UNIVERSITÉ DE ROUEN
U.F.R. des SCIENCES ET TECHNIQUES

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Biologie / Spécialité : Sciences végétales

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Rouen
EdNBISE 497

École doctorale Normande - Biologie Intégrative Santé Environnement
Soutenue le 24 octobre 2011 par

Flavien DARDELLE

Étude des mécanismes d'adhésion des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana* par une approche de génétique chimique

Jury :

M^me^ Sílvia COIMBRA	Professeur, Université de Porto, Portugal	Rapporteur
M Marc LAHAYE	Directeur de Recherche, Inra, Nantes, France	Rapporteur
M Simon HAWKINS	Professeur, Université de Lille, France	Examinateur
M Patrice LEROUGE	Professeur, Université de Rouen, France	Examinateur
M Jean-Claude MOLLET	Professeur, Université de Rouen, France	Directeur de thèse
M Azeddine DRIOUICH	Professeur, Université de Rouen, France	Co-directeur de thèse

Thèse préparée au sein du laboratoire EA4358
Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ces travaux de thèse. C'est un honneur de vous avoir comme évaluateurs. En espérant bientôt pouvoir être considéré comme l'un de vos pairs…

Tant de remerciements sont à adresser … Par avance, veuillez excusez celles et ceux que j'aurais éventuellement oubliés. Essayons d'établir ces remerciements par ordre chronologique.

Mon histoire est somme toute assez simple. Je dois mon envie d'intégrer ce laboratoire au Dr Bardor (Mumu) et au Pr Lerouge, enchanté par leurs cours. C'est aujourd'hui un plaisir de vous savoir mes futurs chefs ! Merci.

Puis, mon arrivée au laboratoire s'est concrétisée grâce aux Pr Driouich et Dr Vicré-Gibouin. Vous m'avez tous deux accordé votre confiance en me prenant en stage de M1 et avez récidivé pour le M2. Mon entrée dans le domaine de la recherche, c'est grâce à vous. Merci.

J'en profite alors pour remercier les dinosaures de la fac. Ces anciens doctorants que j'ai pu côtoyer avant qu'ils ne quittent le labo. Vous m'avez fournis beaucoup de conseils tout en facilitant mon intégration. Ajoutez à cela de très bons moments extra-labo et je vous offre ma gratitude. Merci à la Kro, Max, Bubu, SoL et SoA.

Ensuite m'est venue l'idée de faire une thèse. Merci aux chefs de vous être battus pour me trouver un financement. Je sais à quel point ce n'est pas évident. Ainsi, Jean-Claude et Azeddine, vous avez décidé de me prendre sous votre conjointe direction :

Jean-Claude : C'est un véritable honneur de vous avoir eu comme directeur de thèse ! Vos conseils avisés, votre simplicité et vos connaissances font de vous un Professeur hors pair ! Je souhaite réellement à tous les thésards d'avoir comme directeur de thèse quelqu'un comme vous. Du fond du cœur, merci. (PS : je ne désespère pas de savoir, un jour, écrire comme vous le faites !)

Azeddine : J'ai pris énormément de plaisir dans ce laboratoire que vous co-dirigez. Nos nombreuses discussions au cours de ces cinq dernières années m'ont beaucoup appris et m'ont fait progresser, tant d'un point de vue humain que professionnel. Que cela dure encore ! En attendant, merci.

Ces dernières années ne se seraient bien évidemment pas bien déroulées sans les fous-fous du laboratoire ! Permettez-moi d'exprimer pour chacun d'entre vous un petit mot…

A Romanou : Mon coach sportif ! A cause de toi j'ai souffert ! J'ai découvert des muscles que les physiologistes ignoraient alors ! Tant de bons moments passés en ta compagnie (votre, car il faut inclure Gwen…). Que cela continue !

A Marc-Toinou : Et dire que tu as été mon premier encadrant à la paillasse… Ravi de rempiler te sachant toujours dans l'équipe ! Durant cette thèse tu es sans doute la personne qui m'a fait le plus rire ! Surtout, garde ton humour !

A Bébé : Tant de discussions ! Ton franc-parler et tes idées m'ont toujours fait réfléchir. C'est avec joie que je continuerai.

A Nonome : Cela fait toujours plaisir de suivre la vie de quelqu'un, de ces études à sa vie active. En 8 ans, on peut dire qu'il y en aura eu, des rebondissements ! Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Coco et bébé !

A Pepe : Pronto mon partenaire bureau ! Discret. Sympathique. Drôle. Autant d'adjectifs agréables pour te définir ! Merci pour toutes ces années mon Italien ! Grâce à toi, soleil assuré en Normandie !

A Barbie : Quel surnom ! Surtout reste à l'antipode de la bimbo !!

A Aly : Bijour ! Je te souhaite plein de bonnes choses mon ami ! Tu pourras toujours compter sur moi ! Merci pour ta continuelle bonne humeur.

A Yas : Je persiste et signe, tu constitues avec Pepe le couple de Nip/Tuck. Troy n'a qu'à bien se tenir lorsque McNamara la menace prédatrice arrive ! Courage pour la suite !

Aux plus jeunes : Je serai bref. Allez sur Google, onglet vidéo. Tapez « Nelson ». C'est le premier lien !

Parce qu'un laboratoire ne peut tourner sans une personne référentielle, je remercie pour ce poste Dame Carole ! Outre pour tous les cafés préparés par tes soins, je te remercie pour tes mots gentils et ton aide systématique quand on en a besoin !

Merci à toute l'équipe en fait ! Tous disponibles et sympathiques. Vous n'aurez pas réussi à me faire fuir…

Parce qu'une thèse se constitue de hauts et de bas, le système exploite :

① La fratrie ! Merci donc à mon frère et ma belle-sœur (Cycy & Nat'). Désolé de vous avoir fait subir mes déprimes passagères. Vous avez toujours su, vous et vos 2 bouts de choux, me remonter le moral.

Merci à mes 2 petites sœurs : dommage que vous soyez si loin ! Cela ne m'empêchera pas d'être toujours là pour vous. En attendant, un 'tit conseil : réfléchissez bien avant de vous lancer dans des études longues !

② Les amis ! Merci à Tomtom & Fanny. Toune. Chlarles et Mél. Meryem et Nico. Jo et Virginie. Dédé et J.. Merci de m'avoir sorti… Et j'en ai souvent eu besoin !!!

Merci à ma famille, grands-parents, oncles, tantes, cousins et cousines pour vos encouragements. Je n'ai eu que trop peu de temps ces dernières années pour vous voir. Mais cela va changer !

J'aurai aimé ne pas faire mon Tanguy. Pourtant, pourquoi faire compliqué quand on peut faire simple ?! Je t'aime Papa. Je t'aime Maman. MERCI … POUR TOUT !

Ces derniers mots iront bien évidemment à … mon chat ! Non je plaisante ! Merci à ma « tendre » moitié. Merci de m'accepter aussi énervant que je suis. Merci de me rassurer lorsque tout va mal. Merci d'être là. Le gros chantier perso de la thèse est terminé. Quand établira-t-on le prochain projet à deux ?

Liste des abréviations

AC : cellules antipodales
AG : arabinogalactane
AGP : arabinogalactane protéine
AIR : alcohol insoluble residue – résidu pariétal insoluble à l'alcool
Ala : alanine
Ara : arabinose
AXyG : arabinoxyloglucane
BSA : bovine serum albumine – sérum albumine bovin
CAZYmes : carbohydrate-active enzymes
CC : cellule centrale
CESA : cellulose synthase
Dha : acide 3-deoxy-D-lyxo-heptulosarique
EC : oosphère
EPG : *endo*-polygalacturonase
Ex : exine
fgXyG : fuco-galacto-xyloglucane
FID : détecteur à ionisation de flamme
FITC : fluorescéine isothiocyanate
FLA : fasciclin-like arabinogalactan - arabinogalactane protéine à domaine fascicline
Fuc : fucose
GABA : acide gamma aminobutyrique
Gal : galactose
GalA : acide galacturonique
GAX : glucuronoarabinoxylane
GC : gaz chromatography – chromatographie en phase gazeuse
GDP : guanosine diphosphate
Glc : glucose
GlcA : acide glucuronique
GPI : glycosylphosphatidylinositol
HG : homogalacturonane
HMDS : hexamethyldisilazane
HPF : high pressure freezing – congélation haute pression
HRGP : hydroxyprolin rich protein – protéine riche en hydroxyproline
HTS : high throughput screening – criblage à haut débit
Hyp : hydroxyproline
ICBG : international cooperative biodiversity groups
Kdo : acide 2-céto-3-déoxy-D-manno-octulosonique
LTP : lipid transfer protein – protéine de transport lipidique
Lys : lysine
MALDI : matrix-assisted laser desorption/ionization – desorption/ionisation laser assitée par matrice
Man : mannose
MEB : microscope électronique à balayage
MET : microscope électronique à transmission
MG : milieu de germination

OLIMP : oligosaccharide mass profiling – profil des oligosaccharides par leurs masses
Ov : ovule
P : papille
Pc : manteau pollinique
PCP : pollen coat proteins – protéine de manteau pollinique
PG : grain de pollen
PME : pectines méthylestérases
PN : noyaux polaires
Po : pollen
PR : pathogenesis-related protein – protéines de défense
Pro : proline
PT : tube pollinique
RG I/II : rhamnogalacturonane I/II
Rha : rhamnose
SAR : structure-activity relationship – relation structure-activité
SC : synergide
SCA : stigma/style cystein rich adhesin
SCR : S-locus cystein rich
Ser : serine
S/N : signal /noise – signa / bruit
TBS : tris buffer saline – tampon tris salin
Thr : thréonine
TOF : time of flight – temps de vol
TTE : tissu de transmission
Tyr : tyrosine
UDP : uridine diphosphate
UV : ultra-violet
Val : valine
XGA : xylogalacturonane
XyG : xyloglucane
Xyl : xylose

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de reproduction sexuée des Angiospermes 1
Figure 2 : Anatomie d'une fleur 2
Figure 3 : Représentation schématique d'un style plein chez Arabidopsis (a) et creux chez le lys (b)..... 3
Figure 4 : Principales étapes permettant la formation des différentes cellules du sac embryonnaire..... 4
Figure 5 : Principales étapes aboutissant à la formation du pollen mature chez les Angiospermes 5
Figure 6 : Représentation schématique (A) d'un tube pollinique en croissance et (B) coloration des tubes polliniques par le bleu d'aniline mettant en évidence les bouchons de callose..... 7
Figure 7 : Coupe transversale de la partie ovarienne du pistil d'*Arabidopsis thaliana.* 10
Figure 8 : Structure des monosaccharides en conformation « Haworth » composant les principaux polymères pariétaux..... 13
Figure 9 : Représentation schématique de la paroi primaire d'une cellule végétale. 14
Figure 10 : Modélisation d'un motif de cellobiose 15
Figure 11 : De la synthèse d'une chaine β-(1→4)-glucane à la formation de la microfibrille de cellulose. 15
Figure 12 : Arbre phylogénétique représentant les xyloglucanes majoritaires trouvés dans les différents Ordres de la classification des végétaux. 18
Figure 13 : Composition d'un fragment xyloglucane XXFG et des principales enzymes impliquées dans sa biosynthèse. 20
Figure 14 : Représentation schématique de la structure « boite à œuf ». 21
Figure 15 : Légende des encarts présentés pour les HG, les RG (I et II) et les XGA. 22
Figure 16 : Modèle de la biosynthèse des pectines dans l'appareil de Golgi..... 23
Figure 17 : Les étapes de la biosynthèse des arabinogalactanes protéines. 25
Figure 18 : Micrographie électronique à transmission montrant la formation du pied d'attachement entre un grain de pollen d'Arabidopsis et une papille stigmatique..... 37
Figure 19 : Modèle d'interaction possible entre les protéines SCA et les pectines faiblement méthylestérifiées conduisant à l'adhésion des tubes polliniques sur le tissu de transmission. ... 39
Figure 20 : Comparaison entre les méthodes de génétique fonctionnelle classique et génétique chimique. 41
Figure 21 : Illustration des approches directes et inverses en génétique chimique. 42
Figure 22 : Présentation des différents processus *Hit-to-lead* utilisés afin d'améliorer les affinités d'une molécule d'intérêt..... 46
Figure 23 : Schéma illustrant l'étiquetage d'une molécule via la "*Click Chemistry*" 47
Figure 24 : Localisation des épitopes associés aux xylogalacturonanes par l'anticorps LM8 dans le pistil d'*Arabidopsis thaliana* avant pollinisation. 85
Figure 25 : Estimation (A) du nombre de grains de pollen collecté en fonction du nombre de fleurs utilisées et (B) mesure du taux de germination selon la densité de pollen cultivé. 117
Figure 26 : Influence de la concentration en DMSO sur le taux de germination des grains de pollen. 118

Figure 27 : Schéma illustrant la répartition des différentes molécules dans les plaques 96-puits. 119
Figure 28 : Propriétés d'émission des molécules de la chimiothèque sous lumière visible et ultra-violet. 120
Figure 29 : Zone prise en compte dans le puits lors de l'examen de l'adhésion des tubes polliniques d'Arabidopsis..... 121
Figure 30 : Test d'adhésion des tubes polliniques d'Arabidopsis sur une matrice pectique extraite de fleurs avec l'imidazole. 122
Figure 31 : Observation après rinçage de l'adhésion des tubes polliniques selon différentes concentrations de matrices. 122
Figure 32 : Photographies illustrant l'adhésion des tubes polliniques d'Arabidopsis sur des extraits pectiques isolés à partir de fleurs et de feuilles avec l'imidazole et l'oxalate d'ammonium. 123
Figure 33 : Composition en monosaccharides des matrices pectiques (A) de fleurs et de feuilles (B) extraites avec l'imidazole. 125
Figure 34 : Composition en monosaccharides de (A) l'extrait de feuilles isolé par l'oxalate d'ammonium et (B) du résidu hémicellulose/cellulose. 126
Figure 35 : Immuno-dot-blot des différentes matrices d'adhésion. 127
Figure 36 : Phénotypes mis en évidence lors du criblage primaire. 129
Figure 37 : Phénotypes induits après 6h de culture en présence de la molécule II-G2. 130
Figure 38 : Impact du composé I-G2 sur l'adhésion des tubes polliniques. 131
Figure 39 : Effet de la concentration des molécules sur la germination des grains de pollen..... 133
Figure 40 : Influence de la concentration des molécules sur la longueur des tubes polliniques. 134
Figure 41 : Effet de la molécule I-E3 à 20 µM sur la morphologie des tubes polliniques. 136
Figure 42 : Effet dose-réponse des molécules sur l'adhésion des tubes polliniques..... 137
Figure 43 : Structures des molécules perturbant l'adhésion. 138

Liste des tableaux

Tableau 1 : Détail des structures connues des chaines latérales du xyloglucane..... 17
Tableau 2 : Comparaison entre les approches directes et inverses en génétiques classique ou chimique. 41
Tableau 3 : Liste des anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes pariétaux..... 54
Tableau 4 : Volumes appliqués par puits pour déterminer le taux de germination..... 62
Tableau 5 : Volumes appliqués par puits pour étudier l'influence du DMSO 62
Tableau 6 : Volumes appliqués par puits lors des criblages secondaires des molécules pour étudier l'effet dose-réponse 64
Tableau 7 : Rendement d'adhésion des tubes polliniques selon l'origine des extraits pariétaux. 124
Tableau 8 : Récapitulatif des 18 molécules sélectionnées pour le criblage secondaire..... 132

Liste des gènes et mutants cités

La dénomination des mutants cités dans ce manuscrit réfère à la nomenclature de Meinke et Koornneef, 1997.

Désignation	N° gène	Autre dénomination
AGP11	at3g01700	
AGP17	at2g23130	
AGP6	at5g14380	
CALS5	at2g13680	callose synthase 5
CKS	at1g53000	cmp-kdo synthetase
CNR		colourless non ripening
CSLD1	at2g33100	cellulose-synthase like d1
CSLD4	at4g38190	cellulose-synthase like d4
EMB30	at1g13980	embryo defective 30
EPC1	at3g55830	ectopically parting cells 1
FERONIA	at3g51550	
GME	at5g28840	gdp-d-mannose 3',5'-epimerase
KOR	at5g49720	korrigan
LRX1	at1g12040	leucine-rich repeat/extensin 1
LTP5	at3g51600	lipid transfer protein 5
MGP4	at4g01220	male gametophyte defective 4
MUR1	at3g51160	
MUR2 / FUT1	at2g03220	
MUR3	at2g20370	
NaTTS		*Nicotiana tabacum* transmitting tract-specific
NOLAC-H14		non-organogenic callus with loosely attached cells14
NOLAC-H18		non-organogenic callus with loosely attached cells18
NTT	at3g57670	no transmitting tract
PEX1		pollen extensin-like 1
POP2		pollen-pistil-interaction 2
QUA1 / GAUT8	at3g25140	quasimodo 1
REB1-1	at1g64440	UDP-glucose 4-epimerase
RGP1	at3g02230	reversibly glycosylated polypeptide 1
RGP2	at5g15650	reversibly glycosylated polypeptide 2
SETH1	at2g34980	
SETH2	at3g45100	
SIR1	at5g55130	sirtinol resistant 1
SlPRALF		*Solanum lyco persicum* pollen rapid alkalinization factors
SOS5	at3g46550	salt overly sensitive 5
TSD2	at1g78240	tumorous shoot development 2
VANGUARD	at2g47040	
XEG113	at2g35610	xyloglucanase 113
XXT1 / AtXT1	at3g62720	xylosyltransférase 1
XXT2 / AtXT2	at4g02500	xylosyltransférase 2
XXT5	at1g74380	xylosyltransférase 5
ZmEA1		*Zea mays* egg apparatus 1

Table des matières

Remerciements i
Liste des abréviations iv
Liste des figures vi
Liste des tableaux viii
Liste des gènes et mutants cités ix
Table des matières x
Avant-propos xiv
Introduction 1
1. La reproduction sexuée des Angiospermes 1
1.1. Anatomie de la fleur 2
1.2. Formation des gamétophytes 3
1.2.1. La formation des ovules 3
1.2.2. La formation du pollen 4
1.2.3. Les étapes de la reproduction sexuée 6
1.2.3.1. La pollinisation 6
1.2.3.2. La phase progamique 6
1.2.3.3. La phase syngamique 8
1.3. La culture *in vitro* des tubes polliniques 9
1.4. Le partenaire femelle 10
2. La paroi primaire végétale 12
2.1. Composition de la paroi primaire 12
2.1.1. Les β-glucanes 14
2.1.1.1. La cellulose 15
2.1.1.2. La callose 16
2.1.2. Les hémicelluloses 16
2.1.2.1. La structure des xyloglucanes 17
2.1.2.2. La biosynthèse des xyloglucanes 19
2.1.3. Les pectines 20
2.1.4. Les glycoprotéines pariétales 23
2.2. Fonctions attribuées aux polysaccharides pariétaux 25
2.2.1. Les β-glucanes 26
2.2.2. Le xyloglucane 27

2.2.3. Les pectines 28
2.2.4. Les glycoprotéines pariétales 29
2.3. La paroi des tubes polliniques 30
2.3.1. Les β-glucanes 30
2.3.2. Les hémicelluloses 31
2.3.3. Les pectines 31
2.3.4. Les glycoprotéines pariétales 32
3. L'adhésion cellulaire 33
3.1. Adhésion au niveau des jonctions cellulaires 34
3.1.1. Implication des pectines dans l'adhésion cellulaire 34
3.1.2. Autres molécules pariétales impliquées dans l'adhésion 36
3.2. Adhésion cellulaire au cours de la reproduction sexuée 36
3.2.1. Adhésion grain de pollen-stigmate 36
3.2.2. Adhésion des tubes polliniques 38
4. La génétique chimique 40
4.1. Principe 40
4.2. Méthodologie 40
4.3. Les outils de la génétique chimique 43
4.3.1. La librairie de produits 43
4.3.2. Evaluation du test biologique 44
4.3.3. Les principales étapes du crible 45
4.3.4. La pharmacomodulation et l'étiquetage des produits 45
4.3.5. La Bioinformatique et les bases de données 47
4.4. Avantages/inconvénients 48
4.5. Application de la génétique chimique aux plantes 49
Objectifs du sujet de recherche 51
Matériel et Méthodes 52
1. Matériel Végétal 52
2. Récolte et culture *in vitro* du pollen en milieu liquide 53
3. Méthodes de microscopie 53
3.1. Immunolocalisation et Microscopie à épifluorescence 53
3.2. Microscopie électronique à transmission (MET) 55
3.3. Microscopie électronique à balayage (MEB) 57
4. Méthodes générales de biochimie 57
4.1. Extraction pariétale 57

4.2. Analyse des monosaccharides 58
4.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (GC) 58
4.2.2 Analyse des liaisons après dérivation des sucres en acétates d'alditols partiellement méthylés 59
4.3 Analyse du XyG par Spectrométrie de masse MALDI-TOF 60
4.4 Dot blot 61
5 Méthodes de génétique chimique 61
Résultats 65
1. Caractérisation des matrices extracellulaires du gamétophyte mâle et du tissu de transmission femelle 65
1.1. Article 1 : Caractérisation polysaccharidique de la matrice extracellulaire des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana* 65
1.2. Article 2 : Localisation des pectines dans la paroi des tubes polliniques et du tissu de transmission d'*Arabidopsis thaliana* 85
1.3. Article 3 : Caractérisation des xyloglucanes chez les Solanacées 91
2. Etude de l'adhésion cellulaire des tubes polliniques par une approche de génétique chimique 117
2.1. Tests de germination *in vitro* 117
2.1.1. Influence de la densité de grains de pollen en culture sur la germination 117
2.1.2. Influence du DMSO sur la germination des grains de pollen 118
2.2. Préparation de la chimiothèque 119
2.3. Mise en place de la matrice artificielle d'adhésion 120
2.3.1. Optimisation de la matrice d'adhésion 121
2.3.2. Caractérisation de la matrice 125
2.3.2.1. Composition monosaccharidique 125
2.3.2.2. Immuno-réactivité des extraits par dot blot 127
2.4. Le criblage de la chimiothèque 128
2.4.1. Criblage primaire 128
2.4.2. Criblage secondaire : cibler les « *hits* » et effet dose-réponse 132
2.4.2.1. Effet sur la germination des grains de pollen 133
2.4.2.2. Molécules perturbant la croissance des tubes polliniques 134
2.4.2.3. Hits influençant le phénotype des tubes polliniques 135
2.4.2.4. Effet des molécules sur l'adhésion des tubes polliniques 136

Discussion 139
1. Parois et reproduction sexuée 139
1.1. Le tube pollinique 139
1.2. Le tissu de transmission 141
2. Adhésion des tubes polliniques et perturbation par une approche de génétique chimique 142
2.1. La matrice d'adhésion 142
Des matrices enrichies en polysaccharides pectiques permettent l'adhésion 142
Les matrices adhésives sont riches en pectines HG et RG-I 142
Implication des motifs pectiques dans l'adhésion des tubes polliniques 144
Autres partenaires ? 145
2.2. Adhésion et génétique chimique 146
2.2.1. Actions non attendues de molécules 146
2.2.2. Molécules impliquées dans l'adhésion des tubes polliniques 149
Conclusions et perspectives 150
Références bibliographiques 152
Annexes 175

Avant-propos

Le manuscrit, composé de cinq chapitres, est articulé de la manière suivante :

Le premier chapitre d'introduction regroupe les données récentes sur (1) le développement des grains de pollen, la croissance des tubes polliniques et les interactions avec les tissus femelles, (2) la composition et la biosynthèse de la paroi primaire des cellules végétatives et des tubes polliniques, (3) l'adhésion cellulaire chez les végétaux et finalement (4) l'approche de génétique chimique, utilisée au cours de mes travaux.

Après avoir défini les objectifs de la thèse, le second chapitre récapitule l'ensemble des méthodes et équipements utilisés au cours de ces travaux de thèse. Les protocoles y sont également détaillés.

Le troisième chapitre aborde les résultats obtenus et se divise en deux parties. La première, rédigée sous forme d'articles, regroupe les données de caractérisation des parois du gamétophyte mâle et des tissus femelles. La deuxième partie englobe les résultats qui n'ont pas encore fait l'objet de publications concernant la génétique chimique.

La quatrième partie, la discussion, se compose i) de compléments d'informations à propos des articles publiés et ii) de l'interprétation des résultats obtenus pour les expérimentations sur la génétique chimique.

Enfin, le cinquième chapitre conclut l'ensemble des travaux effectués durant la thèse tout en se projetant dans l'avenir puisque les perspectives futures y sont présentées.

L'ensemble des références bibliographiques suit cet ultime chapitre avant de clore ce manuscrit par les annexes. Celles-ci se composent d'un *Curriculum Vitae*, ainsi que d'un récapitulatif des résultats de recherche valorisés (Articles et communications orales ou par affiches).

Introduction

1. La reproduction sexuée des Angiospermes

La reproduction sexuée est une des étapes clés du cycle de développement des plantes (Figure 1). En effet, celle-ci aboutit à la production de graines qui permettent de pérenniser l'espèce. De plus, les graines et les fruits représentent une part importante de la nutrition humaine. Malgré cette importance, les mécanismes permettant le contrôle spatio-temporel de la reproduction sont encore mal connus, surtout que ceux-ci sont fortement tributaires de nombreux facteurs environnementaux.

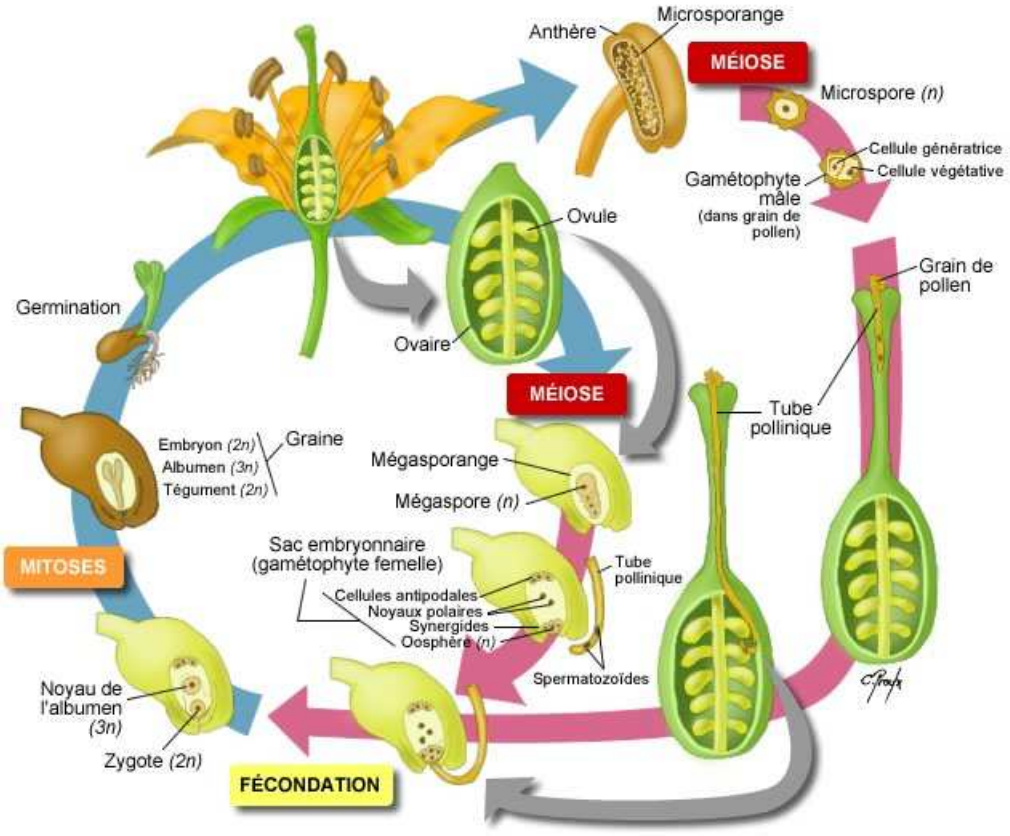


Figure 1 : Cycle de reproduction sexuée des Angiospermes

(http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/images/reproduction/Cycle-Angio.jpg)

1.1. Anatomie de la fleur

Les organes mâles ou étamines sont constitués d'un filet surmonté d'une anthère dans laquelle les grains de pollen seront formés. Les organes femelles se composent le plus souvent de trois pièces formant le pistil (ou gynécée) : un stigmate, zone de réception du pollen, un style plus ou moins développé et une partie ovarienne contenant les ovules (Figure 2). Ces pièces fertiles sont protégées par les pétales et sépales.

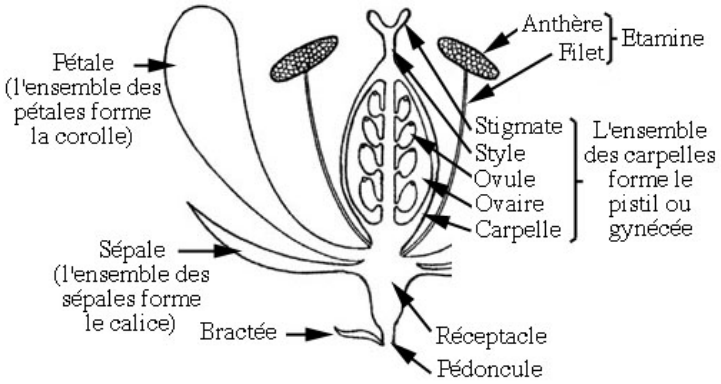


Figure 2 : Anatomie d'une fleur

(http://www.afblum.be/bioafb/cyclangi/fleur.JPG)

Selon les espèces, les stigmates et les styles peuvent être subdivisés en plusieurs catégories selon leurs structures (Heslop-Harrison et shivanna, 1977 ; Edlund *et al.*, 2004 ; Quiapim *et al.*, 2009 ; Allen *et al.*, 2010) :

- **les stigmates secs** sont, entre autres, trouvés chez Arabidopsis (arabette) et possèdent à la surface des papilles une fine pellicule hydratée de protéines, de glycoprotéines et de lipides.
- **les stigmates humides** sécrètent, à leurs surfaces souvent lisses, une abondante quantité d'exsudats lipophiles ou hydrophiles riches en sucre. Cet exsudat joue un rôle prépondérant pour diriger le tube pollinique en croissance (Goldman *et al.*, 1994 ; Mollet *et al.*, 2007). La tomate et le tabac possèdent ce type de stigmate.
- **les stigmates semi-secs** représentent un stade intermédiaire entre les stigmates secs et humides. Une cuticule protéique recouvre les apex papillaires tandis que la base des papilles est entourée d'exsudats extracellulaires. Ce type de stigmate est commun à l'ensemble de la grande famille des Asteraceae (Allen et Hiscock, 2008).

– **Les styles creux** (Figure 3) sont constitués d'un canal bordé par l'épiderme du tissu de transmission secrétant un exsudat ayant un rôle nutritif, de guidage et d'adhésion pour les tubes polliniques comme chez le lys (Mollet *et al.*, 2000 ; Lord, 2001).
– D'autres plantes comme la tomate, le tabac et l'arabette possèdent **un style plein** (Figure 3) constitué de cellules spécialisées formant le tissu de transmission dans lequel les tubes polliniques se développent de manière intrusive (Lord 2000).

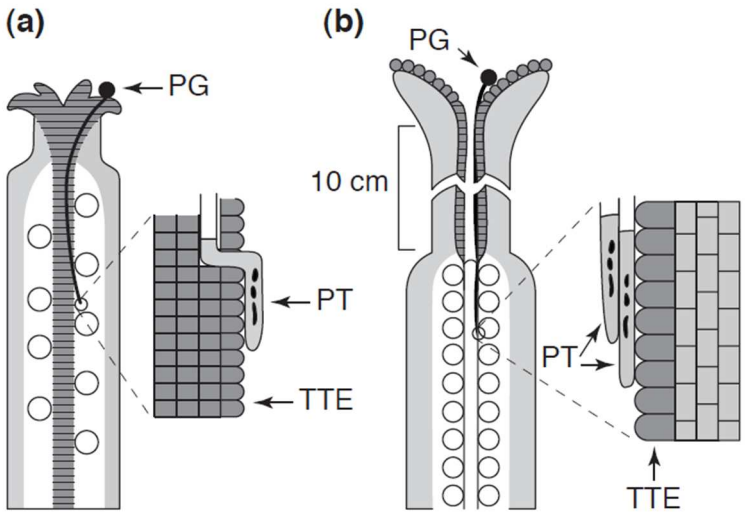


Figure 3 : Représentation schématique d'un style plein chez Arabidopsis (a) et creux chez le lys (b).

PG : Grain de pollen ; PT : Tube pollinique ; TTE : Tissu de transmission

(Lord, 2000)

1.2. Formation des gamétophytes

1.2.1. La formation des ovules

La gamétogenèse femelle est une succession d'étapes ayant lieu dans la partie ovarienne de la plante (Figure 4). Le mégasporocyte, cellule initiale, subit une division méiotique aboutissant à la formation de quatre cellules haploïdes. Sur l'ensemble de ces cellules, trois vont dégénérer. La quatrième cellule, la mégaspore, va subir trois mitoses successives et produire le gamétophyte femelle encore appelé le sac embryonnaire. Au final, cette structure contient 8 noyaux répartis dans 7 cellules : 3 cellules antipodales ;

2 synergides ; 1 cellule centrale à 2 noyaux et un oosphère (Bewley *et al.*, 2000 ; Yadegari et Drews, 2004 ; Boavida *et al.*, 2005).

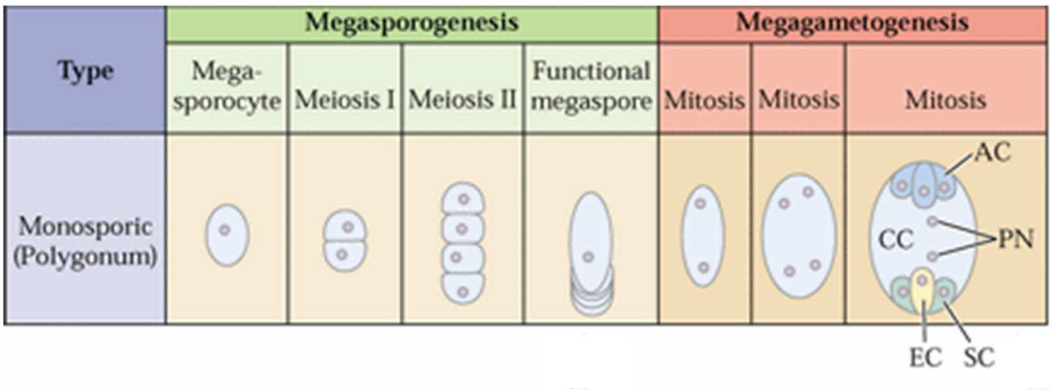


Figure 4 : Principales étapes permettant la formation des différentes cellules du sac embryonnaire.

EC : oosphère, SC : synergides, CC : cellule centrale, PN : Noyaux polaires, AC : cellules antipodales

(Bewley et al., 2000)

1.2.2. La formation du pollen

La gamétogenèse mâle se déroule dans les anthères où le pollen va subir différentes étapes de maturation (Figure 5). Celle-ci démarre par une méiose de la cellule mère aboutissant à la formation d'une tétrade. Sous l'action conjointe d'enzymes comme des pectines méthylestérases (PME) (Francis *et al.*, 2006), des polygalacturonases (Rhee *et al.*, 2003) et des glucanases (Hird *et al.*, 1993) issues du tapis staminal, la paroi de la tétrade est dégradée afin de libérer les microspores. Il s'en suit une première mitose asymétrique dépendant du réseau de microtubules qui aboutit à la formation de la cellule génératrice qui formera après une seconde mitose les deux gamètes mâles (revue par Twell 2011). Cette seconde mitose, peut se dérouler soit après pollinisation et donc dans les tissus femelles (pollen binucléé comme chez le lys, le tabac ou la tomate), soit dans les anthères avant la pollinisation (pollen trinucléé comme chez Arabidopsis ou le maïs) (Edlund *et al.*, 2004 ; Twell *et al.*, 2006). Par la suite, le tapis staminal dégénère et son contenu est déposé sur la paroi externe du pollen mature, l'exine principalement composée de sporopollénine (Piffanelli *et al.*, 1998). Parmi ces

composés, des lipides et de nombreuses protéines appelées PCP (POLLEN COAT PROTEINS) sont présentes. Parmi celles-ci, on trouve chez le chou *(Brassica napus*), le déterminant mâle, la protéine SCR (S-LOCUS CYSTEINE RICH) impliquée dans le rejet sporophytique (Schopfer *et al.*, 1999). En plus de l'exine, le grain de pollen possède une paroi interne, l'intine, composée principalement de polysaccharides comme la callose, la cellulose et les pectines (Hesse *et al.*, 2009). Parallèlement, le grain de pollen se déshydrate afin de ralentir son métabolisme.

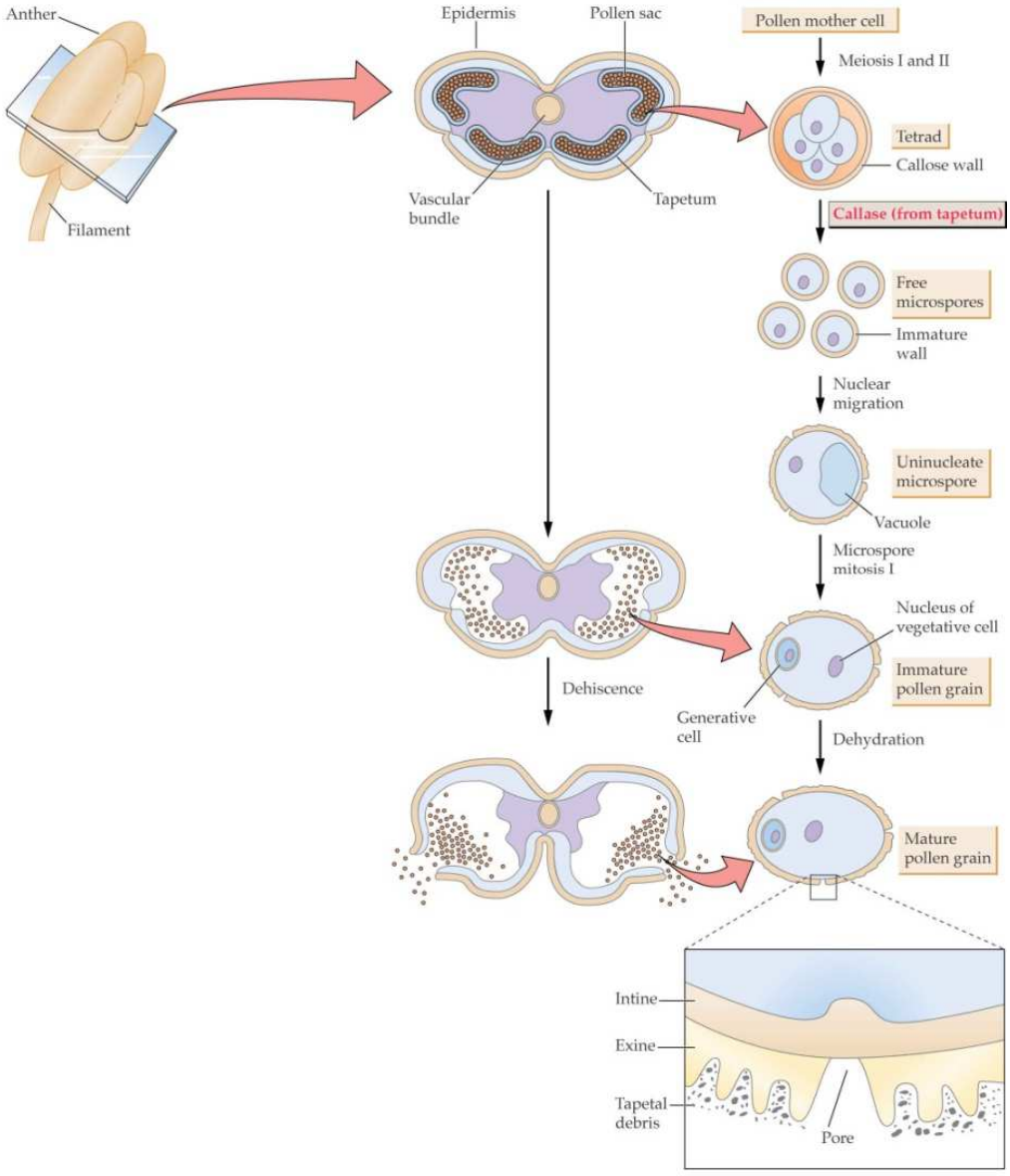


Figure 5 : Principales étapes aboutissant à la formation du pollen mature chez les Angiospermes

(Bewley et al., 2000)

1.2.3. Les étapes de la reproduction sexuée

1.2.3.1. La pollinisation

Cette étape correspond au processus de transport du grain de pollen depuis l'anthère jusqu'au stigmate. Plusieurs processus permettent ce transport dont les plus connus sont l'entomogamie et anémogamie (respectivement par le biais des insectes et du vent). Au moins un de ces deux processus est requis pour *Nicotiana tabacum* et *Solanum lycopersicum*. Cependant, certaines plantes sont capables de s'auto-polliniser. Cette méthode, utilisée chez *Arabidopsis thaliana*, se réalise lors du développement de la fleur où les étamines vont se trouver au contact direct avec le stigmate (Dumas, 2001).

1.2.3.2. La phase progamique

Cette étape démarre lorsque le gamétophyte mâle (grain de pollen) entre en contact avec le sporophyte femelle. C'est sur le stigmate que s'opèrent les mécanismes d'auto-incompatibilité sporophytiques comme chez le chou (*Brassica napus*), plante modèle d'étude (Schopfer *et al.*, 1999 ; Takasaki *et al.*, 2000) et chez certaines espèces comme le coquelicot, l'auto-incompatibilité gamétophytique (Wheeler *et al.*, 2009). Cette stratégie reproductive a pour but de favoriser le croisement entre plantes d'une même espèce et ainsi d'améliorer le pool génétique. Il est intéressant de noter qu'*Arabidopsis lyrata* est aussi auto-incompatible alors qu'*Arabidopsis thaliana* ne possède pas un système fonctionnel de rejet du soi. L'auto-fécondation est favorisée bien que des gènes d'incompatibilités, similaires à ceux trouvés chez *Brassica napus,* aient été mis en évidence (Sherman-Broyles *et al.*, 2007). Il a récemment été montré que la perte de ce mécanisme de rejet au cours de l'évolution était due à une mutation dans les gènes codant pour le ligand mâle (Tsuchimatsu *et al.*, 2010). Après l'action de ces mécanismes de reconnaissance complexes entre le stigmate et le grain de pollen, ce dernier va s'hydrater. La plupart des grains de pollen possède des apertures qui se dessinent sous forme de fentes. A cet endroit précis, la paroi du grain se caractérise par l'absence d'exine compensée par une double paroi d'intine. Ces apertures permettent au grain de pollen une réhydratation rapide, en partie due à une différence de potentiel osmotique entre le grain de pollen et le stigmate (Taylor et Hepler, 1997). Cette réhydratation

aboutit à la reprise de l'activité métabolique du grain de pollen. Ces apertures sont aussi les sites privilégiés d'émergence du tube pollinique (Taylor et Hepler, 1997). Celui-ci a été observé pour la première fois en 1824 par le microscopiste italien Giovanni Battista Amici. Il décrit alors une sorte de tube ou de boyau semblant s'échapper du grain de pollen dans lequel circule des vésicules (Amici, 1824). Ces vésicules en déplacement correspondent aux mouvements intracellulaires des organites dans le cytoplasme.

Le tube pollinique est une cellule polarisée dont l'élongation se fait dans la zone apicale. La poussée du cytoplasme entraîne une élongation. Cette poussée est néanmoins inversement proportionnelle au volume, cessant l'élongation jusqu'à nouvelle poussée du cytoplasme. Ce mode de croissance est décrit comme étant scalariforme et se visualise très nettement lors de l'observation de tubes en croissance (Zonia et Munnik, 2008). Parallèlement, un influx de calcium précède la poussée de croissance du tube pollinique (Hepler, 2005). La taille des tubes polliniques est très variable selon les espèces mais peut atteindre *in vivo* une dizaine de centimètres chez les plantes à style long comme le lys. Ainsi, afin de conserver un volume plus ou moins constant, la cellule végétative synthétise périodiquement, grâce aux callose synthases (Cai *et al.*, 2011), des bouchons de callose permettant son maintien dans la zone apicale (Figure 6).

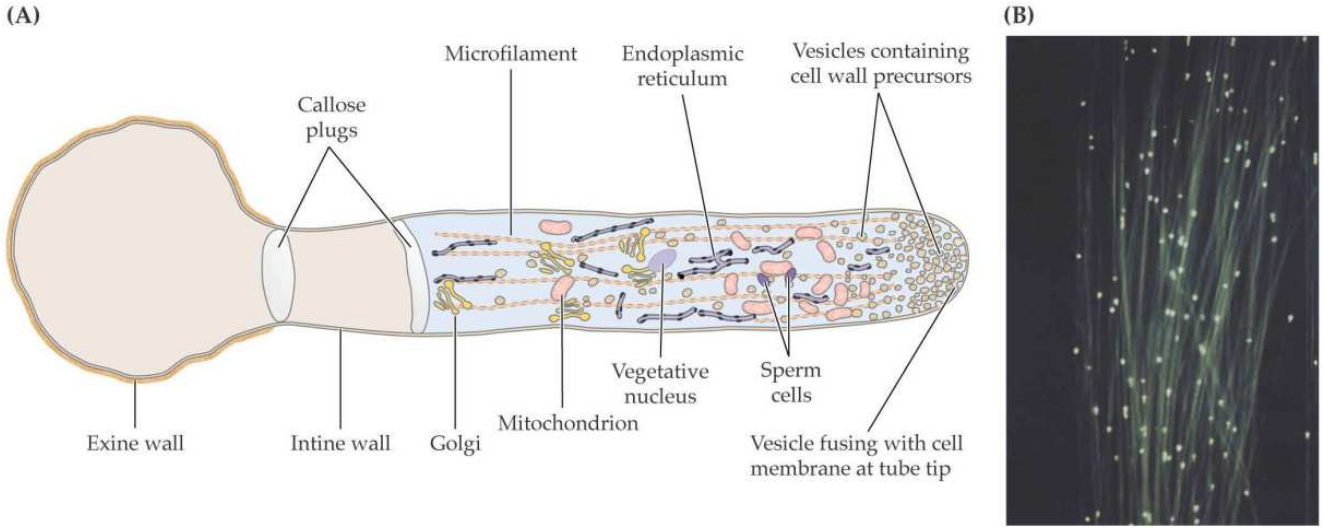


Figure 6 : Représentation schématique (A) d'un tube pollinique en croissance et (B) coloration des tubes polliniques par le bleu d'aniline mettant en évidence les bouchons de callose.

(Bewley et al., 2000)

Chez Arabidopsis, le tube pollinique va s'enrouler autour des papilles stigmatiques avant de s'introduire dans la paroi entre les cellules des tissus femelles (Kandasamy *et al.*, 1994 ; Edlund *et al.*, 2004). A l'inverse, chez le lys, possédant un stigmate humide et ouvert, le tube pollinique se dirige vers le centre du stigmate, guidé par une petite protéine appelée chemocyanine qui présente des propriétés chémoattractantes pour des tubes polliniques cultivés *in vitro* (Kim *et al.*, 2003). Les tubes vont croître, en traversant le style, adhérant aux cellules épidermiques du tissu de transmission (Lord 2000, Palanivelu et Preuss 2000). Chez Arabidopsis, le tube pollinique émerge ensuite vers le septum sur lequel il croît en contact étroit puis sur le funicule pour se diriger vers le micropyle (Lennon *et al.*, 1998) où des mécanismes d'attraction ont été mis en évidence. Parmi ces signaux, chez Arabidopsis, un gradient d'acide gamma aminobutyrique (GABA) régulé par POP2 (POLLEN-PISTIL-INTERACTION2), une transaminase qui dégrade le GABA, permettrait le guidage des tubes polliniques vers les ovules (Palanivelu *et al.*, 2003). Chez *Torenia fournieri*, il a récemment été montré que les tubes polliniques étaient attirés vers les ovules grâce aux polypeptides riches en cystéines LURE (attraction en anglais) présentant des similarités avec des défensines et sécrétés par les synergides (Higashiyama et al 2001*;* Okuda et al 2009). Il est intéressant de noter que les tubes polliniques cultivés *in vitro* ne sont pas sensibles à ces peptides alors que ceux cultivés en semi-*in vitro*, c'est-à-dire étant préalablement passé à travers le stigmate et le style, sont capables de les percevoir (Higashiyama *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que les tubes polliniques sont rendus compétents à percevoir ces signaux lors de leurs croissances dans les différents tissus femelles (Okuda et Higashiyama, 2010). De même, chez le maïs, une attraction micropylaire des tubes polliniques serait provoquée par le peptide *Zm*EA1 (*Zea mays* EGG APPARATUS1) (Marton *et al.*, 2005).

1.2.3.3. La phase syngamique

Cette phase correspond à l'arrivée du gamétophyte mâle au sac embryonnaire (le gamétophyte femelle). Dès lors, le tube pollinique va pénétrer dans une des deux synergides et libérer ses deux cellules spermatiques. L'explosion du tube pollinique serait contrôlée par FERONIA, un récepteur transmembranaire à activité kinase localisé dans l'appareil filiforme des synergides. En effet, chez le mutant *feronia*, les tubes

polliniques n'explosent pas et continuent à se développer dans le sac embryonnaire (Escobar-Restrepo *et al.*, 2007).

Par la suite, un gamète va fusionner avec l'oosphère aboutissant à la formation d'une cellule diploïde dont les multiplications successives formeront un embryon diploïde ; tandis que la seconde cellule spermatique va fusionner avec les deux noyaux polaires dont le développement donnera un tissu triploïde nourricier, l'albumen (Bewley et al 2000). Simultanément, des mécanismes de répulsion des tubes polliniques prennent place afin d'éviter la polyspermie (Palanivelu et Preuss 2006). Ils pourraient être provoqués entre autre par la production de monoxyde d'azote qui possède des propriétés répulsives sur les tubes polliniques du lys (Prado *et al.*, 2004).

1.3. La culture *in vitro* des tubes polliniques

L'étude des tubes polliniques est rendue possible *in vitro*, notamment grâce à la mise en place de milieux de germination artificiels contenant au minimum du saccharose, du bore et du calcium (Boavida et McCormick, 2007). Les tubes polliniques chez certaines espèces comme le tabac, la tomate ou le lys sont cultivés très facilement *in vitro* et ont des croissances rapides, ce qui en font d'excellents modèles pour les études de trafic cellulaire, la biosynthèse et la mise en place des composés pariétaux lors de l'élongation cellulaire (Cai et Cresti, 2009). Néanmoins, les vitesses de croissance observées *in vitro* sont très souvent inférieures à celles observées *in vivo*, ce qui suggère un rôle capital des tissus femelles dans la croissance des tubes polliniques (Lord, 2000). Pour *Arabidopsis thaliana*, la culture *in vitro* a été plus problématique et très difficile à obtenir. Un premier milieu de germination a été élaboré par Fan *et al.* (2001) et permet l'obtention de tubes polliniques courts (environ 135 µm de longueur) avec un taux de germination n'excédant pas 75%. Celui-ci a été optimisé six années plus tard par Boavida et McCormick (2007). Ce milieu permet actuellement d'obtenir des taux de germination proche de 80% et des longueurs de tubes supérieures à 1 mm après 12h de culture.

1.4. Le partenaire femelle

Pendant son développement, le tube pollinique doit traverser les différents tissus femelles pour acheminer les gamètes jusqu'aux ovules. Il emprunte alors comme voie intra-florale, le tissu de transmission (Figure 7). Selon qu'il s'agisse de styles creux ou pleins, les tubes polliniques vont croître respectivement sur les cellules épidermiques du tissu de transmission ou à travers la paroi des cellules de celui-ci. Chez Arabidopsis, le tissu de transmission s'étend de la limite stigmate-style jusqu'à la base de la partie ovarienne. Il se compose de cellules à parois épaisses constituées de polysaccharides complexes et acides ainsi que de glycoprotéines de type arabinogalactanes protéines (Clarke *et al.*, 1979 ; Lennon *et al.*, 1998 ; Coimbra *et al.*, 2007).

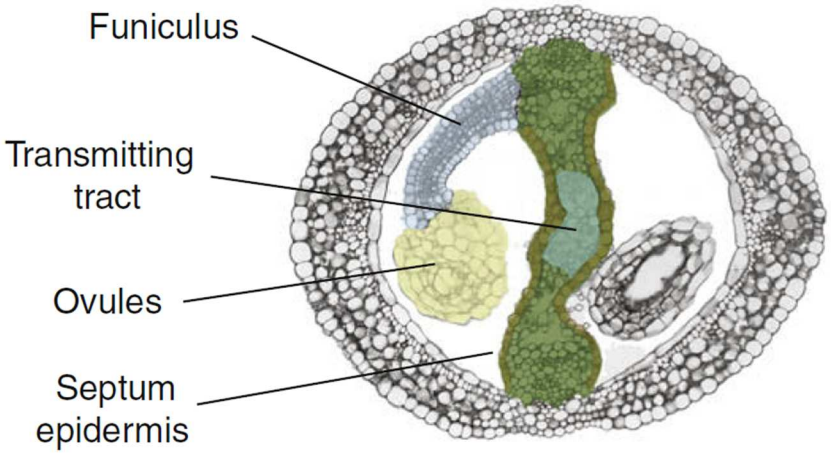


Figure 7 : Coupe transversale de la partie ovarienne du pistil d'*Arabidopsis thaliana.*

(Crawford et Yanofsky, 2008)

Le rôle de ce tissu de transmission est multiple et primordial. Il serait impliqué dans le guidage, la nutrition, la défense, l'adhésion et possèderait un rôle actif dans l'extension des tubes polliniques (Sanders et Lord, 1989 ; Lord et Russel, 2002 ; Mollet *et al.*, 2007). D'ailleurs, chez le tabac, des arabinogalactane protéines (*Na*TTS, *Nicotiana alata* TRANSMITTING TISSUE-SPECIFIC) présentent un gradient croissant de glycosylation du haut vers le bas et auraient un rôle dans le guidage des tubes polliniques (Cheung *et al.* 1995 ; Wu *et al.*, 1995). *In vitro*, *Na*TTS stimule l'élongation des tubes polliniques et permet en semi-*in vitro* leurs attraction (Wu *et al.*, 2000 ; Wang

et al., 2010). Une partie des glycanes de *Na*TTS pourrait être assimilée par les tubes polliniques et servir d'éléments nutritifs (Cheung *et al.*, 1995 ; De graaf *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, ces glycoprotéines pourraient être également impliquées dans le guidage des tubes polliniques (Coimbra *et al.*, 2008). Guidage qui, chez le maïs serait entièrement contrôlé par ce tissu de transmission (Lausser *et al.*, 2010). L'absence de ce tissu, observé chez le mutant *ntt* pour « *no transmitting tract* », réduit considérablement la production de graines en empêchant les tubes polliniques de se mouvoir jusqu'aux ovules (Crawford *et al.*, 2007). De plus, une étude récente a montré que le transcriptome des tubes polliniques ayant traversé le stigmate et le style était différent de celui observé sur des tubes polliniques cultivés *in vitro*, suggérant un rôle de signalisation de ce tissu (Qin *et al.*, 2009).

La dégénérescence du tissu de transmission a été observée dans les styles pleins d'*Arabidopsis thaliana* et de *Nicotiana tabacum* (Wang *et al.*, 1996 ; Crawford *et al.*, 2007). Cet évènement survient juste avant l'anthèse, prévenant ainsi toute fécondation précoce. Puis la suppression de la barrière physique, assurée par cette dégradation, faciliterait le passage des tubes polliniques à travers ce tissu (Crawford et Yanofsky, 2008).

Le calcium est un élément important pour la croissance du tube pollinique (Hepler, 2005). Il a été montré que la quantité de calcium dans le tissu de transmission augmente lors du passage du tube pollinique (Zhao *et al.*, 2004a). Les concentrations en ions Ca^{2+} semblent être régulées par les calréticulines (Lenartowska *et al.*, 2010). Ces protéines sont localisées dans les saccules de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique et participent à la régulation de l'homéostasie de l'ion Ca^{2+} chez les animaux et les végétaux (Jia *et al.*, 2009). Leurs présences et accumulations ont été confirmées *in vitro* et *in situ* dans le tissu de transmission (Lenartowska *et al.*, 2009).

Le tissu de transmission est également composé de molécules impliquées dans la défense des plantes. L'*endo*-chitinase est la protéine soluble la plus abondante observée chez *Solanum tuberosum* (Wemmer *et al.*, 1994). Chez le lys, l'exsudat est riche en LIPID TRANSFER PROTEIN (LTP), polypeptide pouvant avoir des propriétés antifongiques et classé comme PR-protéine (*Pathogenesis-Related*) mais ici impliqué dans l'adhésion cellulaire (Park *et al.*, 2000 ; Lord, 2000 ; Zhao *et al.*, 2004b ; Yeats et Rose, 2008). Les mécanismes et les molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire seront détaillés dans le chapitre « Adhésion cellulaire ».

2. La paroi primaire végétale

Les cellules végétales sont entourées d'une matrice extracellulaire appelée également paroi. Lors des mitoses, les cellules sont séparées par une lamelle moyenne riche en polysaccharides pectiques puis chaque cellule va synthétiser une paroi dite primaire qui constituera l'unique enveloppe durant toute la croissance cellulaire. Cette paroi confère à la cellule de multiples fonctions tant physiques que biologiques. Ainsi, outre sa capacité à maintenir la turgescence cellulaire (Ray *et al.*, 1972), la transduction de signaux (Shibuya et Minami, 2001 ; Roberts, 2001), notamment pour la défense des plantes (Silipo *et al.*, 2010), elle est également impliquée dans l'adhésion cellulaire (Durand *et al.*, 2009) ou encore dans la communication avec les cellules environnantes (Brownlee, 2002). Une fois l'élongation cellulaire terminée, certains tissus biosynthétisent une paroi dite secondaire pour consolider la paroi primaire, conférant ainsi aux tissus une plus forte rigidité.

La biosynthèse et la mise en place de la paroi représente un coût énergétique élevé pour la plante. On estime à 10% les gènes d'*Arabidopsis thaliana* impliqués dans le métabolisme de la paroi, regroupant la biosynthèse, le transport et le remodelage des molécules pariétales ainsi que la régulation de tous ces processus (McCann et Carpita, 2008).

2.1. Composition de la paroi primaire

La paroi primaire est principalement de nature polysaccharidique dont les principaux monosaccharides sont présentés dans la figure 8.

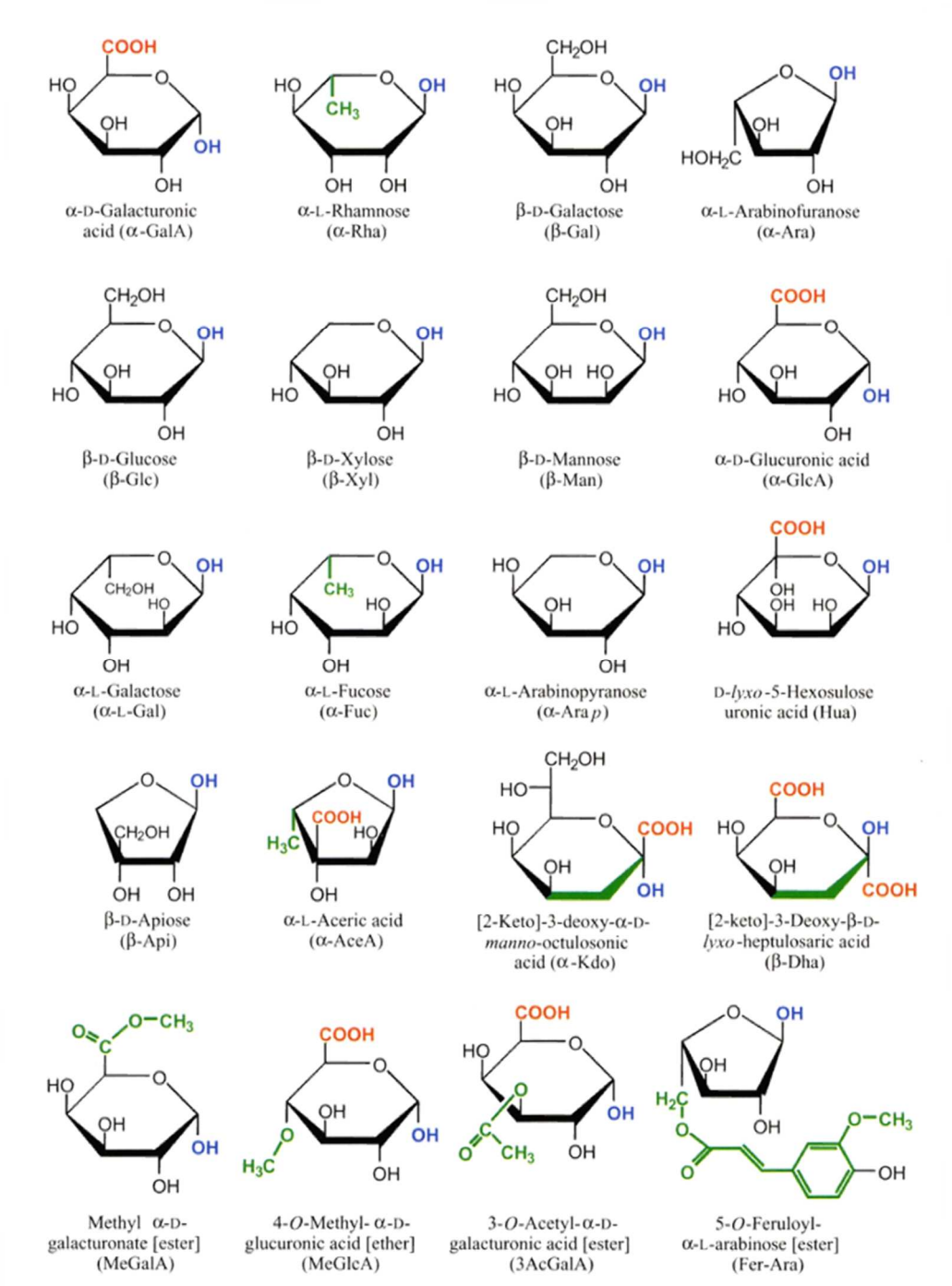


Figure 8 : Structure des monosaccharides en conformation « Haworth » composant les principaux polymères pariétaux.

(Fry, 2011)

Trois familles de polysaccharides sont distinguées dans la paroi primaire : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Figure 9). Au sein de ce réseau formé par

ces polysaccharides, des protéines enzymatiques et structurales pouvant être glycosylées résident dans cette matrice (Gibeaut et Carpita, 1994).

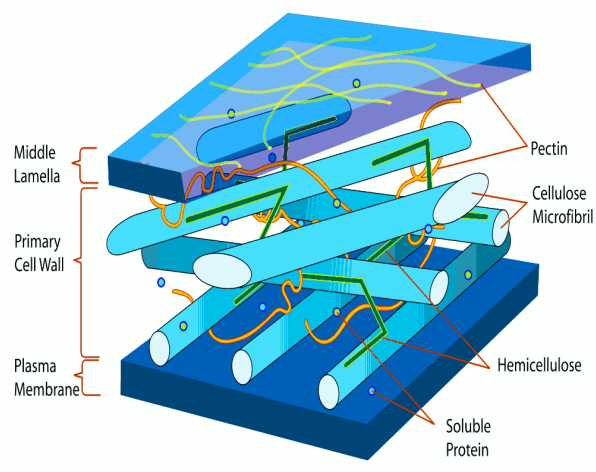


Figure 9 : Représentation schématique de la paroi primaire d'une cellule végétale.

(d'après McCann et Roberts, 1991)

La première caractérisation complète des polysaccharides pariétaux chez *Arabidopsis thaliana* provient des travaux de Zablackis *et al.* (1995). Les auteurs estiment que la paroi isolée de feuilles contient environ 40% de pectines, 24% d'hémicelluloses dont 20% représentent du xyloglucane (XyG), 14% de cellulose et une proportion identique de protéines. La biosynthèse de chacun des polymères pariétaux mobilise un grand nombre de protéines enzymatiques appartenant à la famille des CAZYmes pour « **C**arbohydrate-**a**ctive en**zy**mes » (Cantarel *et al.*, 2009). L'ensemble de ces protéines est regroupé dans une base de données disponible sur le site **http://www.cazy.org**.

2.1.1. Les β-glucanes

Trois types de β-glucanes ont été mis en évidence, mais seulement deux d'entre eux sont retrouvés chez *Arabidopsis thaliana* : la cellulose et la callose. La dernière famille, les « Mixed-Linked Glucans », est spécifique de certaines monocotylédones dont les Poaceae (Sorensen *et al.*, 2008) et est assimilée à la famille des hémicelluloses du fait de leur biosynthèse complexe dans l'appareil de Golgi.

2.1.1.1. La cellulose

La cellulose se compose d'un motif répété de cellobiose (Haworth, 1932), lui-même étant un enchainement de deux résidus inversés de glucose liés en β-(1→4) comme présenté dans la figure 10.

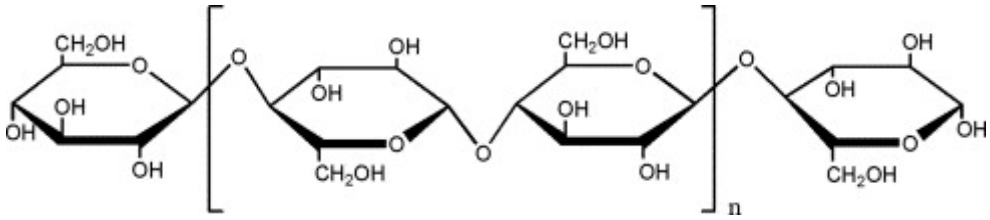


Figure 10 : Modélisation d'un motif de cellobiose

Répété n fois, la cellobiose constitue la cellulose (n=250 à 7000)

(Liu et al., 2007)

Le degré de polymérisation varie entre 500 et 14000 résidus mais n'excède pas 8000 dans la paroi primaire (Brett, 2000 ; Brown Jr, 2004). Plusieurs chaines de cellulose s'associent entre elles à l'aide de liaisons faibles (Hydrogène et Van der Waals) pour former des structures paracrystallines appelées microfibrilles (Harris *et al.*, 2010).

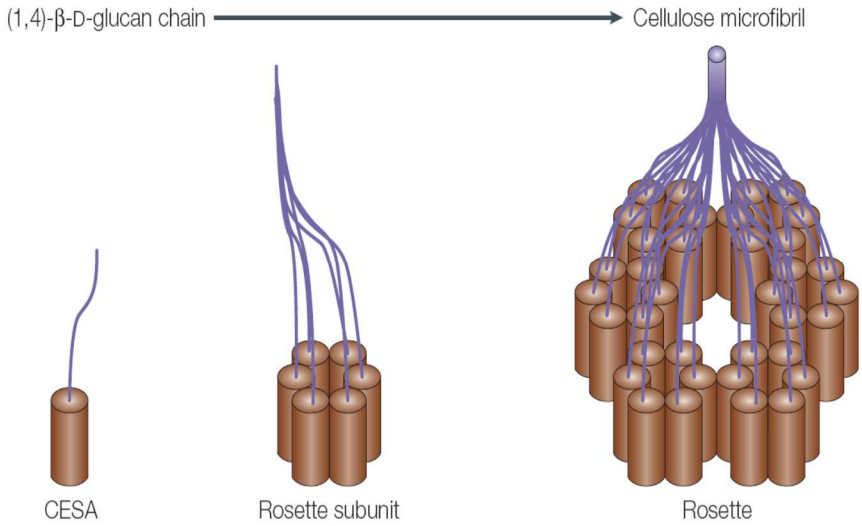


Figure 11 : De la synthèse d'une chaine β-(1→4)-glucane à la formation de la microfibrille de cellulose.

(Cosgrove, 2005)

Ces microfibrilles sont synthétisées au niveau de la membrane plasmique par des complexes constitués de 6 protéines cellulose synthases (CESA). Ces protéines sont à ce jour les seules composantes qui permettent de constituer la cellulose (Somerville, 2006). Chez les plantes supérieures, elles sont rassemblées sous forme de rosettes, mises en évidence par le groupe de Malcolm Brown Jr. (Mueller et Brown Jr, 1980) et chacune des 6 protéines CESA synthétise une chaine glucanique. Ces rosettes sont elles mêmes regroupées par 6 pour former un total de 36 chaines qui co-cristallisent en microfibrilles (Figure 11, Cosgrove 2005).

2.1.1.2. La callose

La callose est un polysaccharide formé d'un enchainement de résidus glucosyles par des liaisons en β-(1→3). Certains résidus glucosyles liés en β-(1→6) peuvent aussi être retrouvés. Cette longue chaine se conforme sous la forme d'une hélice, laquelle est capable de s'associer avec une, voire deux autres chaines de même nature.

De toute évidence, la biosynthèse de la callose se fait au niveau de la membrane plasmique. Mais sa production est elle différente de celle de la cellulose ? Bien que deux mécanismes différents de productions aient été démontrés (Kudlicka et Brown Jr, 1997), il avait été proposé que la synthèse de ces deux β-glucanes soit catalysée par une seule et même enzyme (Verma et Hong, 2001). Cette hypothèse a été réfutée suite à la découverte de gènes codant une callose synthase CALS1 (Hong *et al.*, 2001) et de ses 11 autres isozymes (Verma et Hong, 2001). La biosynthèse de la callose est peu étudiée car elle est en général constitutivement peu abondante dans la paroi des plantes mise à part dans les tubes criblés du phloème (Xie *et al.*, 2011), le pollen et les tubes polliniques (Parre et Geitmann, 2005a) et lors des divisions dans la plaque cellulaire (Chen et Kim, 2009).

2.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses présentes chez les végétaux peuvent être de différentes natures. On comptabilise à ce jour de nombreux polymères appartenant à cette famille de polysaccharides. Parmi les plus abondants, on retrouve les xylanes, les

arabinoxylanes, les mannanes, les glucomannanes, les β-(1→3,1→4)-glucanes (*mixed-linkage glucans*) ainsi que les XyG (Scheller et Ulvskov, 2010). Tous sont plus ou moins spécifiques d'une famille et/ou de l'origine de la paroi (primaire, secondaire ou graine).

Les XyG sont les hémicelluloses les plus abondants de la paroi primaire des plantes appartenant aux monocotylédones non commélinoïdes (*e.g.* le lys), et aux eudicotylédones (*e.g.* le tabac, la tomate et l'arabette). Seuls les XyG seront décrits dans la suite de cette introduction.

2.1.2.1. La structure des xyloglucanes

Le polymère de XyG est constitué d'une chaine principale de glucoses liés en β-(1→4) par des liaisons équatoriales. Sur ce squelette glucanique peuvent être ramifiées, en O-6, des chaines latérales de natures diverses dont les seuls monosaccharides retrouvés à ce jour sont : le xylose, le galactose, le fucose et l'arabinose (Fry, 2011). Une nomenclature établie par Fry *et al.* (1993) propose que l'assemblage des chaines latérales du XyG porte une lettre correspondant au dernier résidu de la substitution. On considère que les chaines les plus communes sont **G**, **X**, **L**, **F**, **S** les autres telles que **J**, **B**, **C**, *etc*, étant plus rares (Tableau 1).

Tableau 1 : Détail des structures connues des chaines latérales du xyloglucane.

One Letter Codes for Xyloglucan Substructures										
β-D-Glc*p*	α-L-Fuc*p* 1 ↓ 2 β-D-Gal*p* 1 ↓ 2 α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p*	β-D-Gal*p* 1 ↓ 2 α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p*	α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p*	α-L-Gal*p* 1 ↓ 2 β-D-Gal*p* 1 ↓ 2 α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p*	α-L-Ara*f* 1 ↓ 2 α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p*	β-L-Ara*f* 1 ↓ 3 α-L-Ara*f* 1 ↓ 2 α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p*	α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p* 2 ↑ 1 α-L-Ara*f*	α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p* 2 ↑ 1 β-D-Xyl*p*	α-D-Xyl*p* 1 ↓ 6 β-D-Glc*p* 2 ↑ 1 β-D-Xyl*p* 3 ↑ 1 α-L-Ara*f*	D-Glcol
G	**F**	**L**	**X**	**J**	**S**	**T**	**A**	**B**	**C**	**Gol**

(http://www.ccrc.uga.edu/~mao/xgnom/nomen.html,
d'après la nomenclature de Fry et al., 1993)

Habituellement, un glucose de la chaine principale est non substitué tous les 4 ou 5 résidus. Cette caractéristique permet l'action d'une enzyme de type *endo*-cellulase qui permet de produire des oligosaccharides aisément analysables par spectrométrie de masse (*e.g.* MALDI-TOF). Cette méthode d'analyse, initialement appelée « *fingerprinting* » (Lerouxel *et al.*, 2002), est désormais plus connue sous le nom de méthode OLIMP pour *Oligosaccharide Mass Profiling* (Obel *et al.*, 2009). Il existe 2 grandes familles de XyG : i) les fuco-galacto-XyG qui présentent sur leurs résidus xyloses un galactose et/ou un galactose-(1→2)-fucose (*Cf* structures L et F dans le Tableau 1) et ii) les arabino-XyG portant sur le xylose un résidu arabinosyle (*Cf* structure S dans le Tableau 1). La première famille est largement plus représentée que la seconde comme en témoigne l'arbre phylogénétique de la figure 12.

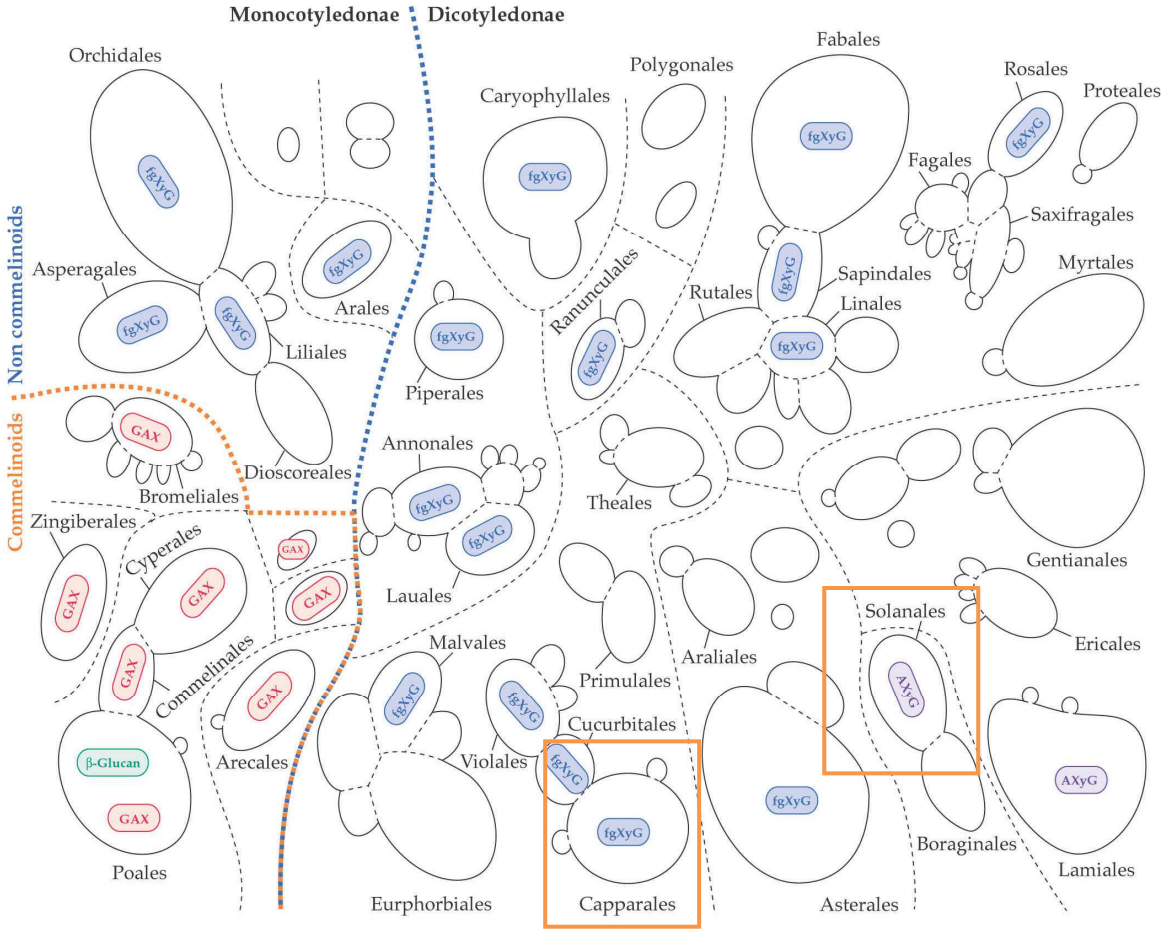


Figure 12 : Arbre phylogénétique représentant les xyloglucanes majoritaires trouvés dans les différents Ordres de la classification des végétaux.

(GAX : glucuronoarabinoxylane, fgXyG : fuco-galacto-xyloglucane, AXyG, arabino-xyloglucane)

(d'après Carpita et McCann, 2000)

Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, Ordre des Capparales, on retrouvera majoritairement dans les tissus végétatifs des fragments de type XXXG, XXLG, XXFG et XLFG (Lerouxel *et al.*, 2002). Par contre, chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) ou le tabac (*Nicotiana tabacum*), appartenant à l'Ordre des Solanales, ce sont principalement des fragments de type arabino-XyG (XXGG, XSGG, GXSGG) qui sont retrouvés (Jia *et al.*, 2003). A ce jour, une seule espèce étudiée, *Nerium oleander* (Laurier rose) de l'Ordre des Gentianales, possède les deux types de XyG, avec des fragments fucosylés et arabinosylés (Hoffman *et al.*, 2005).

2.1.2.2. La biosynthèse des xyloglucanes

La biosynthèse du XyG nécessite plusieurs enzymes dont certaines sont d'ores et déjà caractérisées. L'ensemble des glycosyltransférases participant à la biosynthèse du XyG est associé aux membranes golgiennes (Camirand *et al.*, 1987 ; Brummel *et al.*, 1990 ; Driouich *et al.*, 1993 ; White *et al.*, 1993 ; Baydoun *et al.*, 2001 ; Cocuron *et al.*, 2007). La biosynthèse des chaines latérales débute dans le compartiment *cis* de l'appareil de Golgi, puis suit sa maturation dans le compartiment *median* et *trans* (Chevalier *et al.*, 2010). La première étape de synthèse du XyG est réalisée par une β-(1→4) glucane synthase pour former la chaine principale (Figure 13) (Cocuron *et al.*, 2007). L'ajout du xylose en α-(1→6) se fait par l'intermédiaire d'enzymes telles que *At*XT1 capables de substituer un résidu sur le pénultième glucose non réduit d'un cellopentaose (Faik *et al.*, 2002) ou encore par les enzymes *At*XT2 et XXT5 (Cavalier *et al.*, 2008 ; Zabotina *et al.*, 2008). Une galactosyltransférase, *At*MUR3, transfère le β-(1→2)-galactose (Madson *et al.*, 2003). Enfin, *At*FUT1, une fucosyltransférase, permet l'ajout du fucose en α-(1→2) sur le résidu galactose (Figure 13) (Vanzin *et al.*, 2002). Les fonctions de ces chaines latérales de ce polymère restent inconnues. Seules quelques hypothèses demeurent. Les principaux travaux se sont focalisés sur le fucose. En effet, dans la voie de biosynthèse du XyG, le L-fucose est apporté par de l'UDP-L-fucose lui-même provenant du GDP-D-mannose (Nakayama *et al.*, 2003). La dernière étape d'interconversion est réalisée par le biais du gène *MUR1* codant une GDP-D-mannose-4,6-dehydratase (Bonin *et al.*, 1997). La plante mutée dans ce gène est caractérisée par l'absence de résidus fucosyles sur le XyG dans certains organes de la plante (Freshour *et al.*, 2003). Cependant, ce fucose peut être aisément remplacé par du L-galactose comme

chez le mutant *mur1* (Zablackis *et al.*, 1996), de structure très voisine (le fucose étant du 6-déoxy-galactose) confortant l'hypothèse que le fucose est d'une importance capitale pour le XyG.

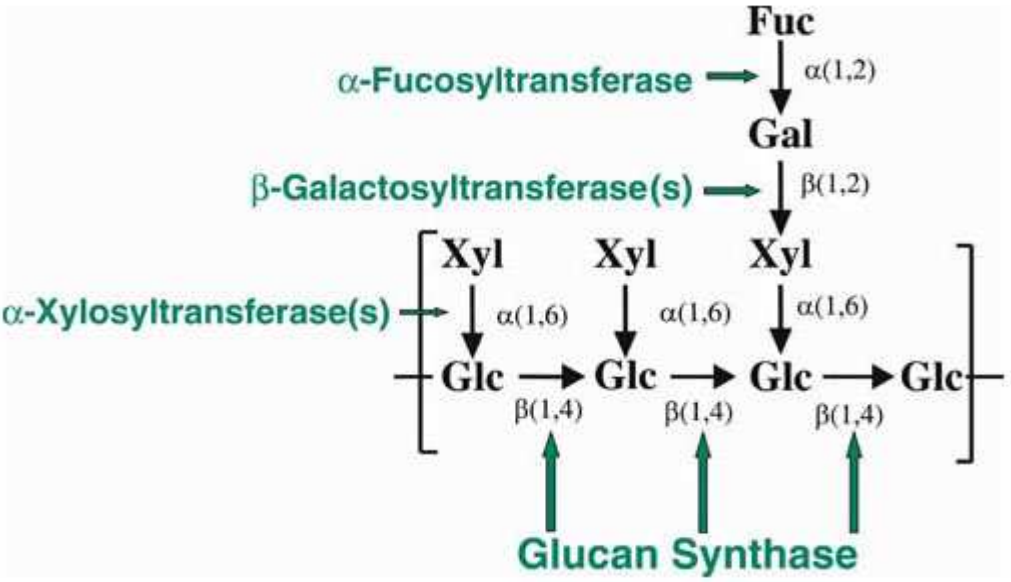


Figure 13 : Composition d'un fragment xyloglucane XXFG et des principales enzymes impliquées dans sa biosynthèse.

(http://www.bch.msu.edu/faculty/keegstra/cellwall.html)

Pour les éventuels groupements *O*-acétyles retrouvés sur le glucose et/ou le galactose, aucune *O*-acétyltransférase n'a encore été caractérisée à ce jour, bien que le substrat nécessaire à cette étape, l'acétyl-CoA, ait été identifié (Pauly et Scheller, 2000).

Finalement, bien que disposant des ressources bioinformatiques et de banques de mutants, aucune arabinosyltransférase spécifique du XyG n'a encore été caractérisée chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Lerouxel *et al.*, 2006). Ceci est sans doute dû au fait que cette plante ne possède pas d'arabino-XyG. Les seules arabinosyltransférases putativement identifiées à ce jour permettraient l'ajout d'arabinose lors de la synthèse d'arabinoxylanes (Mitchell *et al.*, 2007).

2.1.3. Les pectines

Les pectines sont avec les XyG, les polysaccharides complexes les plus abondants de la paroi primaire. Elles constituent 40% de la paroi primaire chez *Arabidopsis*

thaliana (Liepman *et al.*, 2010). Les pectines sont majoritairement retrouvées dans la lamelle moyenne, assurant ainsi une cohésion entre les cellules végétales et dans la paroi primaire. Plusieurs polymères composent cette famille. Zablackis et collaborateurs (1995) ont caractérisé 3 domaines distincts : les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes de type I et II (respectivement RG-I et RG-II). D'autres composés pectiques ont été identifiés tels que le xylogalacturonane (XGA) ou l'apiogalacturonane (Schols *et al.*, 1995 ; Hart et Kindel, 1970), mais ce n'est que bien plus tard que Zandleven *et al.* (2007) ont identifié le XGA chez *Arabidopsis thaliana*.

De nombreuses revues récentes décrivent la composition, la biosynthèse et les fonctions des pectines (Scheller *et al.*, 2007 ; Mohnen, 2008 ; Caffal et Mohnen, 2009 ; Harholt *et al.*, 2010 ; Fry, 2011).

Les homogalacturonanes se composent d'une chaine d'acides galacturoniques (GalA) liés en α-(1→4). Cette famille est la plus abondante car elle représente environ 65% des pectines totales.

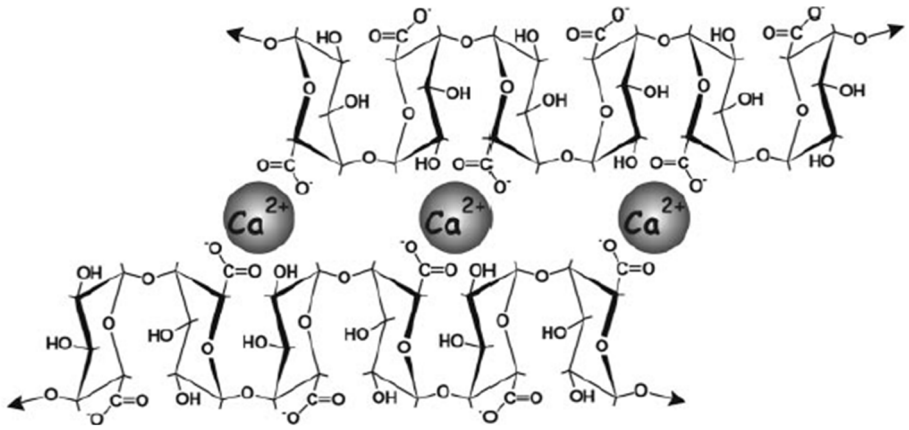


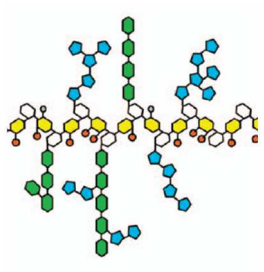
Figure 14 : Représentation schématique de la structure « boite à œuf ».

Deux chaines HG sont liées par des ions Ca^{2+}.

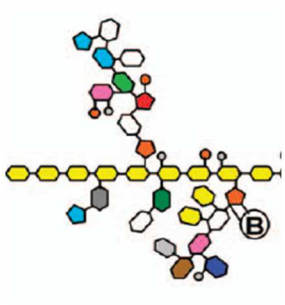
(Vincken et al., 2003)

Ce polymère peut être méthylestérifié sur le carbone 6 et *O*-acétylé en positions O-2 et O-3. D'ailleurs, c'est sous la forme fortement méthylestérifiée que les HG sont synthétisés dans l'appareil de Golgi. Dans la paroi, ces groupements méthyles peuvent être éliminés sous l'action de pectines méthylestérases (PME) pour aboutir à la formation de groupements carboxyliques sur le C-6. Selon les conditions de pH et la

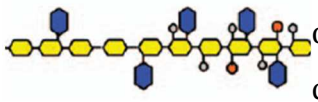
régulation ionique, les pectines vont subir, soit une déméthylestérification partielle et aléatoire, soit en bloc. Dans le premier cas, les HG seraient alors sensibles aux *endo*-polygalacturonases, favorisant un relâchement de la paroi. Dans le second cas, les charges négatives contiguës établies par les groupements $-COO^-$ pourront interagir avec des ions Ca^{2+} permettant l'association de plusieurs chaines HG (Figure 14). Cette association établit la structure dite « boite à œuf » (Jarvis *et al.*, 2003 ; Micheli, 2001 ; Pelloux *et al.*, 2007).



Le rhamnogalacturonane de type I consiste en une chaine principale du motif répété [α-(1→4)-GalA-α-(1→2)-Rha] sur laquelle des ramifications de chaines α-(1→5)-arabinanes, β-(1→4)-galactanes et/ou arabinogalactanes peuvent être trouvées en position C-4 des rhamnosyles.



Le rhamnogalacturonane de type II ne contient pas de rhamnose sur sa chaine principale. Il s'agit en fait d'un squelette d'acide homogalacturonique sur lequel vient se substituer quatre chaines latérales notées de A à D. Ces oligosaccharides sont composés de 12 monosaccharides différents dont certains sont rares tels que l'apiose, le Dha ou encore le Kdo (Figure 8). L'un de ces monosaccharides, l'apiose de la chaine A, permet au RG-II de former des dimères par l'intermédiaire d'un pont diester de borate (Kobayashi *et al.*, 1996 ; O'Neill *et al.*, 1996).



Le xylogalacturonane possède une chaine principale du type HG où des résidus xylosyles sont substitués en position C-3 de certains acides galacturoniques.



Figure 15 : Légende des encarts présentés pour les HG, les RG (I et II) et les XGA.

(Scheller et al., 2007)

On estime que pas moins de 67 glycosyl-, méthyl- et acétyltransférases sont nécessaires pour l'élaboration des structures pectiques (Mohnen, 2008). Leur biosynthèse est effectuée dans tous les compartiments de l'appareil de Golgi (*cis*, *median*, *trans*) (Figure 16) (Revues dans Driouich *et al.*, 1993 ; Staehelin et Moore, 1995 ; Caffall et Mohnen, 2009).

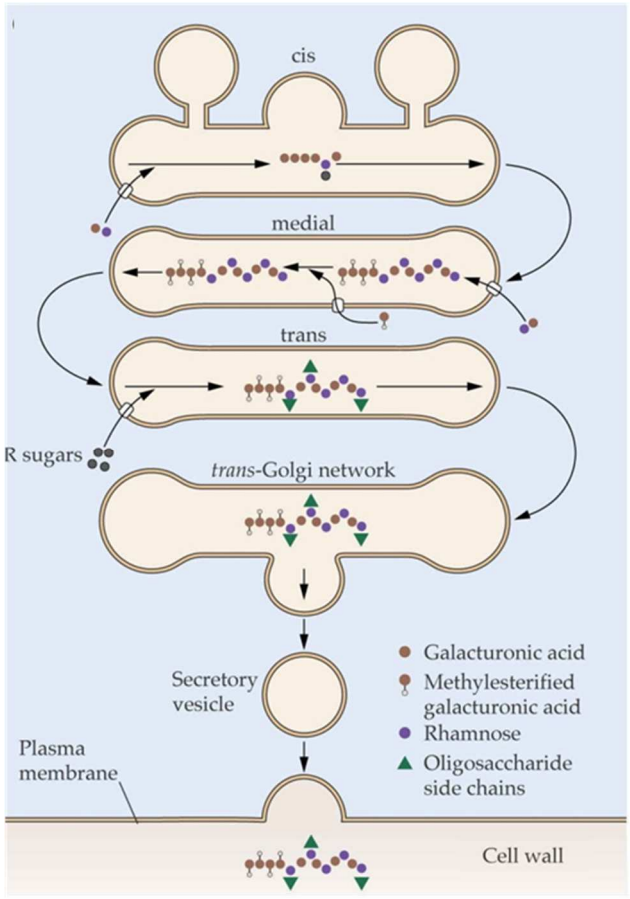


Figure 16 : Modèle de la biosynthèse des pectines dans l'appareil de Golgi.

(Staehelin et Newcomb, 2000)

2.1.4. Les glycoprotéines pariétales

Une multitude de protéines réside dans la matrice extracellulaire. Certaines d'entre elles sont glycosylées dans de fortes proportions. Ces protéoglycanes appartiennent à la grande famille des HRGP (Hydroxyproline-Rich GlycoProteins), et se caractérisent par une ossature polypeptidique riche en hydroxyprolines (Hyp) sur laquelle de larges fragments glycaniques sont insérés par *O*-glycosylation (Showalter,

1993). Ces HRGP sont subdivisées en plusieurs catégories (Kieliszewski *et al.*, 2011). Seules les arabinogalactanes protéines (AGP) et les extensines seront présentées.

Les AGP sont ubiquistes et constituées d'un squelette protéique représentant 1 à 10% de la masse totale. La partie protéique est riche en Hyp/Pro, Ser, Thr et Ala. Suite au séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), les données bioinformatiques ont permis la prédiction de 47 gènes codants pour des AGP classées en quatre catégories : les AGP classiques, les AGP riches en lysines (Lys-rich AGP), les AG peptides et les *fasciclin-like* AGP (Schultz *et al.*, 2002). Une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) membranaire est prédite sur la plupart des séquences de gènes codant les AGP (Ellis *et al.*, 2010). Cette ancre a été caractérisée chez le poirier (Oxley et Bacic, 1999) et la rose (Svetek *et al.*, 1999) et pourrait être clivée sous l'action des phospholipases C ou D et ainsi libérer le protéoglycane dans la matrice extracellulaire (Figure 17).

La partie polysaccharidique représente 90 à 98% du protéoglycane. Les ramifications sont majoritairement des arabinogalactanes de type II (AG II), à savoir, une chaine principale de β-(1→3)-galactane décorée de courtes ramifications de galactanes liées en β-(1→6) terminées par des résidus arabinosyles liés en α-(1→3). Toutefois, les motifs retrouvés peuvent être différents selon les espèces, les tissus et le stade de développement (Seifert et Roberts, 2007). Ainsi, il est possible de retrouver des résidus glucuronosyles et rhamnosyles sur les chaines latérales des AG II voire de l'arabino*pyranose* comme décrit sur une AGP du blé (Tryfona *et al.*, 2010).

Selon le modèle décrit par Ellis *et al.* (2010), la biosynthèse des AGP se déroule dans les compartiments du réticulum endoplasmique pour la partie protéique et de l'appareil de Golgi pour l'ajout des polysaccharides (Figure 17). Dans la cellule végétale la formation de l'ancre GPI est initiée dans le réticulum endoplasmique. Conjointement, les ribosomes vont traduire l'ARNm et libérer la partie protéique dans la lumière du réticulum. Les deux structures, ancre GPI et protéine vont s'associer avant d'être transférées dans l'appareil de Golgi (Ellis *et al.*, 2010). Parallèlement, les prolyl-4-hydroxylases vont convertir les prolines en hydroxyprolines. Ces enzymes seraient localisées au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Yuasa *et al.*, 2005). En dernière étape, les chaines polysaccharidiques vont être ajoutées par *O*-glycosylation dans l'appareil de Golgi. La glycoprotéine sera transférée par les vésicules Golgiennes à la membrane plasmique.

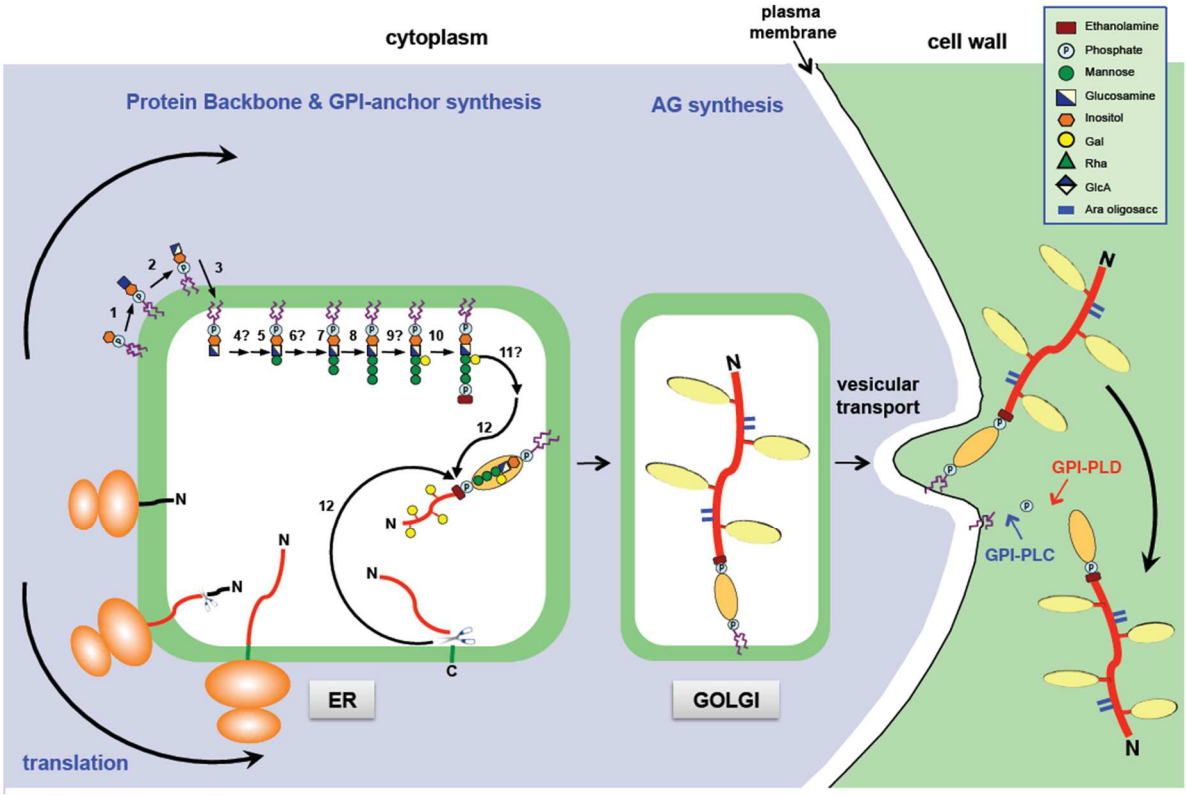


Figure 17 : Les étapes de la biosynthèse des arabinogalactanes protéines.

(Ellis et al., 2010)

Les extensines ont également un corps protéique riche en hydroxyproline puisque environ 40% de la masse molaire provient de cet acide aminé. Ces protéines sont caractérisées par un motif Ser-Hyp$_4$ avec une chaine oligosaccharidique de trois ou quatre arabinosyles sur chacun des Hyp. Ces extensines auraient la faculté de se dimériser de façon non covalente à la condition que le motif Val-Tyr-Lys ne soit pas retrouvé dans la séquence protéique (Kieliszewski et Lamport, 1994 ; Kieliszewski et Shpak, 2001 ; revue par Lamport *et al.*, 2011).

2.2. Fonctions attribuées aux polysaccharides pariétaux

La génétique fonctionnelle, *via* l'utilisation de mutants, associée à des moyens de détection des composés de la paroi par immunohistochimie, spectroscopie en infra-rouge et spectrométrie de masse a largement contribué au criblage de mutants « paroi ». De nombreux gènes ont ainsi été déterminés ayant de possibles fonctions dans la

biosynthèse et le remodelage des polysaccharides et des glycoprotéines pariétales (Willats *et al.*, 2000 ; Carpita et McCann, 2002; Lerouxel *et al.*, 2002).

2.2.1. Les β-glucanes

Les microfibrilles de cellulose sont longues et rigides. Elles entourent les cellules leur assurant une résistance à la pression osmotique. Réciproquement, les pressions créées par la vacuole s'appliquent sur la cellulose permettant de maintenir une pression de turgescence. C'est cette pression qui permet le port dressé des végétaux jeunes et Herbaceae (Cosgrove, 2005 ; Somerville, 2006). Par conséquent, la cellulose possède un rôle central dans la régulation du volume cellulaire et la détermination de la forme et de la taille de la cellule végétale (Bessueille et Bulone, 2008). Perturber la cellulose lors de la mise en place des plaques cellulaires, comme montré chez le mutant *korrigan* (*kor*) déficient en une cellulase, induit la formation de parois incomplètes, avec des cellules polynucléées aboutissant à des plantules sévèrement affectées dans leurs morphologies (Zuo *et al.*, 2000). Enfin, la cellulose confère à la cellule une protection mécanique, première défense contre les pathogènes (Vorwerk *et al.*, 2004). Aujourd'hui, la cellulose est largement étudiée en vue de son utilisation pour la production d'agrocarburant (bioéthanol) de seconde génération (Sims *et al.*, 2010).

La formation de callose intervient dans de nombreux processus de la plante, tels que le renforcement de la paroi suite à l'application de stress biotiques et abiotiques (Chen et Kim 2009). La synthèse de la callose est ainsi observée lorsque la plante est exposée aux ions métalliques cadmium et aluminium (Sivaguru *et al.*, 2000 ; Ueki and Citovsky, 2002), à des pathogènes (Nishimura *et al.*, 2003) ou bien en cas de blessures (Jacobs *et al.*, 2003). La callose est également le composant majoritaire observé lors de la formation des plaques cellulaires lors de la cytokinèse. Le polymère permettrait alors la stabilisation de la membrane, mais ce composé est dégradé afin que les composés de la paroi (cellulose et autres composés pariétaux) se mettent en place (Samuels *et al.*, 1995 ; Staehelin et Hepler, 1996). Enfin, la callose régulerait aussi les mouvements de molécules entre les cellules en contrôlant la taille des pores des plasmodesmes (Revue dans Zavaliev *et al.*, 2011).

2.2.2. Le xyloglucane

Une chaine xyloglucanique peut se lier à plus d'une microfibrille de cellulose par des liaisons non covalentes, reliant et séparant donc les microfibrilles les unes des autres (Hayashi *et al.*, 1987 ; Scheller et Ulvskov, 2010). Comparé à de la cellulose isolée, le composite cellulose-XyG montre une rigidité moindre et une meilleure extensibilité (Whitney *et al.*, 1999). Cette association cellulose-XyG établit en fait une balance entre l'extensibilité et la rigidité nécessaire à la paroi végétale (Whitney *et al.*, 1999). Au final, cette combinaison cellulose-XyG est considérée comme la principale structure porteuse de la paroi (Keegstra *et al.*, 1973 ; Hayashi *et al.*, 1994). Les différents fragments du XyG observés selon les tissus suggèrent que le métabolisme du XyG jouerait par ailleurs un rôle clé dans la croissance et le développement de la paroi primaire (Pauly *et al.*, 2001).

A l'échelle moléculaire, des modélisations semblaient indiquer que le XyG fucosylé se lierait davantage aux microfibrilles de cellulose (Levy *et al.*, 1991 & 1997). En réalité, le fucose ne possèderait qu'un rôle secondaire dans l'établissement des liaisons cellulose-XyG (Whitney *et al.*, 2006), vérifié par l'étude du mutant *mur2*, déficient en fucose, qui ne présente aucun phénotype évident et dont les propriétés mécaniques de la paroi ne sont pas affectées (Vanzin *et al.*, 2002 ; Peña *et al.*, 2004). Il en est tout autre pour le galactose où son absence dans le XyG induit le gonflement des cellules et réduit de 50% les forces de tensions des hypocotyles étiolés (Peña *et al.*, 2004). Ce gonflement est également observé pour les trichoblastes du mutant *reb1-1* (*root epidermal bulger1-1*) qui présente pour seule différence au niveau des polysaccharides complexes d'être dépourvus de chaines galactoses (Nguema-Ona *et al.*, 2006). Le XyG participerait donc au maintien des forces de tensions de certaines cellules (Peña *et al.*, 2004 ; Nguema *et al.*, 2006). *In vitro*, les polymères de XyG dépourvus de galactose auront tendance à s'associer entre eux plutôt qu'à la cellulose, formant un gel (Whitney *et al.*, 2006 ; Freitas *et al.*, 2011). Le fragment α-L-Fuc (1→2)-β-D-Gal (1→) retrouvé sur le XyG est spécifiquement reconnu par une protéine membranaire suggérant un rôle dans la signalisation (Fry, 1993 ; Dunand *et al.*, 2000). Les XyG ont également la capacité de se lier aux pectines acides *via* des liaisons covalentes (Thompson et Fry, 2000 ; Popper et Fry, 2005). Cette association, localisée dans le système *endo*-membranaire, servirait de précurseur pour l'assemblage de la paroi (Popper et Fry, 2008). Néanmoins, l'absence apparente de chaines latérales sur le

glucane chez le mutant *xxt1/xxt2* n'induit pas de phénotype particulier de la plante. Dans ce contexte, le rôle exact du XyG dans la paroi est donc encore incertain (Cavalier *et al.*, 2008 ; Eckardt *et al.*, 2008).

2.2.3. Les pectines

En établissant des structures « boite à œuf », les HG se lient entre eux et rigidifient la paroi (Micheli, 2001 ; Pelloux *et al.*, 2007). La surexpression d'une polygalacturonase chez le pommier entraine une modification de la paroi, où les chaines HG sont plus courtes (Atkinson *et al.*, 2002). Ce changement structural induit une perte prématurée des feuilles due à la diminution de l'adhésion au niveau de la zone d'abscission (Atkinson *et al.*, 2002). De même, des phénotypes nains sont obtenus en exprimant une *endo*-polygalacturonase exogène chez le tabac et Arabidopsis (Capodicasa *et al.*, 2004). L'action de cette enzyme entraine une diminution des HG déméthylestérifiés (Capodicasa *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que les HG déméthylés sont des polymères indispensables pour la croissance des plantes (Capodicasa *et al.*, 2004 ; Caffall et Mohnen, 2009).

Le RG-I semble participer à la rigidification de la paroi. En effet, une paroi riche en chaines galactanes sera deux fois plus rigide qu'une paroi dépourvue de ces chaines (McCartney *et al.*, 2000). A l'inverse, dans les stomates, les chaines arabinanes réduiraient la rigidification de la paroi en empêchant l'association des HG (Jones *et al.*, 2003 ; Caffall et Mohnen, 2009).

Le RG-II contribuerait également à la rigidification de la paroi *via* la formation de dimères. Chez le mutant *mur1-1* et *gme* (*GDP-d-mannose 3, 5-epimerase*), l'absence respective de fucose ou de L-galactose provoque une diminution de cette dimérisation et induit un phénotype nain (O'Neill *et al.*, 2001 ; Voxeur *et al.*, 2011). Dans les deux cas, la complémentation de ce mutant avec du bore restitue le phénotype sauvage suggérant que le développement de la plante dépend de l'organisation du réseau pectique et de la dimérisation du RG-II (O'Neill *et al.*, 2001 ; Voxeur *et al.*, 2011). De même, l'absence d'acide glucuronique sur la chaine A du RG-II altère la dimérisation et entraine une perte d'adhésion des cellules en suspension chez le tabac (Iwai *et al.*, 2002).

Les pectines servent également de barrière physique et de signalisation dans la défense des plantes (Vorwerk *et al.*, 2004 ; Caffall et Mohnen, 2009). Les

oligosaccharides pectiques ont des propriétés élicitrices et induisent par exemple l'accumulation de phytoalexines, antibiotique végétal, dans les cotylédons (Hahn *et al.*, 1981 ; Davis *et al.*, 1986 ; Cabrera *et al.*, 2008).

Les pectines sont également impliquées dans l'adhésion cellulaire (Caffall et Mohnen, 2009). Les interactions alors mises en place sont détaillées dans le chapitre « Adhésion cellulaire ».

2.2.4. Les glycoprotéines pariétales

De nombreuses fonctions sont attribuées aux glycoprotéines pariétales de type AGP et extensine. Les AGP participent à la signalisation (Schultz *et al.*, 1998 ; Sun *et al.*, 2004), à l'expansion des plantules d'Arabidopsis (Willats et Knox, 1996), au contrôle de la morphologie cellulaire (Andeme-Onzighi *et al.*, 2002) ainsi qu'au développement de la plante (Acosta-Garcia et Vielle-Calzada, 2004 ; Lee *et al.*, 2005).

Dans l'architecture de la cellule, les AGP interagissent avec les réseaux d'actines et de microtubules (Sardar *et al.*, 2006 ; Nguema-Ona *et al.*, 2007). Les AGP sont également impliquées dans les interactions avec les microorganismes. La protéine *At*AGP17 est requise pour que *Agrobacterium tumefaciens* puisse adhérer à la surface de la racine (Gaspar *et al.*, 2004). Similairement, la perturbation des AGP à l'aide du Yariv phénylglucoside, réactif cytochimique capable de les précipiter spécifiquement, empêche l'interaction cellule-bactérie à la surface de cellules apparentées aux cellules bordantes de la racine d'*Arabidopsis thaliana* (Vicré *et al.*, 2005). Finalement, le traitement de cellules en suspension par le Yariv phénylglucoside induit la mort cellulaire programmée (Gao et Showalter, 1999).

Plusieurs fonctions ont été attribuées aux extensines. Ainsi, un mutant dépourvu d'une glycosyltransférase impliquée dans l'ajout de l'arabinose sur le corps protéique présente des défauts d'élongation (Gille *et al.*, 2009). Le gène *LRX1* (*LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN1*) code une protéine, contenant un domaine extensine, requise pour la morphogénèse des poils absorbants chez *Arabidopsis thaliana* (Baumberger *et al.*, 2001). Des mutations dans les gènes codant des prolyl-4-hydroxylases, qui définissent les sites de *O*-glycosylation, provoquent l'inhibition de la croissance des poils absorbants (Velasquez *et al.*, 2011). La *O*-glycosylation a donc un rôle essentiel dans les fonctions des HRGP (Velasquez *et al.*, 2011). Il a également été suggéré que les extensines

participent à l'assemblage de la paroi lors de la formation des plaques cellulaires. Les charges positives des extensines interagiraient avec les charges négatives des pectines formant un complexe initiateur afin de poursuivre l'assemblage pariétal (Cannon *et al.*, 2008). Enfin, les extensines participent aux mécanismes de défense (Kieliszewski *et al.*, 2011). En présence d'un pathogène, les proportions des HRGP et extensines sont augmentées (Esquerre-Tugaye *et al.*, 1979) et la surexpression d'une extensine endogène réduit considérablement la propagation d'un pathogène virulent (Wei et Shirsat, 2006).

2.3. La paroi des tubes polliniques

Le tube pollinique est une cellule à croissance rapide dont on peut suivre l'expansion de la paroi lors de l'élongation cellulaire. De ce fait, le tube pollinique est considéré comme un système modèle pour l'étude de la biosynthèse et le remodelage de la paroi (Malho, 2006 ; Geitmann, 2010)

Les tubes polliniques présentent, *in vivo* et *in vitro*, une double paroi. La paroi interne est essentiellement composée de callose et d'AGP, alors que la paroi externe montre la présence d'épitopes pectiques (Li *et al.*, 1995 ; Roy *et al.*, 1997 ; Ferguson *et al.*, 1998 ; Hasegawa *et al.*, 2000 ; Lennon et Lord, 2000 ; Derksen *et al.*, 2002).

Les données transcriptomiques ont montré que les proportions de gènes exprimés entre les tissus végétatifs et les grains de pollen sont variables. Néanmoins, dans la catégorie métabolisme de la paroi, le pourcentage exprimé reste similaire, à hauteur de 3% (Becker et Feijo, 2007). Ainsi, comparé à une cellule végétative, un nombre de gènes équivalent serait requis pour former la paroi des tubes polliniques.

2.3.1. Les β-glucanes

Comparativement aux cellules des organes végétatifs, les tubes polliniques se composent majoritairement de callose, et de peu de cellulose (Rae *et al.*, 1985 ; Schlüpmann *et al.*, 1994). Néanmoins, la cellulose est requise pour une croissance normale des tubes polliniques. Les mutants *csld1* et *csld4* (*cellulose synthase-like D*) montrent une réduction de la quantité de cellulose ainsi qu'une désorganisation des

tubes polliniques, définie par une instabilité de la zone apicale, provoquant la rupture des tubes (Wang *et al.*, 2011). De plus, la cellulose est présente sur l'ensemble du tube, y compris dans la région apicale. La rigidité de ce polymère pourrait permettre de réguler le diamètre des tubes polliniques (Aouar *et al.*, 2010).

La callose est retrouvée dans les bouchons et dans la paroi interne des tubes polliniques, excepté dans la zone apicale (Meikle *et al.*, 1991 ; Ferguson *et al.*, 1998). Malgré son caractère amorphe, la callose des tubes polliniques semble résister aux stresses provoqués par la tension de la cellule (Parre et Geitmann, 2005a). Il est difficile de savoir quelle est l'importance de la callose dans les tubes polliniques. Des mutants n'exprimant plus la protéine CALS5 (CALLOSE SYNTHASE 5) ont conduit à deux observations distinctes. Dans la première étude, il semblerait que la callose soit indispensable à la formation de l'exine et à la viabilité du gamétophyte (Dong *et al.*, 2005). La seconde étude tend à prouver l'inverse en démontrant que l'absence de callose et de bouchons de callose ne perturbe pas les tubes qui atteignent des longueurs similaires à celles observées chez le sauvage. *In vivo*, la production de graines n'est pas non plus altérée (Nishikawa *et al.*, 2005).

2.3.2. Les hémicelluloses

Peu d'informations sont disponibles concernant les hémicelluloses des tubes polliniques (Geitmann et Steer, 2006). Les analyses des fractions alcalines issues des tubes polliniques du camélia dévoilent majoritairement la présence de glucose ce qui a conduit Nakamura et Suzuki (1981) a suggérer la présence de chaines homoglucaniques. Les études similaires sur le tabac suggèrent aussi la présence de XyG (Schlüpmann *et al.*, 1994). Des immunomarquages réalisés avec l'anticorps CCRC-M1 reconnaissant un épitope fucosylé associé au XyG, ont montré la présence de cet épitope sur des tubes polliniques d'Arabidopsis et d'autres espèces (Freshour *et al.*, 2003 ; Geitmann et Steer, 2006).

2.3.3. Les pectines

Les composés pariétaux sont exocytés au niveau de la zone apicale du tube pollinique (Lancelle et Hepler, 1992). Les HG méthylestérifiés, sécrétés par les vésicules Golgiennes sont retrouvés dans la zone apicale du tube comme indiqué par le marquage

avec JIM7, anticorps reconnaissant des épitopes associés au HG fortement méthylestérifiés (Jauh et Lord, 1996). Une fois dans la paroi, les pectines subiraient une déméthylation controlée par les PME et les HG faiblement méthylestérifiés sont détectables avec JIM5 en arrière de l'apex (Li *et al.*, 1994 ; Mollet *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2005 ; Bosch et Hepler, 2005). Cette configuration des HG participe aux propriétés mécaniques de la paroi. Le polymère estérifié à l'apex n'est pas sensible aux pectinases, et en l'absence de callose, permet au tube de résister aux tensions établies par la membrane plasmique. En arrière de l 'apex, les HG déméthylés se lient par des liaisons calciques, rigidifiant la paroi (Parre et Geitmann, 2005b).

Les tubes polliniques sont riches en chaines latérales du RG-I. Les analyses monosaccharidiques et celles de leurs liaisons ont montré, chez le camélia, une grande proportion de α-(1→5)-arabinose et de β-(1→4)-galactose (Nakamura et Suzuki, 1981). La paroi des tubes polliniques de tabac semble être aussi riche en chaines arabinanes, mais pas en galactanes (Rae *et al.*, 1985).

Le RG-II est également présent et semble avoir un rôle important dans la germination et la croissance du tube pollinique. En effet, la mutation du gène codant une Kdo synthase, empêche la germination des tubes polliniques, et par conséquent induit une stérilité mâle (Delmas *et al.*, 2008). Une mutation dans le gène *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 4* (*MGP4*) codant une glycosyltransférase impliquée dans la biosynthèse du RG-II réduit considérablement la croissance des tubes polliniques (Liu *et al.*, 2011). Enfin, le mutant homozygote *cks* (*cmp-kdo synthetase*), impliqué dans l'activation du Kdo en nucléotide-sucre, n'a pu être obtenu (Kobayashi *et al.*, 2011). Le mutant hétérozygote, quant à lui, possède des tubes polliniques dont l'élongation est inhibée (Kobayashi *et al.*, 2011).

2.3.4. Les glycoprotéines pariétales

Parmi les protéines prédites avec une ancre GPI, 11 seraient « pollen spécifiques » et putativement associées à la membrane plasmique (Lalanne *et al.*, 2004). Les gènes *SETH1* et *SETH2* sont impliqués dans les premières étapes de la biosynthèse des ancres GPI. La mutation de ces gènes affecte la germination du pollen et la croissance des tubes (Lalanne *et al.*, 2004). Les protéines pariétales ont donc un rôle capital dans le développement des tubes polliniques.

Des études immunocytochimiques ont dévoilé la présence des AGP dans les tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana*. Les anticorps utilisés lors de ces études ont spécifiquement localisés les épitopes dans l'apex ainsi que dans la zone d'émergence du tube pollinique (Pereira *et al.*, 2006). Des analyses transcriptomiques complémentaires ont révélé chez cette même espèce, deux AGP qui semblent être spécifiques du pollen, AGP6 et AGP11 (Pereira *et al.*, 2006). Le double mutant *agp6/11* présente de nombreux grains de pollen avortés (Coimbra *et al.*, 2009). Le taux de germination est réduit de 80% par rapport au pollen sauvage et les tubes polliniques ont une longueur inférieure de 35% (Coimbra *et al.*, 2010). Chez le lys, les AGP sont également localisées à l'apex du tube (Jauh et Lord, 1996). Les tubes polliniques du lys et du chérimolier, traités au Yariv phénylglucoside, ont une croissance inhibée. Ce phénomène est réversible si l'on enlève le Yariv du milieu de culture (Mollet *et al.*, 2002). Un nouveau tube émerge alors en arrière de l'apex. Le nouveau site d'émergence est prédictible par la sécrétion localisée d'AGP. Ces données suggèrent que les AGP pourraient avoir un rôle dans la polarisation initiale et l'élongation des tubes polliniques (Cheung et Wu, 1999 ; Mollet *et al.*, 2002).

Les parois des tubes polliniques du maïs sont également riches en AGP et extensines (Rubinstein *et al.*, 1995b ; Sommer-Knudsen *et al.*, 1997). Parmi les extensines, le gène *PEX1* (*POLLEN EXTENSIN-LIKE 1*) est spécifiquement retrouvé dans le pollen. Il code une protéine significativement plus riche en motifs extensines (Ser-Hyp_4) que les autres HRGP (Rubinstein *et al.*, 1995a). La protéine est retrouvée dans la paroi interne du tube pollinique, avec la callose. Bien que sa fonction exacte n'ait pas été élucidée, il a été suggéré que *PEX1* pouvait avoir une fonction dans le développement du tube pollinique (Rubinstein *et al.*, 1995c).

3. L'adhésion cellulaire

Alors que les mécanismes d'adhésion sont relativement bien connus chez les cellules animales (Harwood et Coates, 2004), peu d'information est disponible chez les végétaux bien que plusieurs mécanismes aient été observés. Le premier permet l'adhésion de la membrane plasmique à la paroi. Plusieurs molécules, telles que les *plant vitronectin-like* ont été impliquées dans ce rôle (Zhu *et al.*, 1994). Le second se doit d'établir une cohésion entre les cellules. Celle-ci est établie par les jonctions cellulaires et la lamelle moyenne. Le troisième type est une adhésion active et nécessite un contact

de novo d'une cellule avec une autre cellule. C'est cette adhésion que l'on retrouve lors de la reproduction sexuée où le grain de pollen doit adhérer tout d'abord au stigmate afin d'établir un continuum pour pouvoir germer, puis au cours de la croissance du tube pollinique dans le tissu de transmission (Lennon *et al.*, 1998 ; Zinkl *et al.*, 1998). Dans tous les cas, la première interface de contact entre les deux cellules végétales reste la paroi (Jarvis *et al.*, 2003 ; Driouich *et al.*, 2007 ; Pelloux *et al.*, 2007 ; Wolf *et al.*, 2009).

3.1. Adhésion au niveau des jonctions cellulaires

L'adhésion des cellules végétales n'est pas un processus actif et est établie dès la mise en place de la paroi lors des mitoses (Knox, 1992). C'est la matrice extracellulaire végétale, parmi les nombreux rôles qui lui sont associés, qui constitue les espaces et les jonctions intercellulaires (Knox, 1992). La formation de la paroi après cytokinèse entraîne la formation de la lamelle moyenne ainsi que des jonctions inter-cellulaires qui permettent cet attachement cellule-cellule (Jarvis *et al.*, 2003 ; Waldron et Brett, 2007).

3.1.1. Implication des pectines dans l'adhésion cellulaire

Du fait de leurs localisations ubiquistes chez les végétaux, les pectines sont largement mises en avant dès lors que l'on parle de l'adhésion cellulaire (Brett et Waldron, 1996). De plus, la lamelle moyenne est majoritairement constituée de HG (Ridley *et al.*, 2001), ce qui en fait un candidat plausible pour former les cohésions intercellulaires (Waldron et Brett, 2007).

L'utilisation de mutants a permis de conforter l'implication des pectines comme un des facteurs responsables de l'adhésion intercellulaire. On observe ainsi chez le mutant *quasimodo1*, une perte de la cohésion intercellulaire des hypocotyles, des tissus vasculaires, des cals ou encore des cellules bordantes de la coiffe racinaire (Bouton *et al.*, 2002 ; Leboeuf *et al.*, 2005 ; Orfila *et al.*, 2005 ; Durand *et al.*, 2009). *QUA1* est un gène de la famille des glycosyltransférases (GT8) et est également dénommé aujourd'hui *GAUT8* codant une galacturonosyltransférase, qui pourrait être impliquée dans la biosynthèse des HG (Yin *et al.*, 2011). Comparativement à la plante sauvage, le mutant *qua1* présente une diminution de 25% de l'acide galacturonique, monosaccharide principal des HG

(Bouton *et al.*, 2002). De même, le mutant *emb30* (appelé aussi *gnom*) montre une perte d'adhésion cellulaire dans des cals et les feuilles. Chez ce mutant, seuls les épitopes d'HG faiblement méthylestérifiés de la paroi sont anormalement localisés et sont principalement retrouvés dans les espaces interstitiels définis entre les cellules et non dans les jonctions cellulaires (Shevell *et al.*, 2000). Or, les HG déméthylestérifiés sont des pectines généralement localisées au sein de la lamelle moyenne, et ce, quelques soient les tissus ou les organismes étudiés (Ridley *et al.*, 2001). Le mutant *tumorous shoot development 2* (*tsd2*) présente une perte de l'adhésion cellulaire dans les apex caulinaires, les hypocotyles et les jeunes feuilles (Frank *et al.*, 2002). Plus récemment, ce phénotype a été attribué à un gène muté codant une pectine méthyltransférase putative (Krupkova *et al.*, 2007). Un autre mutant, *ectopically parting cells1* (*epc1*), montre une déficience sévère de l'adhésion cellulaire et une réduction significative du contenu en galactose dans la paroi (Singh *et al.*, 2005). Du fait des similitudes de séquences, les auteurs décrivent le gène *EPC1* comme étant une glycosyltransférase de la famille GT64 (Singh *et al.*, 2005). Deux années plus tard, une lignée mutante supplémentaire, *epc1-2*, ne montre aucun phénotype dans l'adhésion cellulaire mais confirme une réduction de 50% des galactanes (Bown *et al.*, 2007).

D'autres composés pectiques sont également suspectés d'intervenir dans l'adhésion cellulaire. Ainsi, chez le mutant *nolac-H14* (*non-organogenic callus with loosely attached cells*) issu d'une suspension cellulaire de *Nicotiana plumbaginifolia* (Iwai *et al.*, 2001) ou chez le mutant *cnr* (*colorless non-ripening*) de *Solanum lycopersicum* (Orfila *et al.*, 2001), les chaines arabinanes du RG-I sont modifiées. Il est alors constaté une nette diminution de l'adhésion cellulaire dans les cals ou les péricarpes. Au cours de la maturation de la pomme, la perte des chaines arabinanes s'accompagne d'une perte de la structure du fruit et d'une augmentation de la séparation cellulaire (Peña et Carpita, 2004). Enfin, une perte d'adhésion cellulaire a été observée chez des microcals d'*Arabidopsis thaliana* au cours du temps, ainsi qu'entre deux variétés de tomates, et l'on observe dans les deux cas une variation dans les proportions des galactanes et arabinanes (Leboeuf *et al.*, 2004 ; Devaux *et al.*, 2005). Ces résultats semblent indiquer que les chaines latérales du RG-I auraient aussi un rôle dans l'adhésion et la cohésion cellulaire (Peña et Carpita, 2004).

Cependant, les pectines localisées dans la lamelle moyenne sont caractérisées par de faibles proportions, voire par l'absence de chaines latérales du RG-I et RG-II

(Williams *et al.*, 1996 ; Jones *et al.*, 1997 ; Matoh *et al.*, 1998 ; Willats *et al.*, 1999 ; Jarvis *et al.*, 2003). Ainsi, ces polymères pectiques pourraient avoir une fonction indirecte dans l'adhésion cellulaire à travers les liaisons transversales établies avec les autres composés pariétaux comme les XyG (Waldron et Brett, 2007 ; Popper et Fry, 2008).

3.1.2. Autres molécules pariétales impliquées dans l'adhésion

Des protéines ainsi que des composés phénoliques sont également retrouvés dans la lamelle moyenne d'espèces végétales diverses (Carpita et Gibeaut, 1993 ; Kato *et al.*, 1994 ; Jarvis *et al.*, 2003 ; Guillon *et al.*, 2011).

Le composé phénolique qui aurait un rôle dans l'adhésion cellulaire est l'acide férulique qui possède la faculté de créer des liaisons esters (et donc covalentes) avec les polysaccharides et plus spécifiquement avec l'arabinose (Waldron et Brett, 2007). Les polymères prédisposés à se dimériser *via* l'acide férulique sont les arabinoxylanes (Scheller et Ulvskov, 2010), mais également les chaines arabinogalactanes des pectines (Fry, 1982). Ces liaisons ont un rôle avéré dans l'adhésion intercellulaire (Waldron et Brett, 2007).

Certaines protéines, et plus spécifiquement les protéines disposant de domaines fasciclines, ont aussi des propriétés adhésives reconnues chez la drosophile et l'algue Volvox (Elkins *et al.*, 1990 ; Huber et Sumper, 1994). De tels domaines sont retrouvés dans des protéines végétales pariétales telles que les arabinogalactane protéines (FLA, *fasciclin-like agp*), suggérant leur implication potentielle dans l'adhésion des cellules végétales (Gaspar *et al.*, 2001 ; Johnson *et al.*, 2003). D'ailleurs, une mutation dans un gène codant une de ces protéines chez *salt overly sensitive5* (*sos5*) provoque une perte de l'adhésion cellulaire, car la paroi apparaît désorganisée et présente une forte altération de la lamelle moyenne (Shi *et al.*, 2003).

3.2. Adhésion cellulaire au cours de la reproduction sexuée

3.2.1. Adhésion grain de pollen-stigmate

L'adhésion des grains de pollen est dépendante du type de stigmate. En effet, chez Arabidopsis, possédant un stigmate sec, les grains de pollen vont tout d'abord adhérer très rapidement à la surface des papilles stigmatiques *via* l'exine (Zinkl et al 1999). Une

fois l'exine au contact des papilles, l'adhésion se renforce grâce au mouvement des protéines du manteau pollinique « pollen coat conversion » en formant un pied d'attachement (Figure 18, Kandasamy *et al.*, 1994 ; Luu *et al.*, 1999). Ce mécanisme semble être très spécifique car l'adhésion du pollen de pétunia sur un stigmate d'Arabidopsis est très faible comparée à celle des grains de pollen d'Arabidopsis (Zinkl *et al.*, 1999). Dans le stigmate, les lipides et les protéines auraient un rôle important car un traitement du stigmate avec la protéinase K ou un mélange formaldéhyde-éthanol-acide acétique pour s'affranchir de ces molécules, conduit à une diminution significative de l'adhésion des grains de pollen (Luu *et al.*, 1997 ; Heizmann *et al.*, 2000).

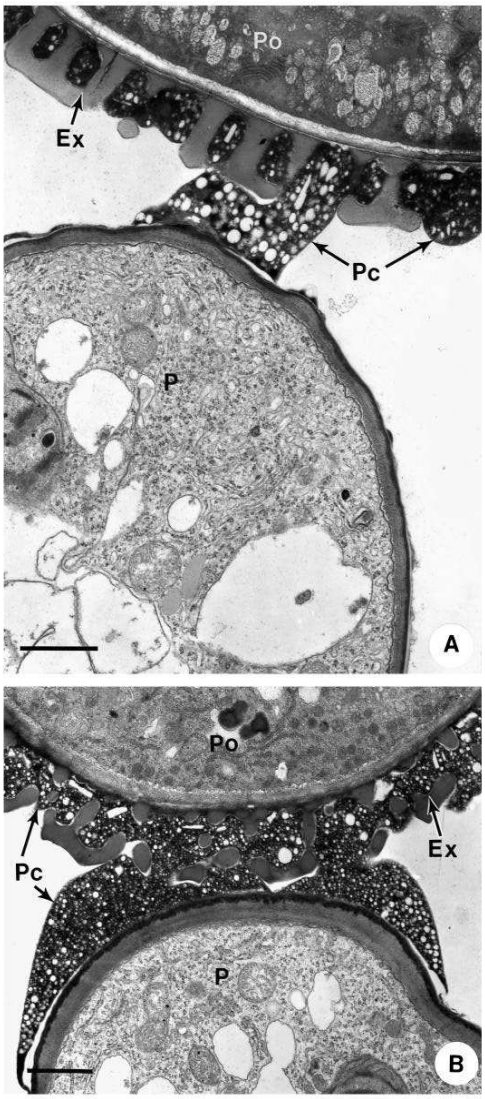


Figure 18 : Micrographie électronique à transmission montrant la formation du pied d'attachement entre un grain de pollen d'Arabidopsis et une papille stigmatique.

Ex : exine ; Pc : manteau pollinique (pollen coat) ; Po : pollen ; P : papille.

(Kandasamy et al., 1994).

A l'inverse, les grains de pollen devant adhérer sur un stigmate humide n'ont pas besoin de former un pied d'attachement. L'intense couche d'exsudats sécrétée par ce type de stigmate permet ainsi une adhésion passive (Clarke *et al.*, 1979). Par conséquent, la spécificité de l'adhésion est moindre (Swanson *et al.*, 2004).

3.2.2. Adhésion des tubes polliniques

In vivo, l'adhésion des tubes polliniques sur les cellules du tissu de transmission a été montrée chez les plantes à style creux (lys) et à style plein (*Arabidopsis thaliana)* grâce à des observations en microscopie électronique à transmission et à balayage (Jauh *et al.*, 1997 ; Lennon *et al.*, 1998 ; Lord, 2001). En plus de favoriser la croissance des tubes polliniques, l'adhésion permettrait aussi un guidage jusqu'aux ovules (Lord, 2003) sous l'action combinée de la matrice extracellulaire et de molécules chemotropiques (Johnson et Lord, 2006).

Les travaux sur l'adhésion des tubes polliniques se sont principalement basés sur le modèle du lys. Les premiers travaux menés *in vitro* ont permis la mise au point d'un test d'adhésion des tubes polliniques sur une matrice composée dans un premier temps des exsudats isolés de styles (Jauh *et al.*, 1997). Ces mêmes extraits traités thermiquement, afin d'inactiver les éventuelles protéines présentes, n'ont pas affecté les propriétés adhésives, suggérant l'implication des polysaccharides (Jauh *et al.*, 1997). Pourtant, la première molécule isolée des exsudats de stigmates et de styles est une protéine apparentée à la famille des LIPID TRANSFER PROTEIN (LTP-like) (Park *et al.*, 2000). Les LTPs sont de petites protéines thermostables, riches en cystéines, impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que le transport de lipides, les mécanismes de défenses, l'élongation de la paroi, la croissance des tubes polliniques ou encore dans la reproduction des plantes (Garcia-Olmedo *et al.*, 1995 ; Kader *et al.*, 1997 ; Nieuwland *et al.*, 2005 ; Chae *et al.*, 2009 ; Chae *et al.*, 2010 ; Chae et Lord, 2011). Cette LTP-like a une taille de 9 kDa, est stable à haute température et a été nommée SCA pour *Stigma/Style Cystein-rich Adhesin* (Mollet *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2000 ; Mollet *et al.*, 2007). Plusieurs isoformes, SCA1 et SCA3, ayant une activité d'adhésion dépendante du pH ont été isolées (Chae *et al.*, 2007). Néanmoins, l'adhésion n'a été possible qu'en ajoutant à la protéine SCA, un broyat de pétales de fleurs suggérant que l'adhésion ne peut-être assurée par cette seule LTP (Park *et al.*, 2000). Peu de temps après la

découverte de ces SCA, des extraits pariétaux isolés des styles de fleurs de lys ont montré l'importance des HG faiblement méthylestérifiés dans l'adhésion des tubes polliniques (Mollet *et al.*, 2000). Grâce à la technologie « *quantum dot* », l'apport exogène de la protéine SCA marquée avec des nanoparticules fluorescentes révèle que cette protéine est détectée dans la paroi des tubes polliniques du lys *in vitro* (Ravindran *et al.*, 2005). Ainsi, les protéines SCA et les pectines présentes à la fois dans la paroi des tubes polliniques et de l'épiderme du tissu de transmission seraient intimement liées par des liaisons ioniques permettant l'adhésion des tubes polliniques sur leur support (Figure 19) (Lord, 2000 ; Chae *et al.*, 2007 ; Mollet *et al.*, 2007 ; Chae et Lord, 2011).

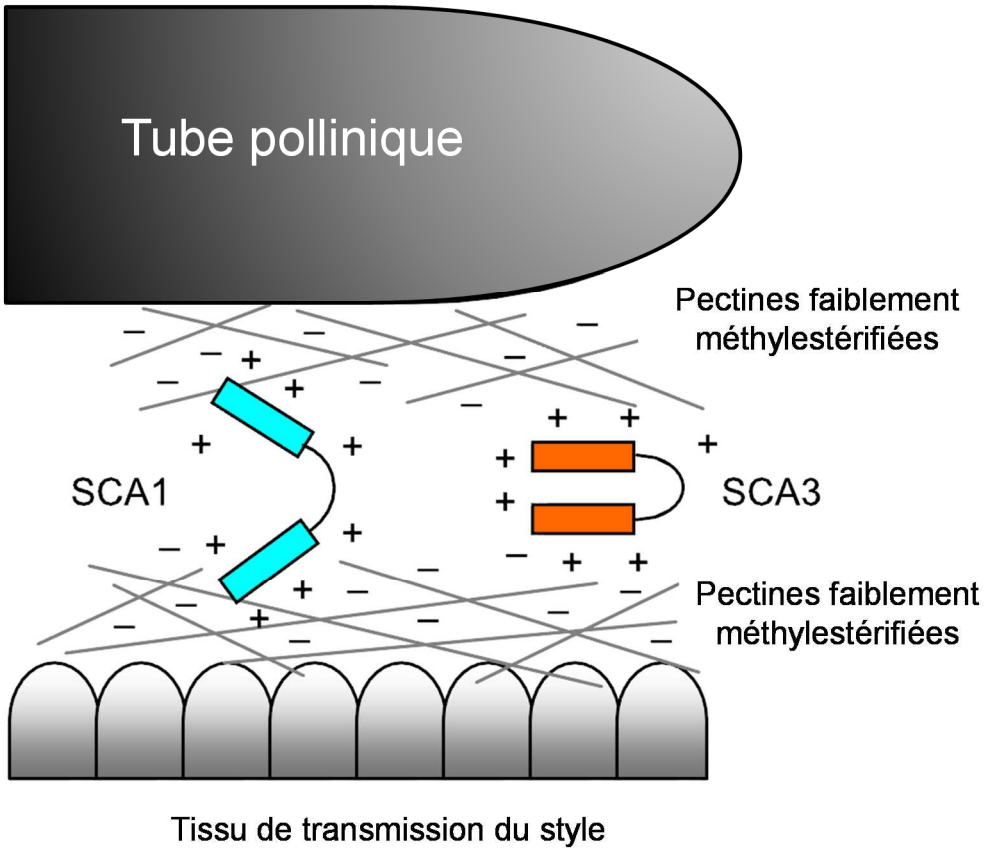


Figure 19 : Modèle d'interaction possible entre les protéines SCA et les pectines faiblement méthylestérifiées conduisant à l'adhésion des tubes polliniques sur le tissu de transmission.

(D'après Chae et al., 2007)

Cette protéine SCA a également la capacité de promouvoir l'adhésion de protoplastes de grains de pollen du lys en cours de régénération pariétale (Zhao *et al.*, 2004b). Par ailleurs, la présence importante d'AGP dans le stigmate et le style (Clarke *et al.*, 1979) ainsi que leurs capacités à adhérer aux tubes polliniques, suggèrent que ces glycoprotéines pourraient également avoir un rôle dans l'adhésion (Cheung, 1995 ; Zhao *et al.*, 2004b).

4. La génétique chimique

4.1. Principe

La génétique chimique consiste en l'utilisation de petites molécules, généralement inférieures à 700 Da, afin d'explorer des processus biologiques et définir les fonctions de protéines cibles (Shrogen-Knaak *et al.*, 2001 ; McCourt et Desveaux, 2010). Cette méthodologie est très largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique dans le but de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques en utilisant les techniques de criblage à haut-débit (*High Throughput Screening*, HTS). Cette technique n'a été introduite dans le monde académique que très récemment (depuis les années 90) (Mitchison, 1994 ; Schreiber, 1998 ; Walsh et Chang, 2006), et son utilisation dans le domaine végétal est encore plus tardive (McCourt et Desveaux, 2010). Pourtant le modèle végétal, et plus particulièrement *Arabidopsis thaliana*, possède de nombreux avantages pour être étudié *via* la génétique chimique (Blackwell et Zhao, 2003 ; McCourt et Desveaux, 2010). En effet, toutes les molécules impliquées dans la régulation de la croissance végétale sont de petites molécules (Roberts et Hooley, 