009). Cependant, elle a constitué un critère relativement pertinent sur les mutants sélectionnés dans ce travail. L'évaluation de la perméabilité génère, comme la brillance, des valeurs discrètes, relativement imprécises. En effet, les types de coloration à la surface de la cuticule sont assez nombreux (ponctuations, zones de diffusion plus ou moins contrastées et/ou plus ou moins étendues, fissures…) et rendent l'évaluation assez complexe et subjective.

La résistance à la dessiccation est également un critère assez utilisé (Isaacson *et al*., 2009) qui permet de traduire des propriétés dégradées de la cuticule, liées à la perte en eau non stomatique. Une grande latitude existe pour fixer les paramètres d'un test de dessiccation : la durée, la température, la présence ou non de flux d'air ou l'emplacement choisi (un espace confiné ou ouvert). Les différents tests réalisés lors de cette étude ont montré qu'un système clos avec une température contrôlée garantissait une fiabilité et une

reproductibilité des résultats. Les essais en conditions peu contrôlées (installations en conditions de température hors gel uniquement) ont abouti à des données difficilement exploitables.

Enfin, le dernier critère d'évaluation phénotypique utilisé est la détermination de la largeur des cadres de cutine. Ce critère est le plus empirique puisqu'il n'a jamais été décrit dans la littérature. Cette zone localisée autour des cellules épidermiques est définie comme le dessus d'un pied anticlinal de cutine, dans des reconstructions 3D de cuticules, observées en microscopie confocale (Yeats *et al*., 2012b). Pourtant, la largeur de ces cadres est apparue systématiquement corrélée à la charge en cutine dans les mutants Micro-Tom ou transformants WVa106 analysés, indépendamment donc du fonds génétique (Cf figure 70). L'analyse des cadres est techniquement simple mais la réalisation des observations au microscope et les prises de mesures sont assez longues, et peuvent constituer une faiblesse du système pour gérer un grand nombre d'échantillons.

4.2 Approche combinée cartographie génétique/ gène candidat-QTL

Le crible de la collection EMS Micro-Tom a permis d'isoler des mutants affectés au niveau de leur cuticule, aussi bien en terme de phénotype, que de charges en cires et en cutine mais également dans la composition lipidique de leur cuticule. L'identification fonctionnelle des gènes responsables de ces phénotypes a été entreprise pour les mutants les plus affectés. La stratégie couplant l'approche de cartographie et une recherche de gène candidats dans l'intervalle défini a parfaitement fonctionné pour identifier le mutant *gdsl2-b*. Les analyses ont permis de montrer que *gdsl2-b* présente une mutation du site d'épissage du 4ème intron, conduisant *in fine* à la non détection de la protéine GDSL2, responsable de la polymérisation de la cutine (Girard *et al*., 2012 ; Yeats *et al.*, 2012a). Cependant, cette approche a eu moins de succès avec les mutants P30B6 et P23F12, pour des raisons différentes. La cartographie est réalisée en utilisant un croisement entre le parent Micro-Tom portant le caractère d'intérêt et le parent M82 dwarf. Cependant, dans le cas du mutant P30B6, il se pourrait que la variabilité des parents soit une limite pour identifier un QTL mineur. Dans le cas du mutant P23F12, un mutant très affecté dans sa charge en cutine, l'approche QTL a permis d'identifier une zone chromosomique associée à la mutation. Cependant, la distance génétique considérable entre les marqueurs liés à la mutation n'a pas réduit suffisamment le nombre de candidats potentiels pour permettre une approche gène candidat pertinente. La difficulté réside dans la zone ciblée par l'analyse QTL, qui se révèle être proche du centromère du chromosome 9. Les zones centromériques sont généralement caractérisées par un taux de recombinaison excessivement faible (Aleksenko *et al*., 2001 ; Espeso *et al*., 2005).

Dans le cas du mutant P30B6, de nouvelles analyses de cartographie génétique ou une approche de BSA / NGS - Mapping permettront peut-être d'identifier la mutation. Pour le mutant P23F12, le faible taux de recombinaison de la zone centromérique du chromosome 9 sera difficilement pallié par la précision du génotypage avec des SNP issus du NGS. Il est probable qu'une approche combinée avec une recherche de gène candidats par RNA seq soit nécessaire.

Perspectives

Mise en place d'un réseau de mutants pour étudier les relations entre biosynthèse et transport de la cuticule chez le fruit de tomate

Chapitre 3 : Perspectives

Mise en place d'un réseau de mutants pour étudier les relations entre biosynthèse et transport de la cuticule chez le fruit de tomate

Les voies de biosynthèse de la cuticule ont été abondamment décrites au cours des années précédentes, notamment celles aboutissant à la production des cires cuticulaires. Des zones d'ombres subsistent quant à la synthèse des monomères de cutine puisqu'un certain nombre d'enzymes et de mécanismes restent encore à préciser, notamment l'ordre des réactions intervenant dans le RE. Après la synthèse des cires et des précurseurs de cutine, ces composés sont exportés du RE, à travers la membrane plasmique puis la paroi cellulaire, jusqu'à la cuticule en formation. Ces mécanismes liés au transport restent par contre encore incertains, même si certains acteurs sont identifiés, comme des transporteurs à cassette ABC de type G (Pighin *et al*., 2004) et des glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein (LTPG ; DeBono *et al*., 2009), localisés au niveau de la membrane plasmique. Le transport extracellulaire, de la paroi et jusqu'à la surface de la cuticule est très peu décrit et quelques mécanismes potentiels sont discutés : la diffusion passive des composés à travers la cuticule (Yeats *et al*., 2012a), une liaison avec un facteur permettant d'augmenter la solubilité dans l'apoplaste (Yeats et Rose, 2013) ou bien l'intervention de Non Specific Lipid Transfer Protein (nsLTP), impliqués également dans la croissance de la paroi (Nieuwland *et al*., 2005). Récemment, il a été montré que ces nsLTP étaient susceptibles de se lier avec des monomères de cutine (Tapia *et al*., 2013), ce qui en fait des candidats intéressants pour assurer le transport apoplastique. La dernière étape de la formation de la cuticule est la polyestérification des monomères permettant la formation du squelette de cutine. L'enzyme responsable de la polymérisation de la cutine n'a été découverte que récemment (Girard *et al*., 2012 ; Yeats *et al*., 2012a) et beaucoup de questions demeurent quant au fonctionnement de cette protéine. Il a été montré *in vitro* que la protéine CD1 avait une activité acyltransférase sur un substrat de 2-mono (10,16-dihydrohexadecanoyl) glycérol (2-MHG ; Yeats *et* al., 2012a). Des analyses complémentaires en RMN chez la tomate M82 ont montré, toujours *in vitro*, que l'activité de cette enzyme conduirait à une polyestérification linéaire des monomères de 2-MHG (J. Rose, communication personnelle). Cependant, l'analyse de cuticules de tomate WVa106 isolées enzymatiquement semble montrer qu'au contraire l'enzyme SlGDSL2 serait responsable de l'estérification des chaînes latérales (B. Bakan, communication personnelle). Au-delà des

fonds génétiques différents (M82 pour CD1 et WVa106 pour SlGDSL2), les séquences protéiques de ces 2 enzymes sont identiques. Ces résultats encore préliminaires montrent la complexité du phénomène de polymérisation de la cutine et illustre l'intérêt de décrypter les mécanismes associés au fonctionnement de SlGDSL2.

Une recherche de mutants affectés au niveau du gène *SlGDSL2* a donc été menée dans la collection EMS Micro-Tom dans le but d'identifier une série allélique, correspondant à plusieurs mutations ponctuelles indépendantes. L'étude de ces mutants permettra d'évaluer les conséquences de mutations différentes affectant le gène *SlGDSL2*, mais également les effets des modifications induites sur la protéine SlGDSL2.

Des analyses de transcriptome, ciblées sur des gènes reliés à la cuticule, effectuées chez certains mutants EMS isolés lors du crible de brillance, mais également chez des transformants WVa106 RNAi *GDSL2*, ont systématiquement mis en évidence un phénomène intéressant. Il semble exister un phénomène de co-expression entre le gène *SlGDSL2* et le gène codant pour le transporteur de lipides SlnsLTP2. De nombreux gènes apparaissent transcriptionnellement coordonnés, notamment au niveau de la paroi cellulaire (Brown *et al*., 2005 ; Cocuron *et al*., 2007) et il a été montré que certains profils d'expressions spatio-temporelles similaires peuvent traduire des associations protéiques (Brown *et al*., 2005 ; Ruprecht *et al*., 2011). Afin de déterminer si une telle association existe entre SlGDSL2 et SlnsLTP2, une recherche de mutants a été entreprise dans la collection EMS Micro-Tom afin d'isoler une série allélique pour *SlnsLTP2*. Ces mutants vont être utilisés pour déterminer si les conséquences de mutations sur le gène *SlnsLTP2* entraînent des effets d'une part sur le transport des lipides et d'autre part, sur SlGDSL2.

Ces mêmes études de transcriptome ciblée menées chez *gdsl2-b* ont montré qu'une mutation sur la dernière enzyme de la voie de synthèse de la cutine, la lipase hydrolase SlGDSL2, entraînait des modifications d'expression de certains gènes très en amont, impliqués dans la synthèse des monomères de cutine. Ces modifications d'expressions peuvent être régulées par de nombreux facteurs de transcription contrôlant la voie comme les gènes *SHN* (Aharoni *et al*., 2004 ; Kannangara *et al*., 2007 ; Shi *et al*., 2013), des facteurs MYB (Raffaele *et al*., 2008 ; Cominelli *et al*., 2008; Adato *et al*., 2009 ; Seo *et al*., 2011) ou encore des facteurs de type WRKY (Luo et al., 2013). Il serait intéressant de savoir si une mutation d'un acteur de la voie de synthèse de la cutine en amont perturbe également les gènes en aval, intervenant dans le transport, dans la polymérisation ou dans la régulation. L'analyse des connexions et des relations entre les étapes clés de la mise en place de la cutine que sont la synthèse des monomères, leur transport extra cellulaire et la polymérisation de la cutine peut être un moyen de déchiffrer les interactions potentielles

Famille M2	Nucléotide muté (1)	Changement AA	Mutation	Prédiction SIFT
P2F1	C286T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P3F1	C286T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P4E11	G310A	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P4F2	G413A	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P52B1	G413A	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P4H12	C489T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P35E1	C965T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P35E1	C1045T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P6F9	C1045T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P8G3	C1045T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P50F7	C1045T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P50F6	T1543C	S177S	Synonyme	Pas d'effet
P11B7	C1619T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P52H2	C1697T	intron	Silencieuse	Pas d'effet
P13E2	G1955T	R229L	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.53
P17B11	G1955T	R229L	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.53
P20A10	G1955T	R229L	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.53
P29A7	G1955T	R229L	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.53
P44F6	G1955T	R229L	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.53
P5B12	C2021T	T251M	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.13
P4H12	G2059A	D264N	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.57
P65F1	G2230A	intron	Silencieuse	Pas d'effet

Table 10 : Série allélique du gène *SlGDSL2* issue de l'analyse de 6912 familles M2 de la collection Micro-Tom EMS. Les familles sélectionnées sont indiquées en gras.
(1) depuis l'ATG.

entre les acteurs de la voie. Ainsi, une stratégie de création et d'analyse de double mutants affectés aux étapes clés de la voie (synthèse, transport, polymérisation) a été entreprise. Pour cette étude, le choix des gènes candidats a été réalisé sur 2 critères : le gène doit être caractéristique d'une étape clé de la voie et être isolé chez la tomate. Le candidat correspondant à la première étape clé, c'est-à-dire la synthèse des monomères de cutine, est la cytochrome P450 famille 86 sous famille A peptide 9, intervenant dans l'ω-hydroxylation des monomères de cutine (Shi *et al*., 2013). Le second candidat, potentiellement impliqué dans le transport des monomères de cutine, est SlnsLTP2 et le choix du 3ème candidat s'est porté sur la dernière enzyme de la voie de biosynthèse, responsable de la polymérisation du squelette de cutine, l'acyltransférase SlGDSL2.

1. Recherche de mutants alléliques *SlGDSL2*

Une étude approfondie de SlGDSL2 est nécessaire pour comprendre le fonctionnement de la polymérisation de la cutine dans la cuticule de tomate. L'avantage d'utiliser des mutants EMS par rapport à des transformants RNAi est de pouvoir disposer d'une série allélique pour chaque gène, chaque allèle étant susceptible d'avoir des conséquences différentes sur la protéine. Un intérêt supplémentaire est que les mutations EMS peuvent potentiellement générer des mutants dominant négatifs chez lesquels une protéine exprimée est défectueuse et affecte négativement, de façon dominante, un processus. Ceci peut se révéler particulièrement intéressant pour des régulateurs, comme les facteurs de transcription, chez lesquels la redondance fonctionnelle peut se traduire par une absence d'effet phénotypique chez les mutants knock-out (Diévart et Clark, 2003). Une recherche de mutants portant des variations au niveau de la séquence du gène *SlGDSL2* a donc été entreprise afin d'obtenir une série allélique.

1.1 Détection de mutants *SlGDSL2* dans la collection Micro-Tom EMS

Une analyse de 6912 familles M2 de la collection Micro-Tom EMS a été effectuée par une approche de TILLING, sur une séquence génomique de 2336 pb couvrant les 5 exons du gène *SlGDSL2*. Au total, 13 mutations ponctuelles différentes ont été détectées sur 21 mutants. Seul le mutant P35E1 cumule 2 mutations, mais qui s'avèrent positionnées sur des introns (table 10). Quatre mutations se situent au niveau de séquences codantes mais la mutation affectant la famille P50F6 est synonyme et ne provoque pas de changement d'acide aminé sur la séquence protéique de l'enzyme. La mutation nucléotidique G1955T est retrouvée chez 5 familles différentes (P13E2, P17B11, P20A10, P29A7 et P44F6) alors que les mutations C2021T et G2059A correspondent à une famille unique, P5B12 et P4H12 respectivement. Ces 3 mutations nucléotidiques conduisent à des modifications de type faux sens, provoquant un changement d'acide aminé dans la protéine. L'utilisation de l'algorithme

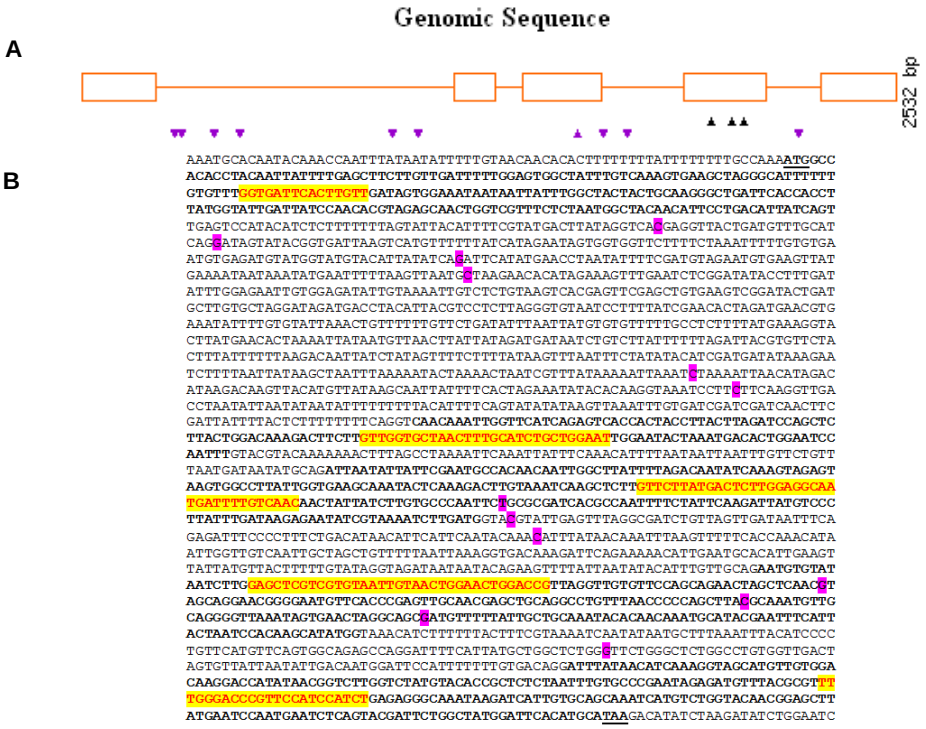
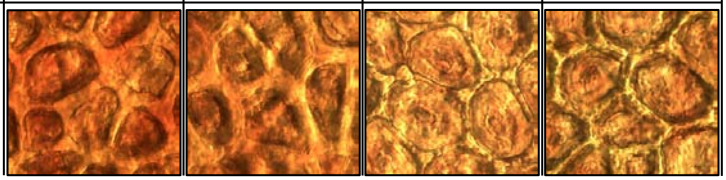


Figure 85 : Positionnement des mutations sur la séquence génomique de *SlGDSL2*. A. Représentation graphique des mutations par le programme PARSESNP (Taylor et Greene, 2003). Les triangles violets représentent les mutations silencieuses, les noirs représentent les mutations faux sens. B. Position des mutations sur la séquence génomique. Les mutations ponctuelles sont surlignées en rose ; les 5 blocs conservés chez les protéines à motif GDSL sont surlignés en jaune, avec écriture rouge ; en gras, la position des exons ; le codon d'initiation et le codon stop sont soulignés.

A

Plante	Micro-Tom WT	P13E2	P4H12	P5B12
Zygotie	homozygote	GDSL type WT	homozygote	homozygote
Brillance	normale	+	normale	+
largeur cadre cutine	28,94	35,78	15,83 *	15,92 *
SD	5,11	4,37	2,90	2,18
Observation microscopique				

B

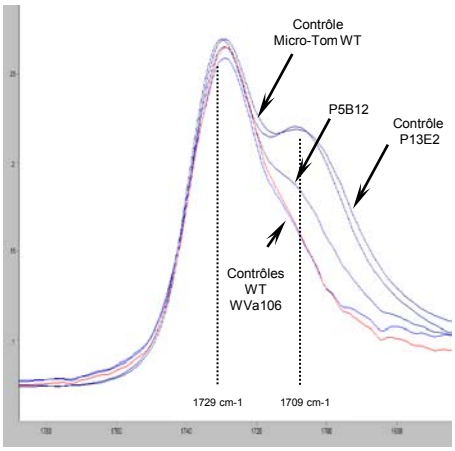


Figure 86 : Analyses phénotypiques et biochimiques préliminaires des mutants P4H12 et P5B12, au stade RR. A. Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits et mesures de la largeur des cadres de cutine des mutants P4H12 et P5B12. Les plantes WT et P13E2 non mutées sont utilisées comme références. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des mesures avec leur écart type (n=30) et l'astérisque indique une différence significative par rapport au contrôle WT ($P<0.01$) obtenues par un test *t* de Student. B. Analyses en ATR-FTIR de la cuticule de P5B12, zoom du spectre sur la bande carbonyle. Les plantes Micro-Tom WT, P13E2 et WVa106 WT sont utilisées en tant que références.

de prédiction « Sorting Tolerant From Intolerant » (SIFT) (Kumar *et al*., 2009) permet d'estimer si une substitution d'acide aminé par un autre est susceptible d'affecter la fonction de la protéine. Les valeurs de score SIFT sont comprises entre 1 et 0, et plus la valeur est faible et plus les conséquences sur la protéine risquent d'être importantes. La mutation G1955T conduit à la formation d'une leucine à la place d'une arginine, ce qui peut affecter la fonction de la protéine avec un score SIFT de 0,53. La mutation C2021T présente chez la famille P5B12 entraîne un changement d'une thréonine en méthionine, affectant la protéine avec un score SIFT de 0,13. Enfin, la famille P4H12 présente un changement de séquence protéique d'une aspartate vers une asparagine, dont le score SIFT se situe à 0,57. L'analyse du positionnement des mutations faux sens sur la séquence du gène *SlGDSL2* montre qu'elles sont toutes situées au niveau du 4ème exon (figure 85A). Aucune des mutations détectées ne se situe dans les 5 blocs conservés décrit chez les protéines à motif GDSL (Girard *et al*., 2012 ; Yeats *et al*., 2012a) (figure 85B). Les familles P13E2, P5B12 et P4H12 ont été sélectionnées. Lors d'analyse de la zygotie sur la descendance d'une plante issue de la famille P13E2, celle-ci s'est révélée non mutée sur le gène *SlGDSL2*. Elle a cependant été conservée dans les analyses pour être utilisée comme référence.

1.2 Analyses préliminaires

Une évaluation de l'état de la cuticule a été menée sur les mutants EMS afin de déterminer si les modifications affectant la protéine SlGDSL2 avaient des conséquences phénotypiques. Des évaluations de brillance et des mesures de cadres de cutine ont été effectuées sur des fruits de plantes P4H12 et P5B12, toutes les 2 homozygotes pour la mutation sur *SlGDSL2* (figure 86A). La plante P13E2 a été utilisée comme référence car elle présente une brillance forte par rapport à un fruit de type sauvage, indépendante d'une mutation sur *SlGDSL2*. Les résultats montrent que les mutants P4H12 et P5B12 présentent une diminution significative de la largeur des cadres de cutine par rapport au Micro-Tom WT, mais aussi par rapport à P13E2. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés chez le mutant *gdsl2-b*. Cependant, le mutant P4H12, à la différence de P5B12 et *gdsl2-b*, ne présente pas de brillance accrue. Ce découplage entre brillance et largeur de cadre de cutine se retrouve aussi chez P13E2, car celui-ci présente des caractéristiques opposées : cadres larges et brillance élevée.

Une analyse en spectroscopie, par Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR), a été réalisée sur les cuticules (préalablement traitées pour éliminer les cires) du mutant P5B12 et des plantes utilisées comme références, Micro-Tom WT, WVa106 WT et P13E2. Cette technique permet d'étudier la structure du polymère de cutine en analysant les vibrations de valence des molécules, le long des liaisons. Le

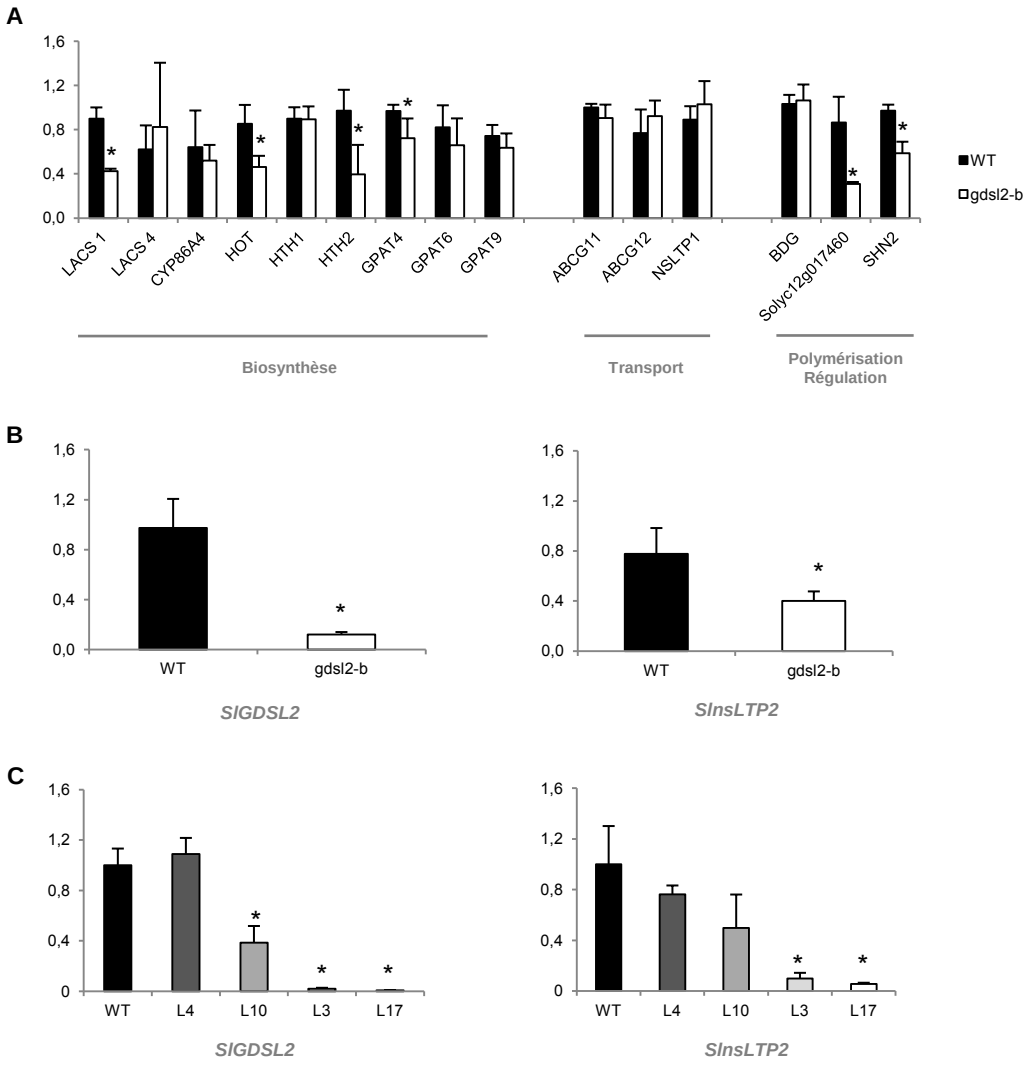


Figure 87 : Analyse de l'expression de gènes liés à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à la régulation de la cutine, à partir de cellules épidermiques de fruits de tomate à 20 JAA. A. Comparaison des profils d'expression de Micro-Tom WT et du mutant *gdsl2-b*. B. Mesures de l'expression des gènes *SlGDSL2* et *SlnsLTP2* chez Micro-Tom WT et le mutant *gdsl2-b*. C. Mesures de l'expression des gènes *SlGDSL2* et *SlnsLTP2* chez la variété de tomate cerise WVa 106 WT et 4 lignées RNAi dont le niveau d'extinction du gène *SlGDSL2* est croissant (lignée 4 (L4), L10, L3 et L17) (d'après Girard *et al*., 2012). Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des répétitions avec les barres d'erreurs (n=4). L'astérisque indique une différence significative par rapport au control WT (P<0.05) obtenue par un test *t* de Student.

spectre de la cutine est dominé par les vibrations des méthylènes, provenant des chaines aliphatiques de monomères, et par celles des doubles liaisons des groupements carbonyles (Girard *et al*., 2012). Les analyses montrent en premier lieu une différence au niveau des composés carbonylés entre WVa106 et Micro-Tom (figure 86B), avec un épaulement de la bande carbonyle à 1709 cm^{-1} retrouvée dans la variété Micro-Tom, due à la présence de liaisons hydrogène (Blume *et al.*, 1998). Cette différence dans le spectre FTIR est signe d'une variation de structure au niveau du polymère de cutine entre WVa106 et Micro-Tom. Le mutant P13E2, dont le gène *SlGDSL2* n'est pas muté, présente un profil d'ATR-FTIR identique au type sauvage Micro-Tom, malgré une brillance modifiée. La structure du polymère de cutine de P13E2 n'apparait donc pas modifiée, ce qui suggère que les différences de brillance et de largeur de cutine ont une autre origine que la polymérisation chez ce mutant. Enfin, le mutant P5B12 présente un profil intermédiaire entre WVa106 et Micro-Tom, avec un épaulement de la bande carbonyle moins prononcé à 1709 cm^{-1}. La structure de polymère de cutine est donc atteinte chez P5B12, dont la protéine SlGDSL2 présente une mutation d'un acide aminé chargé (thréonine) vers un acide aminé non chargé (méthionine), susceptible d'affecter la conformation de la protéine. De façon surprenante, les analyses menées chez WVa106 avec les lignées RNAi *GDSL2* ont montré que plus l'extinction de SlGDSL2 est forte chez les lignées et plus l'épaulement à 1710 cm^{-1} est prononcé, qui suggère une plus grande implication des groupements carbonylés dans la formation de liaison hydrogène (Girard *et al*., 2012). Une analyse du spectre ATR-FTIR du mutant *gdsl2-b*, dont la mutation entraîne une non-détection de la protéine SlGDSL2, sera prochainement réalisée afin de comparer le profil de *gdsl2-b* et celui de P5B12. Le comportement différent dans la formation des liaisons hydrogène au niveau de la cutine entre mutants *SlGDSL2* chez Micro-Tom et lignées RNAi chez WVa106 demande à être approfondie.

Les différentes familles sélectionnées font actuellement l'objet d'un nettoyage par rétrocroisement avec Micro-Tom WT dans le but d'éliminer les mutations secondaires engendrées par l'EMS. Après 2 cycles de rétrocroisements, des analyses de brillance, de largeurs de cadre de cutine, de compositions lipidiques et d'ATR-FTIR seront effectuées.

2. Lien potentiel entre cutine synthase et transporteur de lipide ?

Afin de mieux cerner l'impact de la mutation de *SlGDSL2* sur l'expression des transcrits du mutant Micro-Tom *gdsl2-b*, une analyse transcriptomique a été menée, ciblée sur des gènes associés à la biosynthèse de la cutine, au transport et à la régulation (figure 87). Ces analyses ont montré que de nombreux gènes étaient différentiellement exprimés, de manière significative par rapport au contrôle. Les gènes intervenant dans l'activation des

acides gras libres (*LACS1*), dans l'ω-hydroxylation des monomères de cutine (*HOTHEAD*, *HTH2*) et codant pour une activité glycérol acyltransférase (*GPAT4*) montrent une forte diminution de leur expression (figure 87A). De la même manière, le gène *Solyc12g017460*, codant pour une enzyme de type GDSL lipase localisée sur le chromosome 12, impliquée dans la polymérisation du squelette de cutine, et *SHN2*, gène codant pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la cutine, sont sous-exprimés chez le mutant *gdsl2-b* par rapport au type sauvage. De façon intéressante, les gènes associés au transport (*ABCG11*, *ABCG12* et *SlnsLTP1*) ne montrent aucune variation significative de leur expression dans un contexte où la protéine SlGDSL2 n'est pas ou peu exprimée. Par contre, le transporteur SlnsLTP2 montre une baisse significative de son expression (figure 87B).

Ce résultat est à mettre en parallèle de résultats obtenus chez la tomate cerise WVa106, dans des lignées RNAi dirigées contre le gène *SlGDSL2* (Girard *et al*., 2012). En effet, on peut observer un niveau de décroissance de l'expression de *SlnsLTP2* corrélé positivement au niveau d'extinction du gène *SlGDSL2* chez les lignées RNAi (figure 85C). A l'inverse, l'étude du mutant P23F12, dont la mutation n'a pas été identifiée, a montré qu'une augmentation de l'expression de *SlGDSL2* entraînait une surexpression de *SlnsLTP2* (Chapitre 2, partie II, figure 75). Il est intéressant de constater que *SlnsLTP2* semble co-exprimée avec *SlGDSL2*, quel que soit le fonds génétique. De nombreuses études sur la co-expression de gènes révèlent des associations fonctionnelles potentielles entre gènes co-régulés (Ruprecht *et al*., 2011).

Il a déjà été montré par des analyses de transcriptome sans *a priori* que les transporteurs lipidiques de type nsLTP et les enzymes de polymérisation à motif GDSL partagent des territoires d'expression communs (Lemaire-Chamley *et al*., 2005 ; Mintz-Oron *et al*, 2008 ; Matas *et al*, 2011). De par sa localisation extra cellulaire (Le *et al*., 2006) et sa capacité théorique à fixer du Palmitoyl-CoA (Tapia *et al*., 2013), le transporteur de lipides SlnsLTP2 s'avère être un candidat au transport des monomères de cutine à travers l'apoplasme. La potentielle co-expression existant entre ces 2 gènes pourrait signifier une association entre une enzyme de polymérisation de la cuticule et un transporteur de monomère. Ce type d'association n'a pas encore été décrit chez la cuticule et une analyse approfondie des 2 gènes et de leurs possibles interactions est nécessaire.

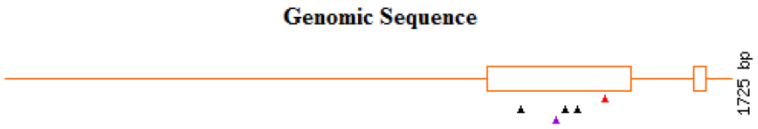
3. Recherche de mutants alléliques *SlnsLTP2*

La première étape pour caractériser le rôle potentiel de SlnsLTP2 dans le transport des monomères de cutine est d'isoler une série allélique de mutants affectés au niveau du gène *SlnsLTP2* .

Famille M2	Nucléotide muté (1)	Changement AA	Mutation	Prédiction SIFT
P6B8	G80A	C27Y	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.01
P22H8	G165A	K55K	synonyme	Pas d'effet
P2F2	A185T	K62M	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.1
P29C1	A185T	K62M	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.1
P9E12	C215G	T72S	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0.6
P48E10	G280T	G94*	KO	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0
P9F12	ND	-	-	-

Table 11 : Série allélique du gène *nsLTP2* issue de l'analyse de 7296 familles M2 de la collection Micro-Tom EMS. Les familles sélectionnées sont indiquées en gras.
(1). Depuis l'ATG.
ND: non déterminé après séquençage

A



B

```
ATG GAA ATG TTT GGA AAA ATT GCA TGC TTT GTG GTT TTT TGC ATG GTG GTG GTT GCA
 M   E   M   F   G   K   I   A   C   F   V   V   F   C   M   V   V   V   A
CCC CAT GCA GAG TCA CTG AGC TGC GGC GAG GTT ACG TCT GGC TTG GCT CCT TGT CTC
 P   H   A   E   S   L   S   C   G   E   V   T   S   G   L   A   P   C   L
CCT TAT CTC GAG GGT CGC GGC CCT CTA GGA GGG TGT TGT GGT GGT GTT AAG GGT CTA
 P   Y   L   E   G   R   G   P   L   G   G   C   C   G   G   V   K   G   L
TTG GGC GCA GCC AAG ACC CCA GAA GAC CGG AAG ACA GCG TGC ACT TGC CTT AAA TCG
 L   G   A   A   K   T   P   E   D   R   K   T   A   C   T   C   L   K   S
GCA GCT AAT TCT ATT AAG GGC ATT GAT ACA GGA AAA GCC GCT GGG CTC CCT GGA GTT
 A   A   N   S   I   K   G   I   D   T   G   K   A   A   G   L   P   G   V
TGT GGA GTC AAC ATT CCT TAC AAG ATC AGC CCT TCC ACT GAT TGC TCA ACG GTC CAG
 C   G   V   N   I   P   Y   K   I   S   P   S   T   D   C   S   T   V   Q
TAA
 *
```

Figure 88 : Positionnement des mutations sur la séquence exprimée de *SlnsLTP2*. A. Représentation graphique des mutations par le programme PARSESNP (Taylor et Greene, 2003). Le triangle violet représente la mutation synonyme, les noirs représentent les mutations faux sens et le triangle rouge représente la mutation KO. B. Position des mutations sur la séquence exprimée et des 8 cystéines caractéristiques des nsLTP sur la séquence protéique. Les mutations ponctuelles sont surlignés en rose ; les cystéines sont surlignées en jaune.

3.1 Détection de mutants *SlnsLTP2* dans la collection Micro-Tom EMS

Pour la recherche de mutants alléliques affectés au niveau du gène *SlnsLTP2*, une stratégie TILLING a été conduite et 7296 familles M2 ont été analysées, sur une séquence cible de 874 pb couvrant les 2 exons du gène. Sur les 7 familles ayant présenté un signal positif, 5 mutations ponctuelles différentes ont été validées par séquençage (table 11), toutes situées sur les exons du gène. La famille P6B8 présente une mutation en G80A, correspondant à une modification faux sens d'une cystéine en tyrosine, 2 acides aminés polaires. Cette mutation affecte la protéine avec un score SIFT très fort de 0,01. La famille P22H8 est mutée en G165A mais la mutation est synonyme, n'entrainant aucune modification d'acide aminé. Les familles P2F2 et P29C1 portent la même mutation en A185T, induisant une modification faux sens d'une lysine en méthionine, avec un score SIFT élevé de 0,1. La famille P9E12 porte la mutation C215G, ce qui entraîne un changement faux sens d'acide aminé, d'une thréonine vers une sérine, 2 acides aminés polaires, affectant la protéine avec un score SIFT de 0,6. La famille P48E10, présente une mutation en G280T provoquant le changement d'une glycine en codon stop. Ce Knock-Out (KO) se traduit par la production putative d'une protéine tronquée. L'ensemble des mutations affectent l'exon 1 du gène *SlnsLTP2* (figure 88A).

La famille des nsLTP est caractérisée par une séquence protéique présentant un motif de 8 cystéines de type C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-CXn-C (Wang *et al*., 2012). Les cystéines de tomate forment un motif X_{26} C-X_9-C-X_{12}-CC-X_{19}-CXC-X_{22}-CX_{13}-C X_4 (figure 88B). Les nsLTP ont été hiérarchisés en classes distinctes, suivant le nombre de résidus entre les différentes cystéine (Wang *et al*., 2012). La protéine SlnsLTP2 de tomate présente un nombre de résidus entre les 8 cystéines similaire à un type I mais le nombre de résidus à l'extérieur du motif ne correspond à aucune classe de nsLTP établie par Wang *et al*. (2012). La localisation des mutations présentes dans la série allélique de *SlnsLTP2* montre que P6B8 est affecté au niveau de la première cystéine du motif. De plus, P2F2 présente une mutation au niveau d'un endroit particulier, entre la 5ème et la 6ème cystéine du motif, avec une mutation d'acide aminé assez importante pouvant avoir des répercussions sur la conformation de la protéine, avec le changement d'une lysine, un acide aminé chargé, en thréonine, un acide aminé polaire.

Les familles P6B8, P2F2, P9E12 et P48E10 ont été sélectionnées et des rétrocroisements sont en cours pour obtenir des plantes BC2 F2 homozygotes pour la mutation.

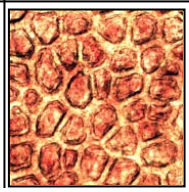
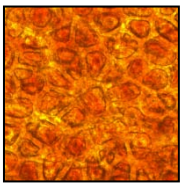
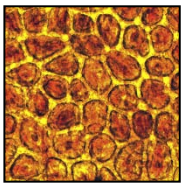
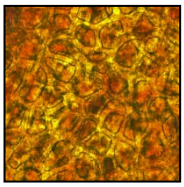
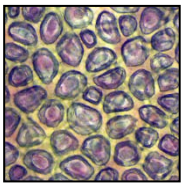
Plante	Micro-Tom WT	P6B8	P9E12	P48E10	P2F2
Zygotie	homozygote	Homozygote	Homozygote	Homozygote	Homozygote
Brillance MG	normale	+	+	+	+
Brillance RR	normale	normale	+	+	normale
largeur cadre cutine	25,6	38,1	25,2	18,8	25,5
SD	7,2	5,3	3,0	2,4	5,6
Observation microscopique					

Figure 89 : Analyses phénotypiques préliminaires des mutants atteints au niveau du gène *nsLTP2*, appartenant aux familles P6B8, P9E12, P48E10 et P2F2. Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits aux stades MG et RR, mesures de la largeur des cadres de cutine au stade RR. La plante WT est utilisée comme référence. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des mesures avec leur écart type (n=20) et une recherche de différence significative par rapport au contrôle WT (P<0.01) a été effectuée par un test *t* de Student..

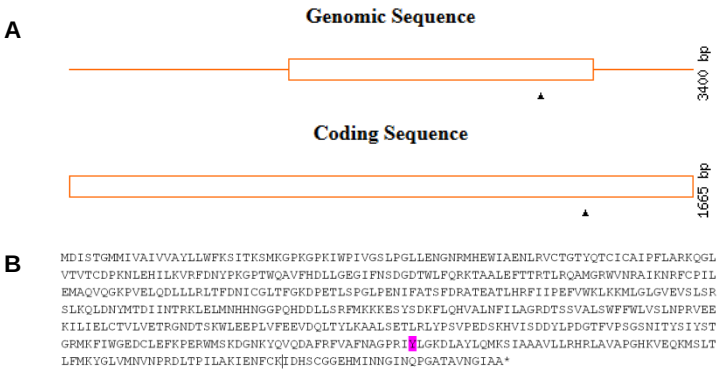


Figure 90 : Positionnement de la mutation sur la séquence génomique et codante de *SlCYP86A69*. A. Représentation graphique des mutations par le programme PARSESNP (Taylor et Greene, 2003). Le triangle noir représente la mutation faux sens. B. Position de la mutation sur la séquence protéique de SlCYP86A69, avec l'acide aminé modifié surligné en rose (adapté de Shi *et al*., 2013)

3.2 Analyses phénotypiques au stade BC1 F2

Des analyses préliminaires de la brillance et de la largeur des cadres de cutine ont été effectuées sur des plantes génération F2, après 1 tour de rétrocroisement avec le WT (c'est-à-dire en BC1 F2). La plante P2F2 a été analysée avant les étapes de rétrocroisement, à l'état homozygote. La brillance des mutants *nsltp2*, que ce soit aux stades MG ou RR, semble relativement peu modifiée (figure 89). L'ensemble des mutants présente des fruits effectivement plus brillants que ceux du WT au stade MG, mais le niveau de brillance reste modéré. Au stade RR, seuls les mutants P9E12 et P48E10 apparaissent plus brillants que le WT, mais à un niveau de brillance bien inférieur à celui évalué avec les mutants *gdsl2-b* ou P23F12 par exemple. L'analyse de la largeur des cadres de cutine a été réalisée sur les mutants aux stades RR, avant rétrocroisement P2F2 et sur des plantes BC1 F2 pour P6B8, P9E12 et P48E10. Les mutants P9E12 et P2F2 ont un profil similaire au WT alors que le mutant P6B8 présente des cadres à la largeur accrue, sans toutefois que la différence soit statistiquement significative ($P<0,01$). Le mutant P48E10, pourtant porteur d'une mutation KO, présente une légère différence avec le WT, avec une valeur moyenne des mesures inférieure à celle du WT mais la différence n'est pas statistiquement significative. D'après ces analyses préliminaires, il ne semble pas que les conséquences des mutations sur la protéine SlnsLTP2 soient mesurables par la brillance et la largeur des cadres de cutine.

Il est possible que les effets sur SlnsLTP2 ne soient observables qu'en utilisant d'autres méthodes comme une analyse biochimique de la composition des lipides cuticulaires par exemple. Il est aussi envisageable qu'une redondance fonctionnelle puisse exister avec d'autres nsLTP, notamment SlnsLTP1, ce qui pourra être déterminé par une analyse de l'expression des gènes liés au transport de la cuticule. Ces analyses seront menées sur des plantes en BC2 F2.

4. Mutant *Slcyp86a69*

Le gène *SlCYP86A69* code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la cutine, une cytochrome P450 à l'activité ω-hydroxylase qui utilise potentiellement comme substrat les acides gras en C18 :1 pour les hydroxyler en C18 :1 hydroxy CoA. Chez le riz, le gène *CYP86A69* est surexprimé en cas de stress salin (Krishnamurthy *et al*., 2009) et chez la tomate, il a été montré récemment que ce gène est une des cibles majeures du gène de régulation *SlSHN3* (Shi *et al*., 2013).

4.1 Caractérisation du mutant *Slcyp86a69*

SlCYP86A69 est un gène sans intron de 1665 pb (figure 90A), localisé sur le chromosome 8, qui code pour une protéine de 554 acides aminés. La mutation affectant

Famille M2	Nucléotide muté (1)	Changement AA	Mutation	Prédiction SIFT
P26E4	G2572A	C460Y	Faux sens	Fonction de la protéine affectée avec un score de 0

Table 12 : Effet de la mutation affectant la famille P26E4 au niveau du gène *SlCYP86A69*, au niveau nucléotidique et protéique (adapté de Shi *et al.*, 2013)
(1) Depuis le début de l'ATG.

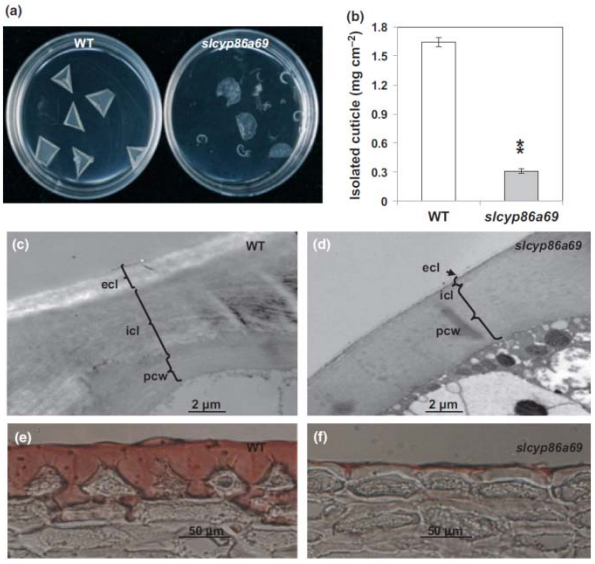


Figure 91 : Caractérisation de la cuticule du mutant *Slcyp86a69*. (a) Disques de cuticule isolés enzymatiquement sur des fruits au stade MG chez le WT et *Slcyp86a69*. (b) Masse de la cuticule isolée au stade Br, chez le WT et le mutant. Les valeurs sont des moyennes (n=5) et les astérisques indiquent une différence significative à *P*<0,01 déterminée par un test *t* de Student. (c-d) Microscopie électronique à transmission (TEM) de l'épiderme du WT (c) et de *Slcyp86a69* (d). ecl, couche cuticulaire externe; icl, couche cuticulaire interne; pcw, paroi cellulaire primaire. (e, f) Coloration au rouge Soudan IV de l'épiderme de fruit WT (e) et *Slcyp86a69* (Shi *et al*., 2013).

	µg mg^{-1}			
	slcyp86a69		WT	
Cutin monomers	Mean	SE	Mean	SE
Aromatics				
trans-coumaric_acid	0.532	0.097	0.696	0.017
cis-coumaric_acid	0.005	0.001	0.004	0.001
Subtotal	0.537	0.098	0.700	0.017
Saturated fatty acids (FAs)				
C16:0 FA	0.753	0.141	0.114	0.012
C18:0 FA	0.006	0.001	0.008	0.004
Subtotal	0.759	0.142	0.122	0.014
Dicarboxylic fatty acids (DFAs)				
C16:0 DFA	0.018	0.007	0.149	0.001
Terminal hydroxylated fatty acids (ω-HFAs)				
C16-ω-HFA	0.140	0.044	0.900	0.031
Midchain hydroxylated fatty acids (HFAs)				
C16-10-HFA	0.014	0.003	0.087	0.001
C16-9,10/16 Di HFA	14.304	3.821	30.188	1.484
C18:1-9,10,18-Tri HFA	0.000	0.000	0.001	0.000
C18-9,10,18-Tri HFA	0.013	0.004	0.095	0.003
C18 Penta HFA	0.010	0.001	0.044	0.001
Subtotal	14.342	3.828	30.416	1.485
2-Hydroxylated fatty acids (2HFAs)				
C18:1 2HFA	0.098	0.027	0.415	0.027
C23 2HFA	0.004	0.001	0.002	0.000
Subtotal	0.102	0.026	0.417	0.027
Others				
Naringenine	0.010	0.002	0.054	0.009
Naringenin chalcone	0.029	0.002	0.119	0.033
Subtotal	0.040	0.004	0.173	0.042
Unidentified (UI) monomers				
UI-1	0.061	0.008	0.114	0.003
UI-2	0.020	0.006	0.006	0.000
UI-3	0.010	0.001	0.001	0.000
UI-4	0.071	0.009	0.000	0.000
UI-5	0.863	0.245	2.396	0.304
Subtotal	1.025	0.258	2.517	0.305
Total	16.962	4.284	35.393	1.735

Table 13: Liste des monomères de cutine isolés enzymatiquement après dépolymérisation, avec leur concentrations respectives chez *Slcyp86a69*.
En gris : monomères montrant des différences significatives avec le WT (test *t* de Student, *P*<0,05, n=4), (Shi *et al*., 2013).

Slcyp86a69 provoque un missense de G vers A, à la position 2572 après le début du promoteur (table 12), ce qui entraîne une modification de l'acide aminé cystéine, en position 460 après la méthionine, en tyrosine (figure 90B). Le score de la prédiction SIFT est maximum (=0) car la cystéine en position 460 fait partie d'un site actif majeur, commun à toutes les cytochromes P450, de séquence FXXGXXXCX. La cystéine mutée correspond à la lettre C soulignée dans le motif (Shi *et al*., 2013). La caractérisation du mutant *Slcyp86a69*, identifié chez la famille P26E4 de la collection Micro-Tom EMS de Bordeaux a montré une cuticule très fragile, se fragmentant très facilement après extraction enzymatique (figure 91A), ce qui pourrait être une conséquence de l'hétérogénéité du polymère, avec des zones appauvries en cutine (Shi *et al*., 2013). La masse de cuticule extraite est réduite de 82% chez *Slcyp86a69* par rapport au WT (figure 91B), ce qui se traduit au niveau cytologique d'une part par une quasi disparition du gradient existant entre paroi cellulaire et cuticule (figure 91D), avec une couche cuticulaire interne repoussée dans la partie la plus externe, et d'autre part, par une épaisseur de cutine très réduite (figure 91F) (Shi *et al*., 2013). L'analyse de la composition cuticulaire du mutant *Slcyp86a69* montre une baisse de près de 52% de la quantité totale de cutine par rapport au type sauvage, provoquée par une baisse de près de 50% du composé majoritaire, l'acide 9(10),16-dihydroxy héxadécanoique (table 13). Le mutant présente également une augmentation significative du pool d'acides gras libres en C16, pouvant être la conséquence de la faible utilisation des précurseurs (Shi *et al*., 2013). Le mutant *Slcyp86a69* s'avère donc être un candidat très intéressant, correspondant aux étapes de biosynthèse des monomères de cutine dans le RE. Une série de rétrocroisements a donc été entreprise jusqu'à la génération BC2 F2.

4.2 Analyses phénotypiques au stade BC1 F2

Une analyse préliminaire a été réalisée sur des fruits MG et RR du mutant *Slcyp86a69* pour caractériser l'effet de la mutation sur la largeur des cadres de cutine et sur la brillance du fruit. Les fruits de *Slcyp86a69* se sont avérés très brillants, aussi bien aux stades MG que RR (figure 92). La largeur des cadres de cutine a également été déterminée et une baisse de 59,8% est constatée par rapport aux valeurs obtenues chez le WT. Lors des observations microscopiques, des zones sombres sont réparties aléatoirement à la surface de l'épiderme, au niveau de groupes de cellules épidermiques. La coloration concerne aussi bien l'intérieur des cellules que leur paroi et cuticule, et peut faire penser à un phénomène d'oxydation des flavonoïdes ou d'autres composés phénoliques qui s'accumulent. S'il existe des zones moins denses en polymère de cutine à la surface de la cuticule, il est possible que ce soit ces zones qui soient plus sensibles à l'oxydation. Une analyse approfondie sera réalisée sur les plantes en BC2 F2.

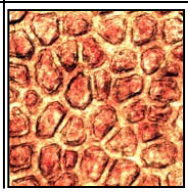
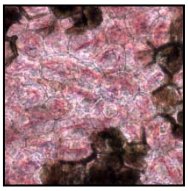
Plante	**Micro-Tom WT**	***Slcyp86a69***
Zygotie	homozygote	Homozygote
Brillance MG	normale	++
Brillance RR	normale	++
largeur cadre cutine	25,6	10,3 *
SD	7,2	0,9
Observation microscopique		

Figure 92 : Analyses phénotypiques préliminaires au stade BC1 F2 du mutant *Slcyp86a69*. Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits aux stades MG et RR, mesures de la largeur des cadres de cutine au stade RR. La plante WT est utilisée comme référence. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des mesures avec leur écart type (n=20) ; une recherche de différence significative par rapport au contrôle WT (P<0.01) a été effectuée par un test *t* de Student. ND : non déterminé.

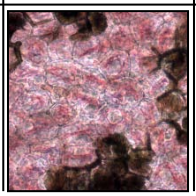
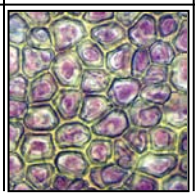
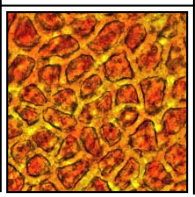
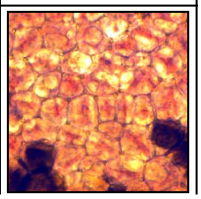
Plante	***Slcyp86a69***	***nsltp2* P48E10**	**Hybride F1**	**Plante F2**
Zygotie	Homozygote	Homozygote	Hétérozygote	Double homozygote
Brillance MG	+++	+	normale	+++
Brillance RR	+++	+	normale	+++
largeur cadre cutine	10,3	21,8	21,8	9,0
SD	0,9	3,7	3,0	1,4
Observation microscopique				

Figure 93 : Analyses phénotypiques préliminaires du double mutant *nsltp2* x *Slcyp86a69*. Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits aux stades MG et RR, mesures de la largeur des cadres de cutine au stade RR. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des mesures avec écart type (n=20).

5. Création de double mutants

L'étude des mutants affectés au niveau de la biosynthèse (*cyp86a69*), du transport (*nsltp2*) et de la polymérisation (*gdsl2-b*) permettra d'évaluer les conséquences de perturbations ciblées sur des acteurs clés de la voie de biosynthèse. Afin d'aller plus loin dans la compréhension de la régulation et des relations existantes entre les gènes de la voie, la création de double mutants a été entreprise. Celle-ci a pour but d'engendrer des mutants aux phénotypes cuticulaires marqués, permettant de mettre en évidence d'une part les conséquences biochimiques et moléculaires dues à des perturbations lourdes, mais aussi l'effet induit sur les autres gènes de la voie. La stratégie utilisée est de créer des mutants, atteints à 2 étapes clés de la voie de synthèse de la cuticule. Le but est d'obtenir un double mutant « synthèse RE + transport », « synthèse RE + polymérisation » et « transport + polymérisation ». Ces doubles mutants atteints au niveau d'acteurs précoces ou tardifs de la voie, sont générés par croisements successifs. L'intérêt d'utiliser des mutants EMS dans une telle démarche, par rapport à une autre alternative comme la génération de lignées transgéniques RNAi est, par la suite, de pouvoir réaliser aisément la transformation génétique des mutants pour un ou d'autres gènes cibles. Les mutants sont en effet dépourvus des marqueurs de sélection les plus efficaces pour la transformation de la tomate, ce qui rend l'analyse d'un gène cible par transformation (sur-expression, RNAi) bien plus facile dans un contexte génétique mutant.

5.1 Double mutant « synthèse RE + transport »

Le double mutant « synthèse RE + transport » est issu d'un croisement entre le mutant *Slcyp86a69* homozygote et le mutant P48E10 homozygote. Le choix du parent atteint au niveau de *SlnsLTP2* s'est porté sur P48E10 en raison de la nature de la mutation affectant cette famille, à savoir un KO au niveau de la protéine SlnsLTP2. L'hybride F1 obtenu présente des fruits aux caractéristiques identiques à un fruit de type WT, c'est-à-dire une brillance normale, aussi bien aux stades MG que RR, et des cadres de cutine équivalent aux valeurs d'un fruit Micro-Tom de type sauvage (figure 93). La complémentation allélique de l'hybride peut expliquer ces résultats puisque la plante hybride porte également un allèle non muté des gènes *Slcyp86a69* et *SlnsLTP2*. Le double homozygote présente quant à lui des caractéristiques proches du parent *Slcyp86a69*, avec une brillance très élevée aux stades MG et RR, et des cadres de cutine étroits. Le double mutant présente également au niveau de son épiderme les tâches de brunissement caractéristiques du mutant *Slcyp86a69*. Le gène *SlCYP86A69* affectant la biosynthèse de la cutine, il intervient très en amont par rapport au transporteur. Par conséquent, il n'est pas surprenant que les conséquences de la perturbation causée par la mutation sur *SlCYP86A69* soient prédominantes par rapport à

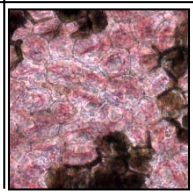
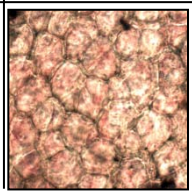
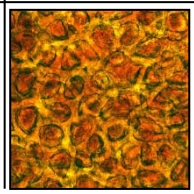
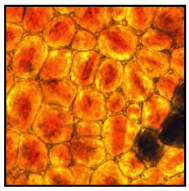
Plante	***Slcyp86a69***	***gdsl2-b***	**Hybride F1**	**Plante F2**
Zygotie	Homozygote	Homozygote	Hétérozygote	Double homozygote
Brillance MG	+++	+++	normale	+++
Brillance RR	+++	+++	normale	+++
largeur cadre cutine	10,3	10,5	19,1	9,2
SD	0,9	1,8	3,4	1,4
Observation microscopique				

Figure 94 : Analyses phénotypiques préliminaires du double mutant *Slcyp86a69* x *gdsl2-b*. Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits aux stades MG et RR, mesures de la largeur des cadres de cutine au stade RR. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des mesures avec écart type (n=20).

celles causées par un gène intervenant en aval. Cependant, comme observé lors de la caractérisation phénotypique de la série allélique de *SlnsLTP2*, la mutation sur ce transporteur ne semble pas avoir de conséquences marquées sur la largeur des cadres de cutine. En effet, les valeurs obtenues chez le double mutant sont légèrement inférieures à celle du simple mutant *Slcyp86a69*, mais pas de façon statistiquement significative.

5.2 Double mutant « synthèse RE + polymérisation »

Ce double mutant affecté au niveau d'une ω-hydroxylase, étape clé de la biosynthèse des monomères de cutine, et au niveau de la dernière étape de la voie, c'est-à-dire la polymérisation de la cutine a été obtenu par croisement entre les mutants *Slcyp86a69* et *gdsl2-b*, issu du criblage de la collection EMS Micro-Tom. Le mutant *gdsl2-b* est un mutant KO au niveau du dernier exon du gène *SlGDSL2*, ce qui entraîne une non-détection de la protéine SlGDSL2. L'hybride F1 présente des caractéristiques proches d'un fruit de type WT, semblant montrer que l'hybride complémente ses allèles déficients (figure 94). La plante double homozygote *Slcyp86a69-gdsl2-b* présente un phénotype pratiquement identique au double mutant *Slcyp86a69-nsltp2* puisque les caractéristiques sont proches du parent *Slcyp86a69*, avec la présence de zones riches en composés potentiellement oxydés. Les valeurs de largeurs de cadres de cutine sont proches de celles obtenues chez les parents, et la légère baisse n'est pas statistiquement significative. Il est intéressant de constater que le double mutant ne présente pas, comme pour *Slcyp86a69-nsLTP2,* un cumul des phénotypes puisque l'aspect et la largeur de cadres de cutine ne semblent pas plus affectés par la double mutation que chez les 2 simples mutants considérés individuellement. Une nouvelle fois, il est probable que les conséquences de la mutation sur *SlCYP86A69*, intervenant plus en amont dans la voie, sont prépondérantes dans la détermination du phénotype du double mutant.

5.3 Double mutant « transport + polymérisation »

Un double mutant « transport + polymérisation » est l'outil pour étudier la relation potentielle qui existe entre le transporteur apoplastique SlnsLTP2 et l'enzyme SlGDSL2 impliquée dans la polymérisation du squelette de cutine. Pour cela, 2 doubles mutants distincts ont été générés, en utilisant 2 mutants alléliques de *SlnsLTP2*, P6B8 et P48E10, les 2 mutants les plus affectés d'après les scores SIFT. Le mutant P6B8 présente la modification en tyrosine d'une cystéine du motif caractéristique des nsLTP. Le mutant P48E10 présente une mutation KO au niveau de la fin du premier exon. L'autre parent choisi pour générer le double mutant « transport + polymérisation » est *gdsl2-b*. L'intérêt de créer 2 doubles mutants est de pouvoir générer des plantes aux caractéristiques phénotypiques ou biochimiques différentes, permettant de mieux décrypter les mécanismes de la relation entre

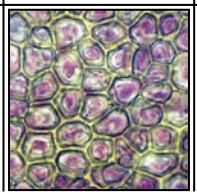
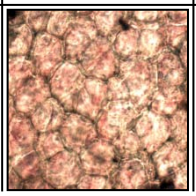
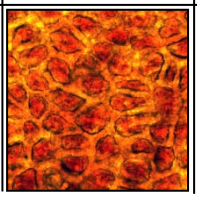
Plante	***nsltp2* P48E10**	***gdsl2-b***	**Hybride F1**	**Plante F2**
Zygotie	Homozygote	Homozygote	Hétérozygote	En cours d'analyse
Brillance MG	+	+++	normale	ND
Brillance RR	+	+++	normale	ND
largeur cadre cutine	21,8	10,5	24,8	ND
SD	3,7	1,8	4,4	ND
Observation microscopique				ND

Figure 95 : Analyses phénotypiques préliminaires du double mutant *nsltp2* P48E10 x *gdsl2-b*. Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits aux stades MG et RR, mesures de la largeur des cadres de cutine au stade RR. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des mesures avec écart type (n=20). ND : non déterminé

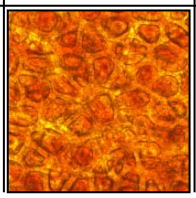
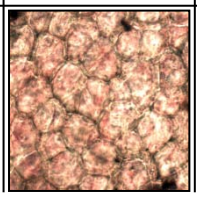
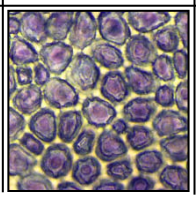
Plante	***nsltp2* P6B8**	***gdsl2-b***	**Hybride F1**	**Plante F2**	**Plante F3**
Zygotie	Homozygote	Homozygote	Hétérozygote	Pas de double mutant	En cours d'analyse
Brillance MG	+	+++	normale	ND	ND
Brillance RR	normale	+++	normale	ND	ND
largeur cadre cutine	38,1	10,5	19,8	ND	ND
SD	5,3	1,8	2,6	ND	ND
Observation microscopique				ND	ND

Figure 96 : Analyses phénotypiques préliminaires du double mutant *nsltp2* P6B8 x *gdsl2-b*. Evaluation de la brillance de la cuticule des fruits aux stades MG et RR, mesures de la largeur des cadres de cutine au stade RR. Les valeurs, indiquées en unités arbitraires, représentent les moyennes des mesures avec écart type (n=20). ND : non déterminé

le transporteur SlnsLTP2 et l'enzyme SlGDSL2. Les mutants simples P6B8 et P48E10 ne présentent pas de phénotypes remarquables au niveau de leur brillance ou de la largeur des cadres de cutine, pourtant des conséquences sur le développement des fruits ou les ségrégations obtenues sont observées avec les doubles mutants *nsltp2* et *gdsl2-b*

Le croisement entre *nsltp2* P48E10 et *gdsl2-b* permet d'obtenir une plante F1 aux fruits ayant des caractéristiques proches d'un fruit de type sauvage, aussi bien en terme de brillance que de largeur de cadres de cutine (figure 95). Cependant, sur les 3 plantes F1 générées, seule une plante a produit des graines, sur certains de ses fruits uniquement. Jusqu'à présent, les différentes générations de plantes à mutation simple P48E10 ou *gdsl2-b* n'ont jamais donné de plantes à fruits parthénocarpiques. Seul le mutant P17F12 a montré une impossibilité de produire des graines, sans que cette propriété n'ait pu être reliée formellement à un défaut de cuticule (Chapitre 2, partie II). Un effet seuil peut être une hypothèse pour expliquer ce phénomène, seuil non atteint chez les mutants simples. Une autre mutation affectant P48E10 ou éventuellement *gdsl2-b* peut également être à l'origine de ce phénotype. Une population de plantes F2 est actuellement en cours d'obtention pour rechercher des individus homozygotes pour les 2 mutations.

Un autre double mutant permettant l'étude de la relation entre SlGDSL2 et SlnsLTP2 est généré par le croisement entre *nsltp2* P6B8 et *gdsl2-b.* La plante F1 obtenue semble complémenter ses allèles et présente un phénotype proche d'un fruit de type WT, au niveau de la brillance et de la largeur des cadres de cutine (figure 96). Les plantes F1 présentaient des fruits avec graines et 40 plantes F2 ont été obtenues. Les analyses de zygotie ont montré qu'aucune des plantes F2 n'étaient homozygotes pour les 2 mutations. A partir d'une plante homozygote pour la mutation *SlnsLTP2* (P6B8) et hétérozygote pour la mutation sur *SlGDSL2*, une population F3 de 40 plantes a été générée pour obtenir un double homozygote dans la descendance. Les plantes F3 sont actuellement en cours d'analyse.

5.4 Double mutants non identifiés

Un certain nombre de mutants issus du criblage de brillance de la collection EMS Micro-Tom présentent des phénotypes remarquables, mais leurs mutations ne sont pas encore identifiées. C'est le cas du mutant P23F12, présentant une charge en cutine réduite de 72%, une charge en cires accrues de 70% et une brillance augmentée aux stades MG et RR. L'identification de la mutation affectant P23F12, causant le phénotype n'a pas pu être déterminée mais une analyse par une de NGS-Mapping est actuellement en cours. Le mutant P26E8 présente aussi un profil lipidique atypique, avec une quantité d'acides dicarboxyliques dans la cutine quadruplée par rapport au WT et un taux de cires doublé. La ou les mutations causant le phénotype de P26E8 sont inconnues.

Ainsi, le mutant P23F12 a été croisé avec le mutant *gdsl2-b*, déficient dans l'enzyme de polymérisation de la cutine, avec *nsltp2* P6B8, mutant affecté dans un transporteur de lipides non spécifique, avec P26E8, le mutant riche en acides dicarboxyliques et avec *Slcyp86a69*, un mutant affecté au niveau d'une ω-hydroxylase. Le mutant P26E8 a été croisé également avec *Slcyp86a69*. L'ensemble de ces croisements a généré des plantes F1 complémentant leurs allèles indiquant que les mutations sont indépendantes. Les effets phénotypiques de chaque mutation prise individuellement ne sont pas suffisamment quantifiables pour pouvoir sélectionner des doubles homozygotes sur une population F2. Les graines des hybrides F1 sont donc stockées jusqu'à ce que les mutations affectant P23F12 et P26E8 soient identifiées.

Conclusions générales

Conclusions générales

Des avancées majeures concernant la synthèse et la régulation de la cuticule ont été permises par les travaux menés sur l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, notamment par l'utilisation de mutants et d'outils de génomique performants. Les principales voies de synthèse des cires et des polymères de cutine ont ainsi pu être décryptées (Bernard et Joubès, 2013 ; Pollard *et al*., 2008) et les connaissances concernant les mécanismes liés au transport et à la régulation de la cuticule progressent rapidement (Yeats et Rose, 2013). Aujourd'hui, les principales questions concernent les liens existant entre les propriétés de la cuticule et sa composition mais également les relations entre les composants pariétaux et cuticulaires. Enfin, il reste à déterminer en quoi ces interactions peuvent affecter les caractéristiques de la plante, que ce soit au niveau de sa croissance ou de sa résistance aux stress biotiques et abiotiques.

La tomate est un modèle particulièrement bien adapté aux études sur la cuticule pour diverses raisons. D'une part, sa composition cuticulaire est similaire à la majorité des autres plantes et est homogène entre les tissus, à la différence d'*Arabidopsis thaliana* qui présente une surreprésentation des acides dicarboxyliques et de grandes différences de compositions entre les tissus. D'autre part, au niveau du fruit, la cuticule est très épaisse, s'accumule tout au long du développement du fruit et se caractérise par l'absence de stomates mais aussi de trichomes (au stade RR). Elle s'est donc rapidement imposée comme un matériel de choix pour les études de perméabilité (Schreiber, 2010) et les analyses biomécaniques (Dominguez *et al*., 2011) de la cuticule. Désormais, la tomate émerge aussi en tant que modèle pour la génomique fonctionnelle de la cuticule, avec la multiplication des outils de génomiques (Tomato Genome Consortium, 2012) et notamment des collections de mutants EMS, comme celle de l'INRA de Bordeaux générée chez le cultivar de tomate Micro-Tom.

Dans notre étude, nous avons recherché des mutants présentant un caractère agronomique d'intérêt, la brillance du fruit, pour lesquels les effets phénotypiques de la mutation sur d'autres caractères du fruit ou de la plante étaient faibles. La caractérisation biochimique des plantes sélectionnées a montré que des variations importantes de charge et de composition de la cuticule étaient détectées chez ces mutants. Ces modifications concernent aussi bien la composition en cires avec des mutants riches en terpénoïdes, ou la cutine, avec de nombreux mutants aux profils variés. Les mutants de cuticule issus du criblage de la collection EMS constituent désormais des outils précieux dans divers projets de recherche en collaboration. Certains projets en cours, assez fondamentaux, visent à accroitre nos connaissances sur la structure des polymères constituant la cuticule,

l'architecture de cette dernière, ses propriétés mécaniques et la compréhension de son rôle dans la croissance du fruit, par une approche de modélisation. D'autres projets, plus appliqués, s'intéressent au rôle de la cuticule dans l'adaptation de la tomate à la limitation en eau et au maintien de son rendement en conditions défavorables.

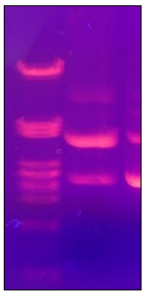
Le travail présenté dans ce manuscrit a également montré que la brillance du fruit était un caractère difficilement mesurable et quantifiable, composite, avec un déterminisme génétique complexe. Les limitations technologiques pour mesurer la brillance du fruit sont liées aux caractéristiques du fruit de Micro-Tom, qui a un faible diamètre et une surface courbe. Sauf évolutions technologiques et développement d'équipements adaptés à nos besoins, les difficultés de phénotypage des populations de mutant pour la brillance du fruit persisteront dans le futur. Le fait que la brillance soit un caractère composite explique que, même en croisant deux génotypes proches comme M82 et Micro-Tom, deux génotypes de tomate cultivée montrant de ce fait une faible variabilité génétique entre eux, plusieurs régions chromosomiques contrôlant le caractère de brillance ont été identifiées après analyse de leur descendance. Ceci suggère que les allèles aux différents locus détectés, apportés par l'un ou l'autre parent, interviennent également pour contrôler la brillance, indépendamment de la mutation. Ceci ne pose pas de problème dans le cas d'un effet fort de la mutation (cas de *gdsl2-b*) mais peut s'avérer critique lorsque l'effet de la mutation est plus faible.

Les développements technologiques et bioinformatiques récents de séquençage à très haut débit ouvrent la voie à de nouvelles approches de cartographie des mutations (NGS-mapping) permettant de dépasser ces limitations. Ces approches reposent sur l'utilisation du polymorphisme induit par la mutagénèse (mutation ponctuelle dans le cas d'une mutagénèse par l'EMS) pour identifier la région chromosomique portant la mutation causale (Schneeberger *et al* , 2009; Abe *et al.*, 2012) et non plus sur le polymorphisme apporté par le croisement avec un parent suffisamment distant du mutant. Ceci devra permettre la détection des mutations causales à partir de populations issues d'un croisement entre le mutant et le génotype d'origine non muté (Micro-Tom Wild Type), minimisant de ce fait les problèmes de variabilité génétique et donc de phénotypage rencontrés chez les populations issues du croisement de parents plus distants (M82 x Micro-Tom). L'application des technologies de séquençage à très haut débit à l'inventaire exhaustif des transcrits (RNAseq) d'un organe, d'un tissu ou d'un type cellulaire (cellules épidermiques par exemple pour la cuticule) permet de plus d'identifier l'ensemble des gènes dont l'expression est altérée chez le mutant et, éventuellement, ceux dont la région codante est porteuse de mutations. En combinant ces données avec celles issues de la littérature (Matas *et al*., 2012 ; Filipis *et al*., 2013) et avec les données concernant la cartographie de la mutation,

Figure 97 : Exemple de fruits de tomate affectés au niveau de leur aspect de surface identifiés dans la collection EMS Micro-Tom Bordeaux.

cette approche gène candidat devrait faciliter l'identification de la mutation affectant la cuticule et, de plus, préciser l'ensemble des voies affectées par cette mutation.

Enfin, l'étude initiée lors de cette thèse a porté sur la brillance, qui est un caractère agronomique fort mais ne représente pas une altération forte de la cuticule. La collection de mutants EMS de tomate Micro-Tom comprend un nombre élevé de mutants considérablement affectés au niveau de la surface des fruits, et probablement de la cuticule. Parmi ceux-ci se trouvent des mutants au « cracking » très prononcé ou présentant des rugosités de surface, des flétrissements ou des décolorations (figure 97). L'étude de ces mutants forts, dont le phénotypage devrait se montrer plus facile à mettre en œuvre que pour la brillance, se révèlera très probablement déterminante pour la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la formation de la cuticule du fruit et pour l'étude de ses propriétés.



Matériel & méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Les mutants de brillance ont été isolés d'une collection de mutant EMS (éthyl méthanesulfonate) de tomate (*Solanum lycopersicum*) générée dans le cutivar miniature Micro-Tom à l'INRA de Bordeaux comme décrit précédemment (Rothan et Causse, 2007 ; Just *et al*., 2013). Les plantes ont été cultivées à une densité de 200 plantes par mètre carré en serre, avec les conditions suivantes : 14h de lumière / 10h d'obscurité ; température entre 18°C et 28°C et hygrométrie comprise entre 60 et 80% d'humidité relative. Les plantes sont arrosées 2 fois par semaine avec la solution 1 [pH 5,8 ; oligoéléments plus 3,5 mM KNO_3, 1 mM K_2SO_4, 2 mM KH_2PO_4, 6 mM $Ca(NO_3)_2$, 2 mM $MgSO_4$] jusqu'à la première mise à fruit sur le premier bouquet, puis avec une solution 2 [pH 5,8 ; oligoéléments plus 4 mM KNO_3, 1,5 mM K_2SO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, 4 mM $Ca(NO_3)_2$, 1,5 mM $MgSO_4$] jusqu'à ce que les fruits soient murs. Les fleurs sont régulièrement vibrées pour assurer une auto-pollinisation optimale et ainsi un développement du fruit correct. Les graines sont traitées 15 min à l'hypochlorite de calcium 4%, rincées à l'eau 30 min et séchées sous air pulsé à température ambiante pendant 2 jours, puis conservées à 4°C avec du déshydratant Silicagel® jusqu'à utilisation.

2. Cartographie

Une population F_2 de cartographie de 110 plantes a été crée par croisement d'un mutant de brillance Micro-Tom avec un mutant nain provenant d'une population EMS créée chez le cultivar M82 (Menda *et al*., 2004). Les plantes de la population de cartographie ont été cultivées en serre dans les conditions indiquées ci-dessus, excepté pour la densité des plantes fixée à 21 plantes par mètre carré et pour l'arrosage, réalisé 3 fois par semaine. Les caractères associés à la cuticule ont été mesurés à 2 stades de développement du fruit, Mature Green (brillance et perméabilité) et Red Ripe, correspondant au stade breaker plus 7 jours (brillance, résistance à la dessiccation et largeur des cadres de cutine entourant les cellules épidermiques). L'ADN génomique a été extrait de 100 mg de feuilles jeunes sur chaque plante individuelle par la méthode Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB). Cinq cent µL de tampon d'extraction CTAB [145 mM Sorbitol, 850 mM NaCl, 125 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 0,8% (p/v) Sarcosyl (n-lauroyl-sarcosine), 0,8% (p/v) CTAB] a été ajouté à 2,2 mg de sodium bisulfite pour chaque échantillon et 120 µg de RNAse A (Macherey-Nagel), puis mélangés par inversion et centrifugé 10 min à 4500 g. Par la suite, le surnageant est traité avec 500 µL d'isopropanol froid. L'ADN extrait est séché 15 min à 45°C

Locus	Sequence	MicroTom_MM	M82	Chromosome
2758_112	TTCATTTCATTTTCTCTCTAAAAAAAATTCTTATTAAGTTTTTAAGTTAC[T/C]ATGAACCCCTCAGCTCAACCAGCTTACGGTGAAAAACCTATGACTGGTGT	T	C	1
9322_2031	AAGGGAAAAAACTAAAATACACCCCATATAAGGAAGTATAAGATCATTGT[A/C]TATGCTAGATTTTTGAAGGAAAACAGGCCCAAAGGCCTAAAAATTTACA	C	A	1
273_877	AGTCTTTGTGATGAAAAAGATGTTGAACTCCAAAAGTCGGATTTTTCAAG[G/A]ATTACATCGAGACAAAGAATGTCCATGAAAAGATTTAGGGCGAAATATA	A	G	1
8284_11	TAGGCATTTGCTTCTCTCTTTCTTTTTTTTGCTTTGAAACTAAAAAAAAA[C/A]AAACAGAAGAAGAAAAAATGGTGGATCTTCAGAAGGTATGTTCCATGTGC	A	C	1
10443_5	CCTCCTATAACAAGCAAAACTCAGCCCAAAACCAAATCGGATCCCCCAGT[G/A]AACAATTTGGAGAGGAGTGCCGAGCTCAAACGACTTTCTGATGAACAGT	A	G	1
19992_331	GCGAGTGTAGAGGGGCTCGGTTATTTGGGTGAAAAGTGTGAAACTTTGCA[A/G]GAGTTGGAATTGCATTTCTCTGATGACTTTGCATTGAAGGGATTATTTGG	A	G	1
14688_794	TCCAGCACATCCCTGCTGACACTACTAGATACTCCTAACCATCTCAATCT[A/C]GGGAAATAAGGTTTCTTTAACCATTGGAATGAAAGCTGAGTTATACCTCC	C	A	1
7326_651	ACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCT[T/C]TATGAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGAT	T	C	1
5978_473	CGTCGTTTGTCATTGATTAATCTGTTTCATTGACAAAAAAAAAAACAGTTG[A/G]ATTATTCTAGATCCGCGAGATTTTTCAGTCAGAACAAGTGCGGTTTCGTT	G	A	2
12959_651	CTTACTTCTTGTTGCTCTTATTCAGCAAAGCCTTGTTGAAGTTGGGATTT[T/G]TTGCTTCTCTTTCAGTGTATACGAAATCAGAATGACCTCATTAAGCACTG	G	T	2
16242_6	WGAGTCATGYTCTCTTGTTCAAGTAACATACCTAGAGGAAAATAATGCT[T/C]GCAGGGCTCAAAAATTGACTCGTAGAAATTCATCATCAAAGGGATTGTG	C	T	2
10297_224	AGATCTCTATTGTGGAACAAATTCAAGTACTACATTTCGTACGGAGCATT[A/G]TCAGCTAACAGAATCCCCTGCCCACCACGGTCTGGCAGATCGTATTACAC	G	A	2
3351_2089	ATTAGTCATATTGAATATGATTTCCTTCACTTGGGGAGTTATTGGAAAAG[T/G]GATTCTAGAAGGGAGATTGAGTGATTTGTTTGGTCAAGTGTTC	G	T	3
9661_103	TCAGTTCTCCCGCCGGCGATATCTAATTCCCGTGAGGAAGGTTGGGTGAA[A/T]CCTCGTCATTTGCATAGAAAGAAAATGGTAACGACTTCAGTTGTCAACAC	A	T	3
13946_3	GCAACAGCTGAATTAGCCAACATCGATTGGGACAACATTGGCTTTGCGGT[T/A]ATGCCTACTGATTATATGTATAGCATGAAATGTTCTCAAGATGGAAACT	A	T	3
16176_2	TAATTTCAACTCACTCATTATTTTATTCTGTTATCTTTCAGCAAATATGA[A/T]GTTCTTTATCGGTTTCTTCCTCCTCTTNCTCGATCATTTTCCATTTTNT	T	A	3
17307_1	GGTTTATACATTGGGAAAATTTTGTATGTTGTAATAATACGTTTGTGTTG[A/G]ATTGAATTGAAGTATGGGAAGGAAGAATAGAGGAACAACGAACGGGAGG	G	A	3
4304_29	TGAATTCCTCGGTGGCACCTGAAGCTAAAAATGACTCAGCGTCAAAGATT[T/A]CCTCTCAGAGTCCCTCTACTTCAAGCAAAAATGTCCACRTTGACTATTC	A	T	3
5323_32	ACATATCTCTTCCGATTTCAATTCCAGTTTGCCGTTGCCAGATCCCTACT[C/G]GAATTCAACTTTCCTTTTTCCTTCTGCTCCTGTTTTTGACGGAACATTT	G	C	3
2609_172	CAATTCAACTCTGTATCAAATGCTACAATAATGGAGAACGGAAAACTACA[C/G]AACGGAGGAGTTTCTTCATCGGAAACTTTCAACGGCGGTGAAGATGTATA	G	C	3
14562_3	GAACTGTATGGAGAGGGGGGCTCTAGAAGGAAGAAGTCCTTGAGTTATTT[T/C]ATGTAAAAGTTGTTCATATTGTACATTGATGTCTTAAGGAAGGTTCTTA	C	T	3
2592_58	AACTTGGAGCAAAAGGCATTGGAATTGCCAGACTCGTTAATCCAATTGGA[A/G]CATGAAGATGGACAAATACGACTACAAACAATAAAAATTTATCAATGAA	A	G	3
7882_460	CAAAAGTGGGAGCTTGATGAATGGTTCTGTAATGAACACTTCTTGGCATA[A/G]TTGTTTTGGTTTTGAGCCCTGTGAGGAGTATTATAAATCAGACGGATTCT	G	A	3
7466_129	TCACCGGAAGTGAAGAAACTCAAGGAGAATCTGTTGTACGATCTCACCGA[T/C]GACGATGATAGCTCCGAGTTTTGCACCACGAGTCATGATTTCGATTCGTT	T	C	4
6388_14	CAAATTCCAAAAATTTTCCGATCGGAGATTTTTTTTTCCCGATCAGAAAC[A/G]GAAAATAAAAATGGCAGTGAATCCTCAATTATTTCCTAATGGAATGCCA	G	A	4
6807_11	TCTTGAAGGATTCGATTCACTCAATGATCAATGTTTTGCTGAAGTTACTA[C/T]TGCGAGTGTTGCTGTGTTGCTTAGTTTTGGTGATGCCATTGCAAAGAGC	T	C	4
2325_361	CAGACCTGCAGCAAGTTGAAGAATGTTTGTCAAGTTTGTCTTTTGGATCT[T/C]GAGTATGGTTTGCCAGTTCAGGTCCGAGACACTGCTCTCAGTATCAATTC	C	T	4
7318_1627	TCCTTGAACAAAGGGCGGAATGACAAGGGCAAGGAGGTTTTGGATGGATTC[C/G]GAGGAGTAAGCGGATTTTGGCCACAGAACCAGTGGGTTGCTTTCCCTGAA	C	G	4
5264_772	TGAAGATCTTAACCAAACMACWTATGGCAAGTCTCCAGAGTGGAAGGGTGC[A/G]CAAGAGATGGTTGGGGCAAGCGATGACCTTAACAGACAGTTATCTGTGGC	A	G	4
7273_256	GACCGCCGGAGTTTCGTCGGAATCCGGCGAATCTCAGCCGGAGTTAGGATA[T/C]CTTCTAGAAGCTTCTGATGATGAACTCGGACTACCTCCGCCTATCGAGGC	T	C	5
6740_28	AATGCAAAGGACCCAGTTTTCTCTTCAGAAGTCCCTTGATTTCTTTTTCC[T/G]GTTGACATCCAAATTTCCGTTGGTTGTTGCACTTCTTCTGGTTGTTATA	G	T	5
5578_297	AGAAATCTGAGGGTTTCGTAAAAACTTGGCTTCTTCTCAAACCCCAACAG[T/C]ACAGAACTGTTTCTGATCTTTCTTCATATCTTCTCCACACTTTTCAGCTC	T	C	5
16209_397	CTCTTCTTCCCTCGTGATCTTAATGTTTTCTATACTCGTTTTTCGAATAC[T/C]ATGTCGCAGCCTTATACGAAATCTCAGCTTTCAGAGAAGCTTCGTAGGCT	C	T	5
14173_3113	CAAGTCCGTTTCAGAGAACAAATACCAGAGAATATATGTTTCCTTCAAGATT[T/C]GATTTCCTTAATAAACTTGAACAACTCCATTTATTTGTTTTTCCTCAGAA	C	T	5
17859_360	CCCAGAAAAACCTCAAAACCAACTGTTGCCGAATTGAAGATAAGATATTG[A/G]ACTCTCTTGCTTTATTCAAACTAAAATCATGGATTATGTTGAATTCAAAA	G	A	6
5266_1670	TCGGTTTCTACTGTGACATGACTCTCTTTTGGTAACAAGAAGTATGAGAC[A/T]AGGGGTCTAGACATGTAGTTTTGTGCAGTACAGGTAATTAAGATGGAGAA	A	T	6
18313_303	GAAAAGATGCAGCAGGCTGCACTTCTGGCATTCATTGAGATGATGTTTCT[T/G]GACTACTCGTTAACATTTTGATCATCCTGTATGGAATCTGTTGCTCTGGA	G	T	6
6651_568	TGTATTAATGTTTCAAAAGAATGATGGAGAATATTTGCATACCAGTTTGG[A/G]GATATATTTGTGCTTTTTTCCTAAAATAAAAGAACTTTTTGCTCCTGTTGG	A	G	6
18611_177	GCAGATGATGAAGTTGCTCGATTGCGTGAAAAGGACCTGAAAAATTTACT[A/G]CGGCACAGAAAGCTGATCTTGGTTCTAGATTTAGACCACACACTTCTGAA	A	G	7S
3725_703	GGAATGGACTTGTCAAAGTTGGTGGTTTTCGTCGGAGAAAGTGGTGATAC[T/C]GATTATGAAGGGTTGATCGGTGGTCTACGCAAGGCTGTCATAATGAAAGG	C	T	7S
A_C4803	TTTGTTGTAGGCATTATTATAGATATCAGTCTAATCCTGGATGAGAACAC[A/C]GGATTGTGGTGAATCATATAATCAAGTACATGAAAAGGACTAGGTATTAC	C	A	7
T_C1883	TTCTTTGTTTCATTGTATACATCTATCTCTATAAGGGAATGAGGAACGAA[T/C]CATTGTATTTCTAAAATCAAGTCTTTTGTTTCAATGTATCGTTTATAAGT	C	T	7
T_C3248	TTCGGCTGACTACTTAGTGGAAGACTTACTCAAGCTTTATTAGTCTTTAA[T/C]ATTTGAACTGACAGTGAATATTAAACATAAACATTAATAGTTTAACAAAA	C	T	7
14344_1219	GAGAACAAAGGGATAAACGAATCAACGCGTGATATTAGATTAGGGGATAG[T/C]CATAGATATTGGTGGAATCGCGGAGTTAATTTAGAAAATCTTGCTGAAAG	T	C	7L
7424_133	CCATTATCTGACGaatcaaactaacaaacGCGGCATTTACATCAGCATTC[T/G]ATTTTTTTTCAATCCATTATATGAACAGTTTGTTTAATTGCTCTAGGATC	G	T	7L
18065_277	ATGGTTCTTCAATCTAAAGGAAAAGGAAGCAAAGTACCACAAGCATTGAA[A/G]GATTTATTTTGGAGGACAACCAAAGCGGTTTATTTCTTTTATTCAGATC	G	A	8
5986_549	GGCAATGGGATACATAAAATTCCTCCATGAACAAGTGAAGGTGTGCCTTT[A/T]TCTTTTTCTTCATCTATAGGAACTATAATCCCGCACGACTGATTAAAGAT	T	A	8
14868_4	GATGCACAGTTTGCTTGGTTATGTGTCAAGCATGTCAAGAGCAATGCCAT[T/A]GTAATTGCAAAGAACAATTGTATGTTAGGAATGGGGAGTGGACAACCAA	A	T	8
3207_461	AACCTCACTCACTCTTTGAAAAAAAGCTTCTTTCTTTACCTTGTCCTCATT[T/C]CTTTACATTTCTTTGGTATTTTCTTGAAGGGTGTAACTGAAGAGTCTGCC	T	C	8
1232_559	GTTGGATGGTCATGGAAGCCCAATTGGGCCAATCTTGCCATTGATTCTGT[A/T]CCTACAACACATGTTCCTTCTCTCCAAAACTTGTCTTCTGGCTTTTCAAC	A	T	8
13624_1696	AACCGGATCAAACACGAAGAAACCCTAGACGAGACAAAGGCAAGATGCAA[T/C]TGACAAAAGACGATATTGAGAATGTTAACGGTGCAGTNTAGTGCCGAAAC	T	C	9
14109_1	ATCTTATTTATAAAGTTAGTGGAAGCCATCCTAGAAAGTCTTGGAATTAA[C/T]GTTGCAACAAAAAACAAGACACAACAAAATGATGAAGAAATAATGTTAA	T	C	9
14488_107	CTGTAATTGGACCAGTTTTTTATGACCCCTTAGCACATTTTGTCACATAT[T/G]TAACACAAAAACATGTTGCTTAATTCCTATTATTCAACTTAAGTTAGCAA	G	T	9
6358_371	GTTGAAGAAGGTTCAAAATTGGATGGGGTAGGTACTGTTAGTAATAACAA[T/C]ATGGAATCGAAGAGTCTTCGAAGCATTAGTNGCAAAGATATGATATTCAG	T	C	9
4845_62	CTTGAAAAAGATTCTCCAACCACATTCGAGATTTGGGGTCCATCTCGAGT[T/C]GAAAAGGAGTTCCATGTCTCGTCCTCTGTCCATGGCTCTGTATATTCAG	C	T	9
4027_959	ATGAACGAGTTGGTTGACAAATTCAATACTGCATATGAACGGCATAGTAG[T/G]AGGGGCGGGAGAACTTCTTTCATCTGAAAGTTGATTATATCTCCAGTATT	T	G	10
10783_539	AATTGAAGAAGAAATGAAGCACGTACACAGCTCTCCTTGTTCAACAACCC[T/C]GCAGACAATGGACGCCATGTCATTTGGTAATGAACATCATGAACTGACTG	C	T	10
9881_1420	GCCCCCTGTGGTTTTGAAACATGCATCACCATCCCCTAGAACATCGTCCG[T/C]GACAACCTTGTCCTCCGATTCATCGTGTTAAATCCTAAAGTATTTGATGA	C	T	10
6115_450	GCTGAGGTGCAGGCCAAGTCACAAAAAGCTGGAGGTAAGGGTAATGTATC[T/C]AAGGGTGGATCGAAAGGACCTAAGCTTGGTGGTGGCNGTGGAAAACGTTA	T	C	10
11289_715	GCGTATGATATGAGGAAAATGCTTGACCCACTCTTTGTCCTGGATGGACA[T/C]GAGAAAGCAGTTACTTACATTAGATTTNTTGATGAACGTACTATTATTTC	C	T	11
10722_814	AAGAACGNAGAAACAAAAACGGGTCATCTTTGAAGCAAAACGGGTCGTCT[T/C]TGAAACAAAACGGGTCATCTAATGGTGATGTTGGGTCTTCTACTGAGCTG	C	T	11
13832_7	GAAGCAGCAGAAGCTGGAAATATTGCATTTGGTAAGACAGAGGAGAAATC[G/T]ATTGATAGACTAATTGATGCTGAGCTTGCTGAGTTGGGAGACAAAAGCA	T	G	11
12001_696	ATACAATACCTAACTCCAGTTCGAACCCCTTTAATGGGTTCAGCATAGCC[A/C]ATTCTGGTAATGATGGGGACTTTAATCAACAGAATGAAAAAGCAGGCTCC	A	C	11
2483_250	GCTTCCACGGCCATATGTTCAAGTATGGATCAATATACTATGGTTCGTCG[T/C]GGCATTAGGCATCAAATTGATCGTAAAATCGATCGATTAGGCGATCCTCG	C	T	11
8996_301	AACATTtgtagtagtcgtagtCGAGGAGGAGGATTGACAGACTTCTTTTC[T/G]TGGAAAGTCATAGACCCTAGAGCGCCTTGGGTTCAAGAATGGAATCGAGT	T	G	12
9578_326	GGATCAATTCGGGATCCAATGTCCGAATCAGACGTTAAATCTCGGGTTCA[A/G]GCAGTAGAGGATACTGGAAAGTAAGAAAAGTTGTAGCTCGAAATCTGAAT	G	A	12
6781_283	AAGCTGTGCCTGCCACATCTGAAGAAAGCAGTGGAGCCTCTGACTCAACG[A/T]CACCGGAAATTAATGAAGCTTCTCCTCCTGTAGAGGCTGAGAGTGAAAAT	T	A	12
4766_32	GGAGACGAGAGCTCAAAGAAAGTGCTATTGGAATCAATCATCATCCCCAC[C/A]GGCTACAACTGATGTCAAGTTCAATCACTTGGCCCGACGTCTCATCGCA	A	C	12

Table 14 : Liste des marqueurs de type SNP entre M82 et Micro-Tom (Shirasawa *et al*, 2010) sélectionnés pour les études de cartographie.

sous vide, resuspendu dans 50 µL d'eau distillée. Un ensemble de 49 à 68 marqueurs Single Nucleotide Polymorphism (SNP) répartis de façon régulière sur le génome et présentant un polymorphisme entre Micro-Tom et le cultivar M82 (Shirasawa *et al.*, 2010) ont été sélectionnés pour génotyper chaque plante (table 14). Les données de génotypage et de phénotypage ont été analysées en utilisant MapMaker /Exp v3.0 (Lander *et al*., 1987) ou QTL Cartographer (Zeng *et al*., 1999).

3. Caractérisation de la brillance

La brillance des fruits des lignées de mutants a été estimée visuellement aux stades Mature Green et Red Ripe par comparaison avec un ensemble de fruits homogènes provenant de plantes Micro-Tom de type sauvage, cultivées parmi les lignées mutantes à des positions aléatoires. Les mutants différents du Micro-Tom WT ont été classés en tant que mutants brillants, c'est-à-dire portant des fruits à l'aspect de brillance homogène, ou mutants mats, si leur fruit ne présentaient pas de reflet à la surface. Un critère important de classement des mutants en tant que mutants de brillance était l'uniformité du phénotype sur l'ensemble des fruits portés par la plante. Toutefois, plusieurs lignées de mutants sélectionnées portaient des fruits brillants et mats, clairement distincts du WT. Les analyses de la brillance dans les populations en ségrégation pour la cartographie ont été réalisées de la même manière excepté la comparaison de la brillance, effectuée sur l'ensemble des génotypes, conduisant à une classification des génotypes en 3 groupes de brillance.

4. Mesures de la résistance à la dessiccation

Pour les mesures de dessiccation sur les mutants de brillance étudiés, un fruit RR représentatif a été prélevé sur le mutant et sur le WT. Pour les mutants P17F12, P30B6 et P23F12, le pédicelle des fruits a été bouché avec de la Patafix (Uhu) afin de limiter l'évaporation non cuticulaire puis une mesure du poids frais a été effectuée. Le test sur P17F12 s'est déroulé sur 53 jours, à température ambiante dans une enceinte close et les mesures de masse ont été effectuées 2 fois par semaine, soit environ 16 prises de mesures. Pour P30B6 et P23F12, les tests se sont effectués sur 14 jours, dans une étuve close, sous air pulsé à 28°C et 8 prises de mesures ont été effectuées. La perte en eau a été calculée en tant que pourcentage de perte de masse par rapport à l'origine, et comparée à la valeur du type sauvage. Pour le phénotypage de la perte en eau des populations de cartographie F_2, les pédicelles ont été protégés avec de la cire de protection et les fruits ont été conservés à température ambiante pendant 6 semaines. Chaque plante a été testée, ainsi que les parents M82 dwarf et le mutant Micro-Tom utilisé pour le croisement.

5. Mesures de la perméabilité cuticulaire

Pour les mesures de perméabilité, un fruit MG a été prélevé sur les mutants de brillance et sur un Micro-Tom WT, puis plongé dans une solution de bleu de Toluidine 1% pendant 6h comme décrit dans Tanaka *et al.*, 2004. L'intensité de coloration a été estimée visuellement puis comparée au WT. Pour le phénotypage des populations de cartographie, un fruit MG a été prélevé sur chaque plante ainsi que sur les parents, et plongé dans une solution de bleu de Toluidine à 0,1% pendant 16h. L'estimation visuelle de la coloration a été effectuée en comparant l'ensemble des fruits entre eux, et des classes de coloration ont été définies en regroupant les fruits les plus proches.

6. Analyses des cires cuticulaires

Les cires cuticulaires sont extraites par immersion du fruit pendant 30 s dans 6 mL de chloroforme contenant 6 µg de docosane, le standard interne. Les extraits sont ensuite séché sous un flux modéré d'azote et les lipides sont dérivés 15 min à 110°C dans 100 µL de [N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide) : trimethylchlorosilane (99 :1)] (BSTFA-TMCS). Le BSTFA-TMCS est ensuite évaporé sous azote et les échantillons sont resuspendus dans 500 µL d'hexane. Ils sont ensuite injectés dans un chromatographe à phase gazeuse Agilent 6850 avec de l'hélium comme gaz vecteur à un débit de 1,5 mL/min. Le programme du chromatographe est le suivant : température initiale de 80°C pendant 1 min puis rampe de 15°C/min jusqu'à 260°C. Une incubation de 10 min à 200°C précède une nouvelle rampe de 5°C/min jusqu'à 320°C. Le programme se termine par une incubation de 15 min à 320°C. Les analyses qualitatives sont réalisées en utilisant une colonne HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) et un détecteur spectrophotométrique de masse Agilent 5975 (70 eV, ratio de masse pour charge de 50 à 750). Les analyses quantitatives sont réalisées en utilisant une colonne HP-1 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) et un détecteur à ionisation de flamme. La quantification s'effectue par rapport à l'aire du pic correspondant au standard interne de docosane.

7. Analyses des monomères de cutine

Pour l'analyse des monomères de cutine, un disque d'épiderme d'un diamètre de 1cm est prélevée à l'emporte pièce sur chaque fruit utilisé pour l'analyse des cires. L'épiderme est ensuite soigneusement gratté avec une lame de scalpel afin d'éliminer au maximum les cellules de l'exocarpe, et est incubé 30 min dans de l'isopropanol à 85°C. Le disque va ensuite subir une délipidation par des bains successifs de chloroforme/méthanol (C/M), aux ratios suivants : C/M (2 :1) pendant 24 h, C/M (1 :1) pendant 24 h, C/M (1 :2) pendant 24 h et méthanol 100% pendant 24 h. Le disque d'épiderme délipidé est séché

pendant 48 h sous air pulsé à température ambiante puis 48h dans un dessiccateur. Le réseau de cutine est ensuite dépolymérisé par incubation à 85°C pendant 3h, dans du méthanol / H_2SO_4 5% (contenant les standards internes suivants : Omega Penta Lactone (OPL) 5 µg/mL, C_{17} 5 µg/mL, 15OH 5 µg/mL, $2OHC_{14}$ 5 µg/mL). Une séparation des composés organiques est réalisée par ajout de 2 mL de NaCl 2,5% et de 2,5 mL de dichlorométhane. Après agitation manuelle 30 s, les tubes sont centrifugés à 1500 g pendant 5 min et la phase inférieure est transférée dans un nouveau tube. L'opération est réalisée une deuxième fois puis la phase inférieure est lavée par ajout de 2 mL de Tris NaCl, agitée pendant 30 s puis centrifugée à 1500 g pendant 5 min. Le lavage est réalisé une deuxième fois et la phase inférieure est conservée. La solution de monomères de cutine est séchée sous un flux modéré d'azote puis repris dans 150 µL de BSTFA-TMCS. Une dérivation est effectuée à 110°C pendant 15 min puis l'extrait est séché sous un flux modéré d'azote. L'échantillon est repris dans 350 µL d'hexane puis injecté dans un chromatographe à phase gazeuse Agilent 6850, avec une colonne HP-5MS et un détecteur spectrophotométrique de masse Agilent, dans les conditions et avec le programme décrit dans le paragraphe 6. Les quantifications des composés sont effectuées par comparaison avec l'aire du pic du standard interne ayant des propriétés de désintégration chimique proche.

8. Microscopie optique

Des cubes de péricarpe externe de 5 mm x 5 mm sont découpés de fruits au stade RR puis sont placés en immersion dans une solution de fixateur FAA (NaCl 0,9% (p/v), formaldéhyde 4% (p/v), éthanol 50% (v/v), acide acétique 5% (v/v)) préparée extemporanément. La fixation s'effectue pendant 4 h, sous vide (-0,9 bar) à température ambiante. La solution est renouvelée toutes les heures et les échantillons sont soumis à un vide partiel de 15 min. Les étapes qui suivent jusqu'à l'inclusion sont réalisées à l'aide de l'automate Citadel 1000 (Shandon) : déshydratation, imprégnation par un solvant de la paraffine (Histosol Plus, CML) puis par la paraffine (ParaplastPlus, Sigma-Aldrich) à 65°C, selon le protocole décrit par Gabe (1968). Les blocs de paraffine sont réalisés à l'aide d'un appareil à inclusion WD4 (Shandon), débités en rubans de 8 µm à l'aide d'un microtome AS 325 (Shandon) et déposés sur des lames de verre préalablement traitées. Les préparations sont ensuite séchées dans une étuve à 45°C. Les coupes sont ensuite déparaffinées par un bain d'Histosol Plus pendant 20 min et 2 bains successifs de 5 min, puis rincées dans 3 bains d'alcools 100% pendant 3 min chacun. Les opérations de réhydratation sont réalisées dans des bains d'alcools à 95%, 70%, 50%, 30% et finalement dans de l'eau pendant 3 min chacun. Deux types de coloration ont été réalisés. Afin de dénombrer les cellules et estimer leur taille, une coloration au bleu de toluidine 0,1% (p/v) est effectuée selon le protocole décrit par Gabe (1968). Pour l'estimation de l'épaisseur de la cutine, une coloration au

Rouge Soudan IV est réalisée, comme décrit par Buda *et al.*, 2009. Après déparaffinage, hydratation et coloration, les lames sont séchées et recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'Entellan (Merck). Les échantillons sont observés avec un microscope Zeiss Axioplan et l'acquisition des images s'effectue à l'aide d'une caméra numérique (Moticam 2300 3.0 M pixel, Motic). Les mesures d'épaisseur sont réalisées sur 15 coupes différentes, avec prises de 20 points de mesure par coupe, après calibration de l'objectif *via* une lame étalon graduée et le logiciel Motic Images Plus, version 2.0.

Pour les analyses de l'épaisseur de la couche de cutine située entre 2 cellules épidermiques adjacentes, appelé dans ce travail largeur de cadre de cutine, un carré d'épiderme de 10 mm² est découpé puis pelé de la surface des fruits au stade RR, pour les mutants de brillance mais aussi chaque plante des populations de cartographie ainsi que les parents utilisés pour effectuer les croisements. Le maximum de cellules de l'exocarpe est éliminé des coupes en grattant la surface interne avec une lame de scalpel. Le fragment d'épiderme recouvert de cuticule est immergé dans l'eau distillé et placé entre lame et lamelle et observé sous microscope au grossissement x20. La largeur des cadres de cutine est déterminée en mesurant l'épaisseur de la paroi cellulaire cutinisée entre 2 cellules épidermiques adjacentes (Cf. Chapitre 2 partie I, Supplemental Figure 6). Les mesures de largeur sont réalisées avec des unités arbitraires, et 12 ou 20 mesures sont réalisées pour chaque échantillon.

9. Observation de la surface de l'épiderme par microscopie électronique à balayage de type environnemental (ESEM)

Des cubes de 5 mm de côtés de péricarpe externe avec épiderme sont excisés au niveau de la partie équatoriale de fruits de tomate au stade Red Ripe et sont observés avec un microscope électronique à balayage FEI Quanta 200, en mode environnemental. Pour l'observation de la surface des cires, les cubes sont déposés directement sur la platine et pour l'observation de la cutine, les cubes sont préalablement trempés 30 s dans du chloroforme, sous agitation lente. Les observations sont réalisées avec une température de platine de 4°C, une pression dans la chambre de 6 Torr et une tension appliquée au filament de 4,7 V. Les images sont capturées au grossissement x600 et x3000.

10. Recherche de mutants Micro-Tom par Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING)

La recherche par génétique inverse de mutants dans la collection EMS commence par la détermination sur le gène d'intérêt d'une région potentiellement susceptible aux mutations EMS en utilisant le programme CODDLE (Till *et al*., 2003). Les amorces seront

amorces Tilling	amorce 5'	amorce 3'	taille de l'amplifiat (pb)
nsLTP2			
nested oligo nsLTP2	CATGAGTAGAGCCATCGAACACACATT	CATCTCCACAAGCCAGATTTAGCTTTC	876
IR dye oligo nsLTP2	GTAGTATTGGGACAATTTGTGGATTGG	CAACCTTACTGGACCCTGCAATGCAATA	759
GDSL2			
nested oligo GDSL2	GAGTAAGTGGCCTTATTGGTGAAGCAA	CAACATGCTACCTTTGATGTTATAAAT	1200
IR dye oligo GDSL2	TTTGCCAAAATGGCCACACCTAC	TCACCAATAAGGCCACTTACTCTACTTTG	900

Table 15: Séquences des amorces utilisées pour le crible de la collection Micro-Tom EMS, pour les gènes *SlnsLTP2* et *SlGDSL2*.

Nom du gène	Numéro Accession SGN	Blast P TAIR *Arabidopsis*			amorce 5'	amorce 3'	taille de l'amplifiat (pb)	Moyenne des CT (WT)
		Numéro accession gène	identification	E-Value				
Synthèse des monomères de cutine								
SlLACS1	SGN-U573278	AT2G47240	LACS1	0	CAATCCACTGCATGATCGTC	CGCTAGAAGGGTGCTTAAATTAGA	141	24,55
SlLACS4	SGN-U575624	AT4G23850	LACS4	e-171	CCCAGATGCTCAAATTTTACAAG	CACTTGTACTACAGTCAAACCCAGTT	218	28,57
SlGPAT4	SGN-U578399	AT1G01610	GPAT4	0	GGTGGAAATGATGGCAAAGT	CAGAATCCCCCTCTCAAAGCA	101	19,56
SlGPAT6	SGN-U573482	AT2G38110	GPAT6	0	GTCGCGTTGCAATAAAGGAC	TGTTTTCCTTTTCAATTCTCTTGA	142	22,6
SlGPAT9	SGN-U577121	AT5G60620	GPAT9	0	TCTCCATGTTCCACTCTTGC	GGCTTCACAGACATTGTTGC	135	25,22
SlCYP86A7	SGN-U563152	AT1G72970	CYP86A7	e-161	TGCAGTAAATGGAATTGCAGCT	CATTATTTGTCTTATAGCCACATTTCA	146	22,82
SlHTH	SGN-U575460	AT1G72970	Hothead, HTH	0	AGCAAGCAAGTGTGTGTAGTCTG	GCACAAAAAGTTCCAATTCCA	96	20,67
SlHTH like1	SGN-U570812	AT1G12570	HTH-like1	0	AGCCACTGTCATGATGCTTG	TCCACTCTCATTCATAAACAAAAGA	137	21,62
SlHTH like2	SGN-U570813	AT5G51950	HTH-like2	e-174	TCGCATTTAATTTGGGGAAT	AACAATAATGACCCTTCCGTTTT	117	19,43
Transport des cires et des monomères								
SlABCG11	SGN-U572046	AT1G17840	ABCG11	e-151	CTCAGGGCCTATGTTGGAAA	GCCTCCATGCATATTTCTTCTT	113	25,12
SlABCG12	SGN-U586294	AT1G51500	ABCG12	e-65	TGCATGGAGGCTTAATTTATTTG	GAATGGTTAAATGTGGCAAAAAG	102	21,36
SlnsLTP1	SGN-U581465	AT2G38540	nsLTP1	1,00E-20	CAGCCCCTCTACTGACTGCT	TCAAATTTCGAAACAAGACTCG	199	19,44
SlnsLTP2	SGN-U579033	AT2G38540	nsLTP2	4,00E-11	TGGCTTGTGGAGATGAAGAA	CCAATGTTCATTACAAGACTCGAC	148	18,54
Polymérisation								
SlBdg-like	SGN-U570965	AT1G64670	Bodyguard, BDG	3,00E-68	AGAGAAGCTATGGGGATCAATATGT	GCTTTCACCAATGTCATTACAAAA	105	31,35
SlGDSL2	SGN-U585129	AT5G33370	GDSL2	e-153	CAATATCACACTCCACCCTACAAA	GCAACACTTCATGTTGTGCTACTT	110	18,15
Solyc12g017460	SGN-U566206	AT1G28590	GDSL like	3,00E-78	GCCAAATTCAACTGCGTCGTTT	TCTCCTTCGCTACAACGTGGAA	125	19,95
Régulation								
SlSHN1	SGN-U584114	AT1G15360	WIN1/SHN1	9,00E-45	CCAAAACAAATTTCGCAGTG	TGGCGATTTACAGCTCTTCC	141	22,04
SlSHN2	SGN-U565667	AT5G25390	SHN2	3,00E-47	GCTGAGGAAATGTTGCAAGG	TGCCACACTCCAATATGACAG	119	19,58
Gènes de références								
EiF-4α	SGN-U578071				AGTGGACGATTTGGAAGGAAG	GCTCCTCGATTACGACGTTG	106	19,73
β-Tubuline	SGN-U564000				AACCTCTCGTGGATCACAGC	GGCAGAAGCTGTCAGGTAACG	127	20,09
Actine	SGN-U579547				GGACTCTGGTGATGGTGTTAG	CCGTTCAGCAGTAGTGGTG	160	19,12

Table 16: Numéros d'accessions et informations sur les séquences des amorces utilisées en RTPCR Quantitative. Les numéros d'accessions sont indexées dans les bases de données du SOL Genomics Network (http://www.sgn.cornell.edu) et du TAIR Arabidospsis Information Resource (http://www.arabidpsis.org).

ensuite déterminées en utilisant le programme PRIMER3 (Rozen *et al*., 2000). Une amplification PCR nichée (Nested PCR) est ensuite réalisée sur les ADN extraits des familles M2 de la collection, puis poolés par 4 comme décrit précédemment (Okabe *et al.*, 2011). Les amorces utilisées pour cribler la collection EMS sont indiquées en table 15. Les produits PCR sont ensuite soumis à une digestion par l'enzyme ENDOI, comme décrit dans Triques *et al*., 2007. Le criblage de la collection s'effectue en faisant migrer les produits de digestion sur un Li-COR DNA Analyzer comme décrit dans Till *et al*., 2006. L'ensemble de ces opérations est réalisé par la plate-forme Génome-Transcriptome du Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux.

11. Analyses en Reverse Transcription PCR Quantitative

Les gènes sélectionnés pour l'analyse en PCR Quantitative sont des homologues putatifs de gènes *d'Arabidopsis thaliana*, obtenus par comparaison de leurs séquences en acides aminés, à part Solyc12g017460 identifié chez la tomate et *SlnsLTP1* et *SlnsLTP2*, déjà décrit (Le *et al*, 2006). La sélection des gènes a été réalisée par homologie de leur séquence protéique avec *AtLACS1*, *AtLACS2*, *AtGPAT4*, *AtGPAT6*, *AtGPAT9*, *AtCYP86A7*, *AtHOTHEAD*, *AtHTHlike1*, *AtHTHlike2 AtABCG11*, *AtABCG12, AtBDG*, *AtGDSL2*, *AtWIN1/SHN1* et *AtSHN2*. Les numéros d'accessions, la séquence des amorces et les caractéristiques des amplifiats sont décrits en table 16. Les profils d'expression ont été mesurés sur de l'épiderme de fruit de tomate Micro-Tom au stade Red Ripe pour les mutants P17F12 et P30B6 et au stade 20 JAA pour P23F12 et *gdsl2-b*. Pour les mutants P23F12 et *gdsl2-b*, 3 pools de 8 fruits indépendants sont constitués alors que pour les mutants P17F12 et P30B6, 2 disques d'épiderme sont prélevés sur 2 fruits différents uniquement. Un échantillonnage équivalent a été réalisé pour les fruits WT. A partir des disques d'épiderme, les cellules du péricarpe sont soigneusement grattées au scalpel et les disques et sont poolés avant le broyage qui s'effectue avec un Ribolyzer Fast Prep FP120 (Thermo Savant). Le broyage s'effectue dans du tampon Trizol (Sigma), avec des billes en zirconium, pendant 45 s à la vitesse de 6,5, suivi d'1 min d'incubation à T°C ambiante puis broyage de nouveau pendant 45s à vitesse 6 ,5. Les ARN totaux sont ensuite isolés en suivant les recommandations du fournisseur puis élués dans 50 µL d'eau traitée au diethyl pyrocarbonate. L'ADN est éliminé par un traitement à la DNase I en utilisant le kit Turbo DNA Free (Ambion/ Applied Biosystems). Les profils de migration des échantillons sont analysés sur un Agilent 2100 Bioanalyzer, en utilisant des puces ARN Nano, en suivant les recommandations du fournisseur. Après analyse des états de dégradation de l'ARN par le logiciel 2100 Expert version 1.2 (Agilent), les échantillons présentant un RNA Integrity Number supérieur à 7 sont utilisés pour la transcription inverse. Un microgramme d'ARN traité à la DNase subit une transcription inverse comme décrit dans Mounet *et al*, 2009. Le

Nom du gène	amorce 5'	amorce 3'	Taille de l'amplifiat (pb)	Moyenne des CT (WT)
CYP71B35	AGTTGAAGCTCAGGATATGGAC	GCCTTGACTTTATGCTACCA	215	18,02

Table 17: Séquences des amorces utilisées pour l'analyse du taux d'expression du gène CYP71B35

	amorce 5'	amorce 3'	taille de l'amplifiat (pb)
Séquence ADN génomique CYP71B35			
CYP71B35_1	TATATTTGAGCAGTAGTAGACTAACAACCT	CTCTTTTATAATCTCATCACAAACTTCTCT	919
CYP71B35_2	ATTTGAGAGAAGTTTGTGATGAGATTATAAAAGAG	CTCTATTAGCTACAATCTTTCTTACTTCATTTT	991
CYP71B35_3	CTCTATTAGCTACAATCTTTCTTACTTCATTTT	TTTTTCTTAAGAGGTGTAAATTAAATCAAAAAC	921
Séquence zones amont CYP71B35			
Prom01	CAACCTTCGGATTGAAAGTGAG	CATAGATAGGTAGAGTTGAGGAG	1404
Prom02	CCAAACTTGCATAACTAAACCC	AAGCCTAGCCTTGAATCTGTC	1394
Prom03	GTGACTTATTCTGACCATCCT	TCAGTCCAACTTCATACACC	822
Prom04	GGTGCTACATCATAACTCCA	GCTTCAGACACTAATTCAGGG	1428
Prom05	ACCAAACAGGTGTTACATCATCAC	TGGGAAAGATTCATCTCACGC	1359
Prom06	GAAGGTCAGTATCCATCTCAC	CTCTATCAATACCAGTCGTTCC	1434
Prom07	CAAGAAAGCAGTGATAACTCTC	GCTCACTATATGGTAGCAACTC	1266
Prom08	TCTGAACTTAGACACAAGACATGG	CCCAAGCAACTTATAAATGCC	986
Prom09	TCTGAACTTAGACACAAGACATGG	CCCAAGCAACTTATAAATGCC	986
Prom10	GTCAATATCCACTGAAGCCA	CAGATGTCTTAATCTTGTGGTC	986
Prom11	GACCACAAGATTAAGACATCTG	ATTAGAAGCGGTGAGATAGAAGG	1015
Prom12	AAAGTTCAGACCTCACCGGC	TTCTGATTGATAAGCCAGAGTGTC	1043
Prom13	CTCTTGCTCGCTTATTCCTG	GAGATGAGATGATTAGAGTCGG	1498
Séquence ADN génomique CYP86A69			
CYP86A69	CATCAGTGCCAGAGGACTCA	AGGCAAATGAAAGGGTGATG	757

Table 18: Séquences des amorces utilisées pour l'analyse de l'ADN génomique de *CYP71B35* et *CYP86A69.*

produit de la réaction est dilué 10 fois dans de l'eau et une partie aliquote de 2 µL est utilisée pour la PCR Quantitative. La réaction s'effectue dans un volume final de 25 µL, en présence de 0,2 µM des amorces spécifiques, en utilisant le kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad) et en suivant les instructions du fournisseur. La machine utilisée est une Biorad CFX 96 Real Time System avec les paramètres suivants : dénaturation à 95°C pendant 90 s, 40 cycles d'amplification avec une étape de dénaturation de 30 s à 95°C et une hybridation/ synthèse de 30 s à 60°C. L'acquisition des données et les analyses sont réalisées en utilisant le logiciel CFX Manager version 3.0 (Biorad). Les gènes *EiF4*α, **β*-tubulin* et *actin* sont utilisés comme gènes de référence pour calculer l'expression relative des transcrits, en utilisant Genex (GENe EXpression analysis for icycler IQ real time PCR dectection system, Biorad). Un test *t* de Student est réalisé en utilisant les valeurs moyennes et la déviation standard des 2 réplicats pour les analyses sur P17F12 et P30B6, des 6 réplicats pour P23F12 et *gdsl2-b*.

L'analyse de l'expression du gène *CYP71B35* chez le mutant P23F12 a été effectuée sur les 3 pools réalisés précédemment, avec le couple d'amorces indiqué en table 17.

12. Analyse de séquences génomiques

Les ADN sont extraits à partir de 100 mg de feuilles jeunes en utilisant le DNAzol Reagent (Invitrogen) en suivant les recommandations du fournisseur. Une amplification PCR est réalisée en utilisant les amorces présentées en table 18, avec les conditions d'amplification thermiques suivantes : dénaturation initiale 3 min à 95°C, 35 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à la température d'hybridation du couple d'amorces utilisé, 1 min à 72°C. Une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C termine la réaction de PCR. Les produits d'amplification sont ensuite séquencés par un prestataire de service. Les résultats sont reçus sous forme de chromatogrammes, analysés avec les logiciels Chromas Lite 2.01 (Technelysium) et MultAlin (Corpet, 1988).

13. NGS-Mapping

Pour le NGS-Mapping, les bulks sont constitués de 85 plantes F2, présentant les fruits les plus brillants pour le pool « brillant » et les moins brillants pour le pool « référence ». Quatre disques de feuilles sont prélevés par plantes et un broyage mécanique est réalisé pour chaque pool, dans de l'azote liquide. L'ADN génomique est extrait par la méthode CTAB comme indiquée paragraphe 2. Un traitement RNAse A (Promega) est effectué en suivant les recommandations du fournisseur suivi d'une purification par traitement chloroforme / alcool isoamylique et précipitation éthanolique de l'ADN. Un dosage spectrophotométrique est réalisé afin de s'assurer que les ratios A260/A280 soient

supérieurs à 1,8 et les ratios A260/A230 soient supérieurs à 1,7. Le séquençage a été réalisé par le Centre National de Génotypage (CNG) pour un total de 70 Gb.

14. Spectroscopie Fourier Transform infrared (FTIR)

Les analyses en FTIR ont été réalisées à l'unité Biopolymères, Interactions, Assemblages de l'INRA. Le spectre FTIR composé de 200 scans a été enregistré à une résolution de 2 cm^{-1} sur un spectromètre Nicolet Magna IR550, équipé d'un détecteur au mercatel [tellurure de mercure-cadmium (HgCdTe)], refroidi à l'azote liquide. L'instrument est purgé par de l'air sec en continu. Les spectres de cutine sont obtenus par la réflexion totale atténuée [attenuated total reflection (ATR)] à l'aide d'un accessoire de réflexion équipé d'un cristal de diamant thermostaté. Pour calculer le ratio $R_{ICH2/ICO}$, la surface des bandes des méthylènes aliphatiques (2978 –2838 cm^{-1}) et des composés carbonylés (1750-1690 cm^{-1}) a été mesurée à partir de spectres non-normalisés corrigés de la ligne de base.

Bibliographie

Références bibliographiques

Abe, A., Kosugi, S., Yoshida, K., Natsume, S., Takagi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Mitsuoka, C., Tamiru, M., Innan, H., Cano, L., Kamoun, S., and Terauchi, R. (2012). Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. Nature Biotechnology **30,** 174-178.

Adato, A., Mandel, T., Mintz-Oron, S., Venger, I., Levy, D., Yativ, M., Domínguez, E., Wang, Z., De Vos, R.C., Jetter, R., Schreiber, L., Heredia, A., Rogachev, I., and Aharoni, A. (2009). Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SlMYB12-regulated transcriptional network. PLoS Genet **5,** e1000777.

Agarwal, S., and Rao, A.V. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. CMAJ **163,** 739-744.

Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., van Arkel, G., and Pereira, A. (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.

Aleksenko, A., Nielsen, M., and Clutterbuck, A. (2001). Genetic and physical mapping of two centromere-proximal regions of chromosome IV in Aspergillus nidulans. Fungal Genetics and Biology **32,** 45-54.

Alexander, L., and Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. J Exp Bot **53,** 2039-2055.

Ambavaram, M., Krishnan, A., Trijatmiko, K., and Pereira, A. (2011). Coordinated Activation of Cellulose and Repression of Lignin Biosynthesis Pathways in Rice. Plant Physiology **155,** 916-931.

Andersson, M., Goksor, M., and Sandelius, A. (2007). Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. Journal of Biological Chemistry **282,** 1170-1174.

Andrews, J., and Keegstra, K. (1983). Acyl-CoA synthetase is located in the outer-membrane and acyl-CoA thioesterase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes. Plant Physiology **72,** 735-740.

Arnold, D., Flegmann, A., and Clarkson, J. (1995). Somaclonal variation in watercress for resistance to Crook root disease. Plant Cell Reports **14,** 241-244.

Bach, L., Michaelson, L.V., Haslam, R., Bellec, Y., Gissot, L., Marion, J., Da Costa, M., Boutin, J.-P., Miquel, M., Tellier, F., Domergue, F., Markham, J.E., Beaudoin, F., Napier, J.A., and Faure, J.-D. (2008). The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105,** 14727-14731.

Baker, E. (1982). Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes, D. Cutler, K. Alvin, and C. Price, eds (The plant cuticle: Academic Press), pp. 139-165.

Baker, E., and Hunt, G. (1986). Erosion of waxes from leaf surfaces by simulated rain (New Phytologist), pp. 161-173.

Bargel, H., and Neinhuis, C. (2004). Altered tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) fruit cuticle biomechanics of a pleiotropic non ripening mutant. Journal of Plant Growth Regulation **23,** 61-75.

Bargel, H., and Neinhuis, C. (2005). Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. J Exp Bot **56,** 1049-1060.

Bargel, H., Koch, K., Cerman, Z., and Neinhuis, C. (2006). Structure-function relationship of the plant cuticle and cuticular waxes - a smart material? (Functional Plant Biology), pp. 893-910.

Baud, S., Bellec, Y., Miquel, M., Bellini, C., Caboche, M., Lepiniec, L., Faure, J.D., and Rochat, C. (2004). gurke and pasticcino3 mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase. EMBO Rep **5,** 515-520.

Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. Nature **431,** 356-363.

Beaudoin, F., Wu, X., Li, F., Haslam, R.P., Markham, J.E., Zheng, H., Napier, J.A., and Kunst, L. (2009). Functional Characterization of the Arabidopsis beta-Ketoacyl-Coenzyme A Reductase Candidates of the Fatty Acid Elongase. Plant Physiology **150,** 1174-1191.

Benning, C. (2008). A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. Prog Lipid Res **47,** 381-389.

Benveniste, I., Saito, T., Wang, Y., Kandel, S., Huang, H., Pinot, F., Kahn, R., Salaun, J., and Shimoji, M. (2006). Evolutionary relationship and substrate specificity of Arabidopsis thaliana fatty acid omega-hydroxylase. Plant Science **170,** 326-338.

Bernard, A., and Joubès, J. (2013). Arabidopsis cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. Prog Lipid Res **52,** 110-129.

Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Jetter, R., Renne, C., Faure, J.D., Haslam, R.P., Napier, J.A., Lessire, R., and Joubès, J. (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.

Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraça, L., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A.C., Métraux, J.P., and Nawrath, C. (2011). A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in Arabidopsis. Plant Cell **23,** 1958-1970.

Bhushan, B. (2012). Bioinspired structured surfaces. Langmuir **28,** 1698-1714.

Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X.W., Yephremov, A., and Samuels, L. (2007). Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. Plant Journal **52,** 485-498.

Blume, A., Hübner, W., and Messner, G. (1988). Fourier transform infrared spectroscopy of 13C = O-labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. Biochemistry **27,** 8239-8249.

Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu Rev Plant Biol **60,** 379-406.

Bonaventure, G., Salas, J.J., Pollard, M.R., and Ohlrogge, J.B. (2003). Disruption of the FATB gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. Plant Cell **15,** 1020-1033.

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 J **40,** 920-930.

Borodich, F., Gorb, E., and Gorb, S. (2010). Fracture behaviour of plant epicuticular wax crystals and its role in preventing insect attachment: a theoretical approach. (Applied Physics A), pp. 63-71.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet **32,** 314-331.

Broun, P., Poindexter, P., Osborne, E., Jiang, C.Z., and Riechmann, J.L. (2004). WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101,** 4706-4711.

Brown, D., Zeef, L., Ellis, J., Goodacre, R., and Turner, S. (2005). Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. Plant Cell **17,** 2281-2295.

Browse, J., and Somerville, C. (1991). Glycerolipid synthesis biochemistry and regulation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **42,** 467-506.

Brummell, D.A., and Harpster, M.H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. Plant Mol Biol **47,** 311-340.

Buda, G.J., Isaacson, T., Matas, A.J., Paolillo, D.J., and Rose, J.K.C. (2009). Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. Plant Journal **60,** 378-385.

Buschhaus, C., and Jetter, R. (2011). Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces? J Exp Bot **62,** 841-853.

Buschhaus, C., and Jetter, R. (2012). Composition and physiological function of the wax layers coating Arabidopsis leaves: β-amyrin negatively affects the intracuticular water barrier. Plant Physiol **160,** 1120-1129.

Calvert, A. (1965). Flower initiation and development in the tomato (N.A.A.S.Q. Rev.), pp. 79-88.

Canady, M.A., Meglic, V., and Chetelat, R.T. (2005). A library of Solanum lycopersicoides introgression lines in cultivated tomato. Genome **48,** 685-697.

Carpita, N., and Mc Cann, M. (2000). The cell wall (Biochemistry and Molecular Biology of Plants: American Society of Plant Biologist), pp. 52-109.

Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J **3,** 1-30.

Casado, C., and Heredia, A. (1999). Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (Vitis vinifera L.). Journal of Experimental Botany **50,** 175-182.

Catalá, C., Rose, J.K., and Bennett, A.B. (2000). Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. Plant Physiol **122,** 527-534.

Chassot, C., Nawrath, C., and Metraux, J.-P. (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. Plant Journal **49,** 972-980.

Chen, G., Komatsuda, T., Ma, J.F., Li, C., Yamaji, N., and Nevo, E. (2011a). A functional cutin matrix is required for plant protection against water loss. Plant signaling & behavior **6,** 1297-1299.

Chen, X., Truksa, M., Snyder, C.L., El-

Mezawy, A., Shah, S., and Weselake, R.J. (2011b). Three homologous genes encoding sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 exhibit different expression patterns and functional divergence in Brassica napus. Plant Physiol **155,** 851-865.

Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.P., and Renaudin, J.P. (2005). Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. Plant Physiol **139,** 1984-1994.

Christmann, A., Moes, D., Himmelbach, A., Yang, Y., Tang, Y., and Grill, E. (2006). Integration of abscisic acid signalling into plant responses. Plant Biol (Stuttg) **8,** 314-325.

Chuang, C., and Meyerowitz, E. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97,** 4985-4990.

Cocuron, J., Lerouxel, O., Drakakaki, G., Alonso, A., Liepman, A., Keegstra, K., Raikhel, N., and Wilkerson, C. (2007). A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104,** 8550-8555.

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 J **53,** 53-64.

Consortium, T.G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature **485,** 635-641.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical-clustering. Nucleic Acids Research **16,** 10881-10890.

Cosgrove, D. (1985). Prospect, Perspective and the Evolution of the Landscape (Transactions of the Institute of British Geographers: Wiley-Blackwell), pp. 45-62.

Cosgrove, D.J. (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. Annu Rev Cell Dev Biol **13,** 171-201.

Cosgrove, D.J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. Nature **407,** 321-326.

Davies, J., and Hobson, G. (1981). The constituents of tomato fruit – the influence of environment, nutrition and genotype. Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition **15,** 205-280.

Dean, B.B., and Kolattukudy, P.E. (1976). Synthesis of Suberin during Wound-healing in Jade Leaves, Tomato Fruit, and Bean Pods. Plant Physiol **58,** 411-416.

DeBono, A., Yeats, T.H., Rose, J.K.C., Bird, D., Jetter, R., Kunst, L., and Samuelsa, L. (2009). Arabidopsis LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. Plant Cell **21,** 1230-1238.

Deising, H., Nicholson, R.L., Haug, M., Howard, R.J., and Mendgen, K. (1992). Adhesion Pad Formation and the Involvement of Cutinase and Esterases in the Attachment of Uredospores to the Host Cuticle. Plant Cell **4,** 1101-1111.

Denic, V., and Weissman, J.S. (2007). A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. Cell **130,** 663-677.

Dickinson H.G. and Lewis D. (1973). The Formation of the Tryphine Coating the Pollen Grains of Raphanus, and Its Properties Relating to the Self-Incompatibility System (Proc. R. Soc. Lond.), pp. 149-165.

Dickman, M.B., Ha, Y.S., Yang, Z.,

Adams, B., and Huang, C. (2003). A protein kinase from Colletotrichum trifolii is induced by plant cutin and is required for appressorium formation. Molecular Plant-Microbe Interactions **16,** 411-421.

Dieleman, J., and Heuvelink, E. (1992). Factors Affecting the Number of Leaves Preceding the First Inflorescence in the Tomato (The Journal of Horticultural Science & Biotechnology), pp. 1-10.

Dievart, A., and Clark, S. (2003). Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. Current Opinion in Plant Biology **6,** 507-516.

Doganlar, S., Frary, A., Ku, H.M., and Tanksley, S.D. (2002). Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of Lycopersicon pimpinellifolium (LA1589). Genome **45,** 1189-1202.

Dominguez, E., Cuartero, J., and Heredia, A. (2011). An overview on plant cuticle biomechanics. Plant Science **181,** 77-84.

Domínguez, E., Luque, P., and Heredia, A. (2009). Sorption and interaction of the flavonoid naringenin on tomato fruit cuticles. J Agric Food Chem **57,** 7560-7564.

Domínguez, E., Cuartero, J., and Heredia, A. (2011). An overview on plant cuticle biomechanics. Plant Sci **181,** 77-84.

Domínguez, E., Fernández, M.D., Hernández, J.C., Parra, J.P., España, L., Heredia, A., and Cuartero, J. (2012). Tomato fruit continues growing while ripening, affecting cuticle properties and cracking. Physiol Plant **146,** 473-486.

Donaldson, R., and Luster, D. (1991). Multiple forms of plant cytochromes P450. Plant Physiology **96,** 669-674.

Dormann, P., Voelker, T., and Ohlrogge, J. (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a novel thioesterase from Arabidopsis thaliana specific for long chain acyl-acyl carrier proteins. Archives of Biochemistry and Biophysics **316,** 612-618.

Edwards, D., Abbott, G., and Raven, J. (1996). Cuticles of early land plants : a palaeoecophysiological evaluation (Plant cuticles : an integrated functional approach: BIOS Scientific), pp. 1-32.

Emmanuel, E., and Levy, A.A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. Curr Opin Plant Biol **5,** 112-117.

Eshed, Y., and Zamir, D. (1995). An introgression line population of Lycopersicon pennellii in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. Genetics **141,** 1147-1162.

Espeso, E., Cobeno, L., and Arst, H. (2005). Discrepancies between recombination frequencies and physical distances in Aspergillus nidulans: Implications for gene identification. Genetics **171,** 835-838.

Etienne, H., and Bertrand, B. (2003). Somaclonal variation in Coffea arabica: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. Tree Physiology **23,** 419-426.

Faure, J.D., Vittorioso, P., Santoni, V., Fraisier, V., Prinsen, E., Barlier, I., Van Onckelen, H., Caboche, M., and Bellini, C. (1998). The PASTICCINO genes of Arabidopsis thaliana are involved in the control of cell division and differentiation. Development **125,** 909-918.

Fernandez, A., Viron, N., Alhagdow, M., Karimi, M., Jones, M., Amsellem, Z., Sicard, A., Czerednik, A., Angenent, G., Grierson, D., May, S., Seymour, G., Eshed, Y., Lemaire-Chamley, M., Rothan, C., and Hilson, P. (2009). Flexible Tools for Gene Expression and

Silencing in Tomato. Plant Physiology **151,** 1729-1740.

Fiebig, A., Mayfield, J.A., Miley, N.L., Chau, S., Fischer, R.L., and Preuss, D. (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.

Filippis, I., Lopez-Cobollo, R., Abbott, J., Butcher, S., and Bishop, G. (2013). Using a periclinal chimera to unravel layer-specific gene expression in plants. Plant Journal **75,** 1039-1049.

Gidda, S.K., Shockey, J.M., Rothstein, S.J., Dyer, J.M., and Mullen, R.T. (2009). Arabidopsis thaliana GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. Plant Physiol Biochem **47,** 867-879.

Gillaspy, G., Ben-David, H., and Gruissem, W. (1993). Fruits: A Developmental Perspective. Plant Cell **5,** 1439-1451.

Giovannucci, E. (1999). Nutritional factors in human cancers. Adv Exp Med Biol **472,** 29-42.

Girard, A.L., Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Gaillard, C., Elmorjani, K., Vivancos, J., Runavot, J.L., Quemener, B., Petit, J., Germain, V., Rothan, C., Marion, D., and Bakan, B. (2012). Tomato GDSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. Plant Cell **24,** 3119-3134.

Graca, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., and Pereira, H. (2002). Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. Phytochemistry **61,** 205-215.

Graça, J., and Pereira, H. (2000). Methanolysis of bark suberins : analysis of glycerol and acid monomers (Phytochemical Analysis), pp. 45-51.

Greene, E., Codomo, C., Taylor, N., Henikoff, J., Till, B., Reynolds, S., Enns, L., Burtner, C., Johnson, J., Odden, A., Comai, L., and Henikoff, S. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in arabidopsis. Genetics **164,** 731-740.

Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X., Samuels, L., Kunst, L., and Jetter, R. (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 Physiology **145,** 653-667.

Gunning, B., and Steer, M. (1996). Plant cell biology : structure and function (Jones & Bartlett Learning: Jones & Bartlett publishers).

Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., and Owen, J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theor Appl Genet **89,** 998-1006.

Hall, R.D., Brouwer, I.D., and Fitzgerald, M.A. (2008). Plant metabolomics and its potential application for human nutrition. Physiol Plant **132,** 162-175.

Hallahan, D.L., Nugent, J.H., Hallahan, B.J., Dawson, G.W., Smiley, D.W., West, J.M., and Wallsgrove, R.M. (1992). Interactions of Avocado (Persea americana) Cytochrome P-450 with Monoterpenoids. Plant Physiol **98,** 1290-1297.

Hannon, G. (2002). RNA interference. Nature **418,** 244-251.

Hansen, J.D., Pyee, J., Xia, Y., Wen, T.J., Robertson, D.S., Kolattukudy, P.E., Nikolau, B.J., and Schnable, P.S. (1997). The glossy1 locus of maize and an epidermis-specific cDNA from Kleinia odora define a class of receptor-like proteins required for the normal accumulation of cuticular waxes. Plant Physiol **113,** 1091-1100.

Hansjakob, A., Riederer, M., and Hildebrandt, U. (2011). Wax matters: absence of very-long-chain aldehydes from the leaf cuticular wax of the glossy11 mutant of maize compromises the prepenetration processes of *Blumeria graminis*. (Plant Pathology), pp. 1151-1161.

Hansjakob, A., Bischof, S., Bringmann, G., Riederer, M., and Hildebrandt, U. (2010). Very-long-chain aldehydes promote in vitro prepenetration processes of Blumeria graminis in a dose- and chain length-dependent manner. New Phytol **188,** 1039-1054.

Harker, F., Redgwell, R., Hallett, I., Murray, S., and Carter, G. (1997). Texture of fresh fruit (Hortical Review), pp. 121-224.

Hartwig, B., James, G., Konrad, K., Schneeberger, K., and Turck, F. (2012). Fast Isogenic Mapping-by-Sequencing of Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutant Bulks. Plant Physiology **160,** 591-600.

Heredia-Guerrero, J., San-Miguel, M., Sansom, M., Heredia, A., and Benitez, J. (2009). Chemical Reactions in 2D: Self-Assembly and Self-Esterification of 9(10),16-Dihydroxypalmitic Acid on Mica Surface. Langmuir **25,** 6869-6874.

Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T., and Ohme-Takagi, M. (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. Plant Journal **34,** 733-739.

Hirota, S. (1974). Studies of genetic biochemistry on the formation of lycopene and coloring of tomato. i (Bull Coll Agric Vet Med Nihon Univ), pp. 93-105.

Ho, L. (1996). Photoassimilate Distribution in Plants and Crops, E. Zamski and A. Schaffer, eds (Tomato: Marcel Dekker).

Ho, L., and Hewitt, J. (1986). The tomato crop : a scientific basis for improvement (Fruit Development: Chapman and Hall), pp. 201-239.

Hobson, G., Grierson, D (1993). Tomato (Biochemistry of Fruit Ripening: Chapman & Hall), pp. 405–442.

Holloway, P. (1982). Structure and histochemistry of plant cuticular membranes (The plant cuticle: Academic Press), pp. 1-32.

Hooker, T., Millar, A., and Kunst, L. (2002). Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis. Plant Physiology **129,** 1568-1580.

Hooker, T., Lam, P., Zheng, H., and Kunst, L. (2007). A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis. Plant Cell **19,** 904-913.

Hovav, R., Chehanovsky, N., Moy, M., Jetter, R., and Schaffer, A.A. (2007). The identification of a gene (Cwp1), silenced during Solanum evolution, which causes cuticle microfissuring and dehydration when expressed in tomato fruit. Plant Journal **52,** 627-639.

Hunter, R., and Richard, W. (1987). The measurement of appearance (Wiley).

Hutchings, J. (1999). Food color and appearance (Gaithersburg).

Hülskamp, M., Kopczak, S.D., Horejsi, T.F., Kihl, B.K., and Pruitt, R.E. (1995). Identification of genes required for pollen-stigma recognition in Arabidopsis thaliana. Plant J **8,** 703-714.

Isaacson, T., Kosma, D.K., Matas, A.J., Buda, G.J., He, Y., Yu, B., Pravitasari, A., Batteas, J.D., Stark, R.E., Jenks, M.A., and Rose, J.K.C. (2009). Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. Plant

Journal **60,** 363-377.

Ishihara, T., Mitsuhara, I., Takahashi, H., and Nakaho, K. (2012). Transcriptome analysis of quantitative resistance-specific response upon Ralstonia solanacearum infection in tomato. PLoS One **7,** e46763.

Javelle, M., Vernoud, V., Rogowsky, P.M., and Ingram, G.C. (2011). Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. New Phytologist **189,** 17-39.

Javelle, M., Vernoud, V., Depège-Fargeix, N., Arnould, C., Oursel, D., Domergue, F., Sarda, X., and Rogowsky, P.M. (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.

Jeffree, C. (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles (Plant cuticles : an integrated functional approach: BIOS Scientific), pp. 33-82.

Jenks, M.A., Eigenbrode, S.D., and Lemieux, B. (2002). Cuticular waxes of Arabidopsis. Arabidopsis Book **1,** e0016.

Jessen, D., Olbrich, A., Knüfer, J., Krüger, A., Hoppert, M., Polle, A., and Fulda, M. (2011). Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in Arabidopsis. Plant J **68,** 715-726.

John, M., Rörhig, H., Schmidt, J., Walden, R., and Schell, J. (1997). Cell signaling by oligosaccharides (Trends in Plant Science), pp. 111-115.

Joubès, J., and Chevalier, C. (2000). Endoreduplication in higher plants. Plant Mol Biol **43,** 735-745.

Joubès, J., Raffaele, S., Bourdenx, B., Garcia, C., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Domergue, F., and Lessire, R. (2008). The VLCFA elongase gene family in Arabidopsis thaliana: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. Plant Mol Biol **67,** 547-566.

Just, D., Garcia, V., Fernandez, L., Bres, C., Mauxion, J., Petit J, Jorly, J., Assali, J., Bournonville, C., Ferrand, C., Baldet, P., Lemaire-Chamley, M., Mori, K., Okabe, Y., Ariizumi, T., Asamizu, E., Ezura, H., and Rothan, C. (2013). Micro-Tom mutants for functional analysis of target genes and discovery of new alleles in tomato (Plant Biotechnology: Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology), pp. 1-7.

Kader, A., Stevens, M., Albright, M., and Morris, L. (1978). Amino acid composition and flavor of fresh market tomatoes as influenced by fruit ripeness when harvested, pp. 541-544.

Kader, J. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **47,** 627-654.

Kader, J.C., Julienne, M., and Vergnolle, C. (1984). Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. Eur J Biochem **139,** 411-416.

Kannangara, R., Branigan, C., Liu, Y., Penfield, T., Rao, V., Mouille, G., Hofte, H., Pauly, M., Riechmann, J.L., and Broun, P. (2007). The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Plant Cell **19,** 1278-1294.

Kenrick, P., and Crane, P. (1997). The origin and early evolution of plants on land (Nature: Macmillan Publishers Ltd), pp. 33-39.

Kerstiens, G. (1996). Cuticular water permeability and its physiological significance. Journal of Experimental Botany **47,** 1813-1832.

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 Cell Physiol **53,** 1391-1403.

Kim, H.G., Kwon, S.J., Jang, Y.J., Nam, M.H., Chung, J.H., Na, Y.C., Guo, H., and Park, O.K. (2013). GDSL Lipase 1 Modulates Plant Immunity through Feedback Regulation of Ethylene Signaling. Plant Physiol.

Klann, E.M., Chetelat, R.T., and Bennett, A.B. (1993). Expression of Acid Invertase Gene Controls Sugar Composition in Tomato (Lycopersicon) Fruit. Plant Physiol **103,** 863-870.

Kolattukudy, P.E. (1981). Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **32,** 539-567.

Kolattukudy, P.E., Rogers, L.M., Li, D.X., Hwang, C.S., and Flaishman, M.A. (1995). Surface signaling in pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92,** 4080-4087.

Koorneef, M., Dellaert, L., and Vanderveen, J. (1982). EMS-induced and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in Arabidopsis thaliana (L) Heynh. Mutation Research **93,** 109-123.

Koorneef , M., Hanhart, C., and Thiel, F. (1989). A genetic and phenotypic description of *eceriferum* (cer) mutants in Arabidopsis thaliana. Journal of Heredity **80,** 118-122.

Kosma, D.K., Parsons, E.P., Isaacson, T., Lue, S., Rose, J.K.C., and Jenks, M.A. (2010). Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. Physiologia Plantarum **139,** 107-117.

Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lue, S., Joubes, J., and Jenks, M.A. (2009). The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of Arabidopsis. Plant Physiology **151,** 1918-1929.

Koziel, K., Lebiedzinska, M., Szabadkai, G., Onopiuk, M., Brutkowski, W., Wierzbicka, K., Wilczynski, G., Pinton, P., Duszynski, J., Zablocki, K., and Wieckowski, M. (2009). Plasma membrane associated membranes (PAM) from Jurkat cells contain STIM1 protein Is PAM involved in the capacitative calcium entry? International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41,** 2440-2449.

Krauss, P., Markstadter, C., and Riederer, M. (1997). Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. Plant Cell and Environment **20,** 1079-1085.

Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Franke, R., Prakash, H.S., Schreiber, L., and Mathew, M.K. (2009). The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (Oryza sativa L.). Planta **230,** 119-134.

Krolikowski, K.A., Victor, J.L., Wagler, T.N., Lolle, S.J., and Pruitt, R.E. (2003). Isolation and characterization of the Arabidopsis organ fusion gene HOTHEAD. Plant Journal **35,** 501-511.

Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nature Protocols **4,** 1073-1082.

Kunst, L., and Samuels, L. (2009). Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. Current Opinion in Plant Biology **12,** 721-727.

Kurata, T., Kawabata-Awai, C., Sakuradani, E., Shimizu, S., Okada, K., and Wada, T. (2003).

The YORE-YORE gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in Arabidopsis. Plant Journal **36,** 55-66.

Kurdyukov, S., Faust, A., Trenkamp, S., Bar, S., Franke, R., Efremova, N., Tietjen, K., Schreiber, L., Saedler, H., and Yephremov, A. (2006a). Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. Planta **224,** 315-329.

Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., Bar, S., Voisin, D., Efremova, N., Franke, R., Schreiber, L., Saedler, H., Metraux, J.P., and Yephremov, A. (2006b). The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in Arabidopsis. Plant Cell **18,** 321-339.

Lam, P., Zhao, L., McFarlane, H.E., Aiga, M., Lam, V., Hooker, T.S., and Kunst, L. (2012). RDR1 and SGS3, components of RNA-mediated gene silencing, are required for the regulation of cuticular wax biosynthesis in developing inflorescence stems of Arabidopsis. Plant Physiol **159,** 1385-1395.

Lander, E., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M., Lincoln, S., Newburg, L., and Green, P. (1987). MAPMAKER a computer package for constructing genetic-linkage maps. Cytogenetics and Cell Genetics **46,** 642-642.

Le, L.Q., Mahler, V., Lorenz, Y., Scheurer, S., Biemelt, S., Vieths, S., and Sonnewald, U. (2006). Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. Journal of Allergy and Clinical Immunology **118,** 1176-1183.

Lee, S., and Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. Plant Cell and Environment **35,** 53-60.

Lee, S.B., Go, Y.S., Bae, H.J., Park, J.H., Cho, S.H., Cho, H.J., Lee, D.S., Park, O.K., Hwang, I., and 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,** 42-54.

Leide, J., Hildebrandt, U., Vogg, G., and Riederer, M. (2011). The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. Journal of Plant Physiology **168,** 871-877.

Leide, J., Hildebrandt, U., Reussing, K., Riederer, M., and Vogg, G. (2007). The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: Effects of a deficiency in a beta-ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). Plant Physiology **144,** 1667-1679.

Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., Fagard, M., Mouassite, M., Cheniclet, C., and Rothan, C. (2005). Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. Plant Physiol **139,** 750-769.

Lewontin, R., and Hubby, J. (1966). A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations (Genetics), pp. 595-609.

Li, F., Wu, X., Lam, P., Bird, D., Zheng, H., Samuels, L., Jetter, R., and Kunst, L. (2008). Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: Diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in Arabidopsis. Plant Physiology **148,** 97-107.

Li, X.C., Zhu, J., Yang, J., Zhang, G.R., Xing, W.F., Zhang, S., and Yang, Z.N. (2012). Glycerol-3-phosphate

acyltransferase 6 (GPAT6) is important for tapetum development in Arabidopsis and plays multiple roles in plant fertility. Mol Plant **5,** 131-142.

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 Physiol **144,** 1267-1277.

Li, Y.H., 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,** 18339-18344.

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,** 22008-22013.

Lisso, J., Schröder, F., Schippers, J.H., and Müssig, C. (2012). NFXL2 modifies cuticle properties in Arabidopsis. Plant Signal Behav **7,** 551-555.

Lolle, S.J., and Cheung, A.Y. (1993). Promiscuous germination and growth of wildtype pollen from Arabidopsis and related species on the shoot of the Arabidopsis mutant, fiddlehead. Dev Biol **155,** 250-258.

Lolle, S.J., and Pruitt, R.E. (1999). Epidermal cell interactions: a case for local talk. Trends Plant Sci **4,** 14-20.

Lolle, S.J., Cheung, A.Y., and Sussex, I.M. (1992). Fiddlehead: an Arabidopsis mutant constitutively expressing an organ fusion program that involves interactions between epidermal cells. Dev Biol **152,** 383-392.

Lolle, S.J., Hsu, W., and Pruitt, R.E. (1998). Genetic analysis of organ fusion in Arabidopsis thaliana. Genetics **149,** 607-619.

Longhi, S., and Cambillau, C. (1999). Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. Biochim Biophys Acta **1441,** 185-196.

Lopez-Casado, G., Matas, A.J., Dominguez, E., Cuartero, J., and Heredia, A. (2007). Biomechanics of isolated tomato (Solanum lycopersicum L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. Journal of Experimental Botany **58,** 3875-3883.

Lu, S., Song, T., Kosma, D., Parsons, E., Rowland, O., and Jenks, M. (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,** 553-564.

Lu, S., Zhao, H., Des Marais, D., Parsons, E., Wen, X., Xu, X., Bangarusamy, D., Wang, G., Rowland, O., Juenger, T., Bressan, R., and Jenks, M. (2012). Arabidopsis ECERIFERUM9 Involvement in Cuticle Formation and Maintenance of Plant Water Status. Plant Physiology **159,** 930-944.

Luo, X., Bai, X., Sun, X., Zhu, D., Liu, B., Ji, W., Cai, H., Cao, L., Wu, J., Hu, M., Liu, X., Tang, L., and Zhu, Y. (2013). Expression of wild soybean WRKY20 in Arabidopsis enhances drought tolerance and regulates ABA signalling. J Exp Bot.

Maldonado, A., Doerner, P., Dixon, R., Lamb, C., and Cameron, R. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. Nature **419,** 399-403.

Marti, E., Gisbert, C., Bishop, G., Dixon, M., and Garcia-Martinez, J. (2006).

Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. Journal of Experimental Botany **57,** 2037-2047.

Martin, L.B., Fei, Z., Giovannoni, J.J., and Rose, J.K. (2013a). Catalyzing plant science research with RNA-seq. Front Plant Sci **4,** 66.

Martin, L.B., Fei, Z., Giovannoni, J.J., and Rose, J.K. (2013b). Catalyzing plant science research with RNA-seq. Front Plant Sci **4,** 66.

Masucci, J., Rerie, W., Foreman, D., Zhang, M., Galway, M., Marks, M., and Schiefelbein, J. (1996). The homeobox gene GLABRA 2 is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of Arabidopsis thaliana. Development **122,** 1253-1260.

Matas, A., Agusti, J., Tadeo, F., Talon, M., and Rose, J. (2010). Tissue-specific transcriptome profiling of the citrus fruit epidermis and subepidermis using laser capture microdissection. Journal of Experimental Botany **61,** 3321-3330.

Matas, A.J., Cobb, E.D., Bartsch, J.A., Paolillo, D.J., and Niklas, K.J. (2004). Biomechanics and anatomy of Lycopersicon esculentum fruit peels and enzyme-treated samples. Am J Bot **91,** 352-360.

Matas, A.J., Yeats, T.H., Buda, G.J., Zheng, Y., Chatterjee, S., Tohge, T., Ponnala, L., Adato, A., Aharoni, A., Stark, R., Fernie, A.R., Fei, Z., Giovannoni, J.J., and Rose, J.K. (2011). Tissue- and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. Plant Cell **23,** 3893-3910.

Matsui, K., Umemura, Y., and Ohme-Takagi, M. (2008). AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. Plant J **55,** 954-967.

McCallum, C., Comai, L., Greene, E., and Henikoff, S. (2000a). Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Physiology **123,** 439-442.

McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S. (2000b). Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Physiol **123,** 439-442.

McFarlane, H.E., Shin, J.J.H., Bird, D.A., and Samuels, A.L. (2010). Arabidopsis ABCG Transporters, Which Are Required for Export of Diverse Cuticular Lipids, Dimerize in Different Combinations. Plant Cell **22,** 3066-3075.

Mehrshahi, P., Stefano, G., Andaloro, J.M., Brandizzi, F., Froehlich, J.E., and DellaPenna, D. (2013). Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A **110,** 12126-12131.

Menda, N., Semel, Y., Peled, D., Eshed, Y., and Zamir, D. (2004). In silico screening of a saturated mutation library of tomato. Plant J **38,** 861-872.

Metz, J.G., Pollard, M.R., Anderson, L., Hayes, T.R., and Lassner, M.W. (2000). Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed. Plant Physiol **122,** 635-644.

Michelmore, R., Paran, I., and Kesseli, R. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analyses – a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88,** 9828-9832.

Millar, A.A., and 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.

Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E.M., Taylor, D.C., and Kunst, L. (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.

Mintz-Oron, S., Mandel, T., Rogachev, I., Feldberg, L., Lotan, O., Yativ, M., Wang, Z., Jetter, R., Venger, I., Adato, A., and Aharoni, A. (2008). Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. Plant Physiol **147,** 823-851.

Mizrach, A., Lu, R., and Rubino, M. (2009). Gloss Evaluation of Curved-surface Fruits and Vegetables. Food and Bioprocess Technology **2,** 300-307.

Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., and Ryser, U. (1999). Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. Plant Physiol **119,** 1137-1146.

Molesini, B., Pii, Y., and Pandolfini, T. (2012). Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA. Trends in Biotechnology **30,** 80-88.

Molina, A., Sagura, A., and Garciaolmedo, F. (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from Barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant-pathogens. Febs Letters **316,** 119-122.

Monforte, A.J., and Tanksley, S.D. (2000). Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the Lycopersicon hirsutum genome in a L. esculentum genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. Genome **43,** 803-813.

Mounet, F., Moing, A., Garcia, V., Petit, J., Maucourt, M., Deborde, C., Bernillon, S., Le Gall, G., Colquhoun, I., Defernez, M., Giraudel, J.L., Rolin, D., Rothan, C., and Lemaire-Chamley, M. (2009). Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. Plant Physiol **149,** 1505-1528.

Muller, H. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in Drosophila (Journal of Genetic), pp. 299-334.

Mulroy, T. (1979). Spectral properties of heavily glaucous and non-glaucous leaves of a succulent rosette-plant. Oecologia **38,** 349-357.

Müsel, G., Schindler, T., Bergfeld, R., Ruel, K., Jacquet, G., Lapierre, C., Speth, V., and Schopfer, P. (1997). Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes (Planta), pp. 146-159.

Nadakuduti, S.S., Pollard, M., Kosma, D.K., Allen, C., Ohlrogge, J.B., and Barry, C.S. (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.

Nakamura, M., Katsumata, H., Abe, M., Yabe, N., Komeda, Y., Yamamoto, K., and Takahashi, T. (2006). Characterization of the class IV homeodomain-leucine zipper gene family in Arabidopsis. Plant Physiology **141,** 1363-1375.

Nawrath, C. (2002). The biopolymers cutin and suberin. Arabidopsis Book **1,** e0021.

Nawrath, C. (2006). Unraveling the complex network of cuticular structure and function. Current Opinion in Plant Biology **9,** 281-287.

Neinhuis, C., and Barthlott, W. (1997). Characterization and Distribution of Water-repellent, Self-cleaning Plant Surfaces (Annals of Botany: Oxford

Journals), pp. 667-677.

Nieuwland, J., Feron, R., Huisman, B.A., Fasolino, A., Hilbers, C.W., Derksen, J., and Mariani, C. (2005). Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. Plant Cell **17,** 2009-2019.

Ohlrogge, J., and Jaworski, J. (1997). Regulation of fatty acid synthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48,** 109-136.

Okabe, Y., Asamizu, E., Saito, T., Matsukura, C., Ariizumi, T., Brès, C., Rothan, C., Mizoguchi, T., and Ezura, H. (2011). Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. Plant Cell Physiol **52,** 1994-2005.

Oshima, Y., Shikata, M., Koyama, T., Ohtsubo, N., Mitsuda, N., and Ohme-Takagi, M. (2013). MIXTA-like transcription factors and WAX INDUCER1/SHINE1 coordinately regulate cuticle development in Arabidopsis and Torenia fournieri. Plant Cell **25,** 1609-1624.

Kolattukudy, P.E. (1996). Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses (Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach: BIOS Scientific), pp. 83-108.

Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L., and Aharoni, A. (2011). The Arabidopsis ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. New Phytologist **190,** 113-124.

Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R.B., Hofer, R., Schreiber, L., Chory, J., and Aharoni, A. (2007). The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. Plant Physiology **145,** 1345-1360.

Park, J.-J., Jin, P., Yoon, J., Yang, J.-I., Jeong, H.J., Ranathunge, K., Schreiber, L., Franke, R., Lee, I.-J., and An, G. (2010). Mutation in Wilted Dwarf and Lethal 1 (WDL1) causes abnormal cuticle formation and rapid water loss in rice. Plant Molecular Biology **74,** 91-103.

Parsons, E.P., Popopvsky, S., Lohrey, G.T., Lü, S., Alkalai-Tuvia, S., Perzelan, Y., Paran, I., Fallik, E., and Jenks, M.A. (2012). Fruit cuticle lipid composition and fruit post-harvest water loss in an advanced backcross generation of pepper (Capsicum sp.). Physiol Plant **146,** 15-25.

Peters, J., Cnudde, F., and Gerats, T. (2003). Forward genetics and map-based cloning approaches. Trends in Plant Science **8,** 484-491.

Petracek, P.D., and Bukovac, M.J. (1995). Rheological Properties of Enzymatically Isolated Tomato Fruit Cuticle. Plant Physiol **109,** 675-679.

Petro-Turza, M. (1986). Flavor of tomato and tomato products (Food Reviews International), pp. 309-351.

Pfündel, E., Agati, G., and Cerovic, Z. (2006). Optical Properties of plant surfaces (Annual Plant Reviews: Blackwell Publishing), pp. 219-249.

Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L., and Samuels, A.L. (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. Science **306,** 702-704.

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

Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., and Davis, R.W. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from Arabidopsis pollen and disrupts cell signaling during fertilization. Genes Dev **7,** 974-985.

Procko, E., O'Mara, M., Bennett, W., Tieleman, D., and Gaudet, R.

(2009). The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. Faseb Journal **23,** 1287-1302.

Pruitt, R.E., Vielle-Calzada, J.P., Ploense, S.E., Grossniklaus, U., and Lolle, S.J. (2000). FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in Arabidopsis, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97,** 1311-1316.

Rafalski, A. (2002). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Curr Opin Plant Biol **5,** 94-100.

Rani, S.H., Krishna, T.H.A., Saha, S., Negi, A.S., and Rajasekharan, R. (2010). Defective in Cuticular Ridges (DCR) of Arabidopsis thaliana, a Gene Associated with Surface Cutin Formation, Encodes a Soluble Diacylglycerol Acyltransferase. Journal of Biological Chemistry **285,** 38337-38347.

Reina, J.J., Guerrero, C., and Heredia, A. (2007). Isolation, characterization, and localization of AgaSGNH cDNA: a new SGNH-motif plant hydrolase specific to Agave americana L. leaf epidermis. J Exp Bot **58,** 2717-2731.

Riederer, M., and Markstädter, C. (1996). Cuticular waxes : a critical assessment of current knowledge (Plant cuticles: BIOS scientific), pp. 189-200.

Riederer, M., and Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. J Exp Bot **52,** 2023-2032.

Robertson, L., and Labate, J. (2007). Genetic ressources of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) and wild relatives, M. Razdan and A. Mattoo, eds (Genetic improvment of Solanaceous Crops: Tomato Science), pp. 25-76.

Rothan, C., and Causse, M. (2007). Natural and artificially induced genetic variability in crop and model plant species for plant systems biology (EXS), pp. 21-53.

Roughan, P., and Slack, C. (1982). Cellular-organization of glycerolipid metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **33,** 97-132.

Roughan, P., Kagawa, T., and Beevers, H. (1980). On the light dependency of fatty-acid synthesis by isolated spinach-chloroplasts. Plant Science Letters **18,** 221-228.

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,** 28-38.

Rowland, O., Zheng, H., Hepworth, S.R., Lam, P., Jetter, R., and Kunst, L. (2006). CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in Arabidopsis. Plant Physiology **142,** 866-877.

Rozema, J., Staaij, J., Bjorn, L., and Caldwell, M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. (Trends in Ecology & Evolution), pp. 22-28.

Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers (Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology: Misener, S. & S.A. Krawetz), pp. 365-386.

Ruprecht, C., Mutwil, M., Saxe, F., Eder, M., Nikoloski, Z., and Persson, S. (2011). Large-scale co-expression approach to dissect secondary cell wall formation across plant species. Front Plant Sci **2,** 23.

Sahu, P., Puranik, S., Khan, M., and Prasad, M. (2012). Recent advances in tomato functional genomics: utilization of VIGS. Protoplasma **249,** 1017-1027.

Sakurai, N. (1998). Dynamic function and

regulation of apoplast in the plant body (Journal of Plant Research), pp. 133-148.

Saladié, M., Matas, A.J., Isaacson, T., Jenks, M.A., Goodwin, S.M., Niklas, K.J., Xiaolin, R., Labavitch, J.M., Shackel, K.A., Fernie, A.R., Lytovchenko, A., O'Neill, M.A., Watkins, C.B., and Rose, J.K. (2007). A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. Plant Physiol **144,** 1012-1028.

Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Barber, D., and Díaz-Perales, A. (2007). Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. Biochim Biophys Acta **1771,** 781-791.

Samuels, L., Kunst, L., and Jetter, R. (2008). Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. In Annual Review of Plant Biology (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 683-707.

Sarin, S., Prabhu, S., O'Meara, M., Pe'er, I., and Hobert, O. (2008). Caenorhabditis elegans mutant allele identification by whole-genome sequencing. Nature Methods **5,** 865-867.

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

Savaldi-Goldstein, S., Peto, C., and Chory, J. (2007). The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. Nature **446,** 199-202.

Schmidt, H., and Schönherr, J. (1982). Developement of plant cuticles : occurrence and role of non-ester bonds in cutin of *Clivia miniata* Reg. leaves (Planta), pp. 380-384.

Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A., Nielsen, K., Jorgensen, J., Weigel, D., and Andersen, S. (2009). SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. Nature Methods **6,** 550-551.

Schnurr, J., Shockey, J., and Browse, J. (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. Plant Cell **16,** 629-642.

Schnurr, J.A., Shockey, J.M., de Boer, G.J., and Browse, J.A. (2002). Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from Arabidopsis. Plant Physiol **129,** 1700-1709.

Schonherr, J., and Riederer, M. (1986). Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. Plant Cell and Environment **9,** 459-466.

Schopfer, P. (2006). Biomechanics of plant growth. Am J Bot **93,** 1415-1425.

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

Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Muller, C., and Metraux, J.P. (1996). Perception of free cutin monomers by plant cells. Plant Journal **10,** 331-341.

Sekhon, R.S., Briskine, R., Hirsch, C.N., Myers, C.L., Springer, N.M., Buell, C.R., de Leon, N., and Kaeppler, S.M. (2013). Maize gene atlas developed by RNA sequencing and comparative evaluation of transcriptomes based on RNA sequencing and microarrays. PLoS One **8,** e61005.

Seo, P.J., Lee, S.B., Suh, M.C., Park, M.-J., Go, Y.S., and Park, C.-M. (2011). The MYB96 Transcription Factor Regulates Cuticular Wax Biosynthesis under Drought Conditions in Arabidopsis. Plant Cell **23,** 1138-1152.

Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.Y., Lee, Y.N., Kim, S.G., Lee, Y.H.,

Park, W.J., and Park, C.M. (2009). The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. Plant Physiol **151,** 275-289.

Shepherd, T., and Wynne Griffiths, D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. New Phytol **171,** 469-499.

Shepherd, T., and Griffiths, D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. New Phytologist **171,** 469-499.

Shepherd, T., Robertson, G., Griffiths, D., Birch, A., and Duncan, G. (1995). Effects of environement on the composition of epicuticular wax from kale and swede. (Phytochemistry), pp. 407-417.

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 Genet **7,** e1001388.

Shi, J.X., Adato, A., Alkan, N., He, Y., Lashbrooke, J., Matas, A.J., Meir, S., Malitsky, S., Isaacson, T., Prusky, D., Leshkowitz, D., Schreiber, L., Granell, A.R., Widemann, E., Grausem, B., Pinot, F., Rose, J.K., Rogachev, I., Rothan, C., and Aharoni, A. (2013). The tomato SlSHINE3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. New Phytol **197,** 468-480.

Shirasawa, K., Isobe, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Fukuoka, H., Just, D., Rothan, C., Sasamoto, S., Fujishiro, T., Kishida, Y., Kohara, M., Tsuruoka, H., Wada, T., Nakamura, Y., Sato, S., and Tabata, S. (2010). SNP discovery and linkage map construction in cultivated tomato. DNA Res **17,** 381-391.

Shirasawa, K., Koilkonda, P., Aoki, K., Hirakawa, H., Tabata, S., Watanabe, M., Hasegawa, M., Kiyoshima, H., Suzuki, S., Kuwata, C., Naito, Y., Kuboyama, T., Nakaya, A., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kato, M., Kawashima, K., Kishida, Y., Kohara, M., Kurabayashi, A., Takahashi, C., Tsuruoka, H., Wada, T., and Isobe, S. (2012). In silico polymorphism analysis for the development of simple sequence repeat and transposon markers and construction of linkage map in cultivated peanut. BMC Plant Biol **12,** 80.

Shivaprasad, P., Dunn, R., Santos, B., Bassett, A., and Baulcombe, D. (2012). Extraordinary transgressive phenotypes of hybrid tomato are influenced by epigenetics and small silencing RNAs. Embo Journal **31,** 257-266.

Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P., Metraux, J.P., and Nawrath, C. (2000). Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. Plant Cell **12,** 721-737.

Sim, S., Durstewitz, G., Plieske, J., Wieseke, R., Ganal, M., Van Deynze, A., Hamilton, J., Buell, C., Causse, M., Wijeratne, S., and Francis, D. (2012). Development of a Large SNP Genotyping Array and Generation of High-Density Genetic Maps in Tomato. Plos One **7**.

Smirnova, A., Leide, J., and Riederer, M. (2013). Deficiency in a very-long-chain fatty acid β-ketoacyl-coenzyme a synthase of tomato impairs microgametogenesis and causes floral organ fusion. Plant Physiol **161,** 196-209.

Stark, R.E., Yan, B., Ray, A.K., Chen, Z., Fang, X., and Garbow, J.R. (2000). NMR studies of structure and

dynamics in fruit cuticle polyesters. Solid State Nucl Magn Reson **16,** 37-45.

Sticklen, M.B. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. Nat Rev Genet **9,** 433-443.

Suh, M.C., Samuels, A.L., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J., and Beisson, F. (2005). Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in Arabidopsis stem epidermis. Plant Physiol **139,** 1649-1665.

Szczesniak, A. (1983). Physical properties of foods (IFT-IUFoST).

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguez, P., Doerks, T., Stark, M., Muller, J., Bork, P., Jensen, L., and von Mering, C. (2011). The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. Nucleic Acids Research **39,** D561-D568.

Takada, S., Takada, N., and Yoshida, A. (2013). ATML1 promotes epidermal cell differentiation in Arabidopsis shoots. Development **140,** 1919-1923.

Taketa, S., Amano, S., Tsujino, Y., Sato, T., Saisho, D., Kakeda, K., Nomura, M., Suzuki, T., Matsumoto, T., Sato, K., Kanamori, H., Kawasaki, S., and Takeda, K. (2008). Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105,** 4062-4067.

Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M., and Machida, Y. (2004). A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in Arabidopsis. Plant Journal **37,** 139-146.

Tang, D., Simonich, M.T., and Innes, R.W. (2007). Mutations in LACS2, a long-chain acyl-coenzyme a synthetase, enhance susceptibility to avirulent Pseudomonas syringae but confer resistance to Botrytis cinerea in Arabidopsis. Plant Physiology **144,** 1093-1103.

Tapia, G., Morales-Quintana, L., Parra, C., Berbel, A., and Alcorta, M. (2013). Study of nsLTPs in Lotus japonicus genome reveal a specific epidermal cell member (LjLTP10) regulated by drought stress in aerial organs with a putative role in cutin formation. Plant Mol Biol **82,** 485-501.

Tegelaar, E., Kerp, H., Visscher, H., Schenck, P., and De Leeuw, J. (1991). Bias of paleobotanical record as a consequence of variations in the chemical composition of higher vascular plant cuticles (Paleobiology), pp. 133-144.

Till, B., Burtner, C., Comai, L., and Henikoff, S. (2004). Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. Nucleic Acids Research **32,** 2632-2641.

Till, B., Zerr, T., Bowers, E., Greene, E., Comai, L., and Henikoff, S. (2006). High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by Ecotilling. Nucleic Acids Research **34**.

Till, B., Reynolds, S., Greene, E., Codomo, C., Enns, L., Johnson, J., Burtner, C., Odden, A., Young, K., Taylor, N., Henikoff, J., Comai, L., and Henikoff, S. (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. Genome Research **13,** 524-530.

To, A., Joubes, J., Barthole, G., Lecureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L., and Baud, S. (2012). WRINKLED Transcription Factors Orchestrate Tissue-Specific Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in Arabidopsis. Plant Cell **24,** 5007-5023.

Trick, M., Adamski, N.M., Mugford, S.G., Jiang, C.C., Febrer, M., and Uauy, C. (2012). Combining SNP discovery from next-generation sequencing data with bulked segregant analysis (BSA) to fine-map genes in polyploid wheat. BMC Plant Biol **12,** 14.

Triques, K., Sturbois, B., Gallais, S., Dalmais, M., Chauvin, S., Clepet, C., Aubourg, S., Rameau, C., Caboche, M., and Bendahmane, A. (2007). Characterization of Arabidopsis thaliana mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. Plant Journal **51,** 1116-1125.

Tsai, H., Howell, T., Nitcher, R., Missirian, V., Watson, B., Ngo, K., Lieberman, M., Fass, J., Uauy, C., Tran, R., Khan, A., Filkov, V., Tai, T., Dubcovsky, J., and Comai, L. (2011). Discovery of Rare Mutations in Populations: TILLING by Sequencing. Plant Physiology **156,** 1257-1268.

Tsuba, M., Katagiri, C., Takeuchi, Y., Takada, Y., and Yamaoka, N. (2002). Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. (Physiological and Molecular Plant Pathology), pp. 51-57.

Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Doraiswamy, V., Bedair, M., Mittal, S., Chen, J., Nakashima, J., Tang, Y., Tadege, M., Ratet, P., Chen, R., Schultheiss, H., and Mysore, K.S. (2012). Loss of abaxial leaf epicuticular wax in Medicago truncatula irg1/palm1 mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. Plant Cell **24,** 353-370.

Varga, A., and Bruinsma, J. (1986). Tomato (Handbook of Fruit Set and Development: FCP Boca Raton), pp. 461-480.

Villena, J., Dominguez, E., and Heredia, A. (2000). Monitoring biopolymers present in plant cuticles by FT-IR spectroscopy (Journal of Plant Physiology), pp. 30-44.

Vioque, J., and Kolattukudy, P.E. (1997). Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from pea leaves (Pisum sativum L.). Arch Biochem Biophys **340,** 64-72.

Vogg, G., Fischer, S., Leide, J., Emmanuel, E., Jetter, R., Levy, A.A., and Riederer, M. (2004). Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. Journal of Experimental Botany **55,** 1401-1410.

Voisin, D., Nawrath, C., Kurdyukov, S., Franke, R.B., Reina-Pinto, J.J., Efremova, N., Will, I., Schreiber, L., and Yephremov, A. (2009). Dissection of the Complex Phenotype in Cuticular Mutants of Arabidopsis Reveals a Role of SERRATE as a Mediator. Plos Genetics **5**.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., and Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res **23,** 4407-4414.

Vriezen, W.H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J., and Mariani, C. (2008). Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. New Phytol **177,** 60-76.

Wahb-Allah, M.A., Alsadon, A.A., and Ibrahim, A.A. (2011). Drought Tolerance of Several Tomato Genotypes Under Greenhouse Conditions (World Applied Sciences Journal: IDOSI Publications), pp. 933-940.

Waltson, T. (1990). Waxes, cutin and suberin, J. Harwood and J. Boyer, eds (Lipids, membranes and aspects of photobiology: Academic Press),

pp. 105-158.

Wang, Z.Y., Xiong, L., Li, W., Zhu, J.K., and Zhu, J. (2011). The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. Plant Cell **23,** 1971-1984.

Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., and Yephremov, A. (2001). Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different robes of fatty acid omega-hydroxylation in development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98,** 9694-9699.

Weng, H., Molina, I., Shockey, J., and Browse, J. (2010). Organ fusion and defective cuticle function in a lacs1 lacs2 double mutant of Arabidopsis. Planta **231,** 1089-1100.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res **18,** 6531-6535.

Wu, R., Li, S., He, S., Wassmann, F., Yu, C., Qin, G., Schreiber, L., Qu, L., and Gu, H. (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.

Xiao, F.M., Goodwin, S.M., Xiao, Y.M., Sun, Z.Y., Baker, D., Tang, X.Y., Jenks, M.A., and Zhou, J.M. (2004). Arabidopsis CYP86A2 represses Pseudomonas syringae type III genes and is required for cuticle development. Embo Journal **23,** 2903-2913.

Yang, M., Yang, Q., Fu, T., and Zhou, Y. (2011). Overexpression of the Brassica napus BnLAS gene in Arabidopsis affects plant development and increases drought tolerance. Plant Cell Rep **30,** 373-388.

Yang, W., Simpson, J., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M., and Ohlrogge, J. (2012). A Land-Plant-Specific Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Family in Arabidopsis: Substrate Specificity, sn-2 Preference, and Evolution. Plant Physiology **160,** 638-652.

Yang, Z., Huang, D., Tang, W., Zheng, Y., Liang, K., Cutler, A., and Wu, W. (2013). Mapping of Quantitative Trait Loci Underlying Cold Tolerance in Rice Seedlings via High-Throughput Sequencing of Pooled Extremes. Plos One **8**.

Yazawa, T., Kawahigashi, H., Matsumoto, T., and Mizuno, H. (2013). Simultaneous transcriptome analysis of Sorghum and Bipolaris sorghicola by using RNA-seq in combination with de novo transcriptome assembly. PLoS One **8,** e62460.

Yeats, T.H., and Rose, J.K. (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). Protein Sci **17,** 191-198.

Yeats, T.H., and Rose, J.K. (2013). The formation and function of plant cuticles. Plant Physiol **163,** 5-20.

Yeats, T.H., Howe, K.J., Matas, A.J., Buda, G.J., Thannhauser, T.W., and Rose, J.K.C. (2010). Mining the surface proteome of tomato (Solanum lycopersicum) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. Journal of Experimental Botany **61,** 3759-3771.

Yeats, T.H., Buda, G.J., Wang, Z., Chehanovsky, N., Moyle, L.C., Jetter, R., Schaffer, A.A., and Rose, J.K. (2012). The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. Plant J **69,** 655-666.

Yelle, S., Hewitt, J.D., Robinson, N.L., Damon, S., and Bennett, A.B. (1988). Sink Metabolism in Tomato Fruit : III. Analysis of Carbohydrate Assimilation in a Wild Species. Plant Physiol **87,** 737-740.

Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K., and Saedler, H. (1999). Characterization of the FIDDLEHEAD gene of Arabidopsis reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. Plant Cell **11,** 2187-2201.

Zamir, D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. Nat Rev Genet **2,** 983-989.

Zeng, Z., Kao, C., and Basten, C. (1999). Estimating the genetic architecture of quantitative traits. Genetical Research **74,** 279-289.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., and Anderson, T.A. (2006). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. Dev Biol **289,** 3-16.

Zhang, J.Y., Broeckling, C.D., Blancaflor, E.B., Sledge, M.K., Sumner, L.W., and Wang, Z.Y. (2005). Overexpression of WXP1, a putative Medicago truncatula AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (Medicago sativa). Plant J **42,** 689-707.

Zhang, W., Lorence, A., Gruszewski, H.A., Chevone, B.I., and Nessler, C.L. (2009). AMR1, an Arabidopsis gene that coordinately and negatively regulates the mannose/l-galactose ascorbic acid biosynthetic pathway. Plant Physiol **150,** 942-950.

Zhao, L., Katavic, V., Li, F., Haughn, G.W., and Kunst, L. (2010). Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in Arabidopsis seed oil biosynthesis. Plant J **64,** 1048-1058.

Zheng, H.Q., Rowland, O., and 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.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics **20,** 176-183.

Résumé

La cuticule, une matrice lipidique extracellulaire constituée de cires et d'un squelette de cutine, est la barrière de défense la plus externe des plantes face à leur environnement. Elle intervient dans de nombreuses propriétés agronomiques comme la conservation post récolte, les propriétés mécaniques ou bien l'aspect du fruit, dont la brillance. Afin d'isoler des mutants de cuticule, le criblage d'une collection de mutants EMS de tomate a été entrepris, en se basant sur la brillance des fruits, conduisant à la sélection de 24 mutants. Chez ceux-ci, des analyses biochimiques ont montré de fortes variations de charge et de composition de la cuticule, notamment chez les mutants de cutine. La caractérisation de 4 mutants remarquables a été entreprise afin d'identifier les mutations responsables des phénotypes de brillance. Le mutant le plus affecté, présentant une charge en cutine réduite de 85% par rapport au type sauvage, a révélé une mutation du gène *SlGDSL2* codant pour une acylhydrolase à motif GDSL, responsable de la polymérisation de la cutine. Afin d'étudier la formation et la régulation de la cutine, la suite du travail a consisté à obtenir et à caractériser des simples et des doubles mutants affectés dans la synthèse des monomères de cutine, le transport apoplastique et la polymérisation de la cutine.

Mots clés : tomate, mutants, EMS, brillance, cuticule, cutine, GDSL

Abstract

The cuticle, an extracellular lipid matrix consisting of waxes and of a cutin skeleton is the outermost plants protection barrier against their environment. The cuticle is involved in many agronomic traits such as post-harvest storage, biomechanical or fruit appearance properties like surface brightness. In order to isolate cuticle mutants, the screening of an EMS tomato mutants collection has been undertaken, based on fruit brightness, leading to the selection of 24 mutants. Biochemical analyzes have shown wide variations in cuticle loads and compositions, especially in cutin mutants. The characterization of 4 remarkable mutants was undertaken to identify the mutations responsible for brightness phenotypes. The most affected mutant shows a cutin load reduced by 85% compared to the wild type, and is due to a mutation in the *SlGDSL2* gene, encoding a GDSL-motive acylhydrolase enzyme, responsible for the cutin polymerization. In order to further study the cutin formation and regulation, the next work was to obtain and characterize single and double mutants affected in cutin monomer synthesis, apoplastic transport and cutin polymerization.

Keywords : tomato, mutants, EMS, brightness, cuticle, cutin, GDSL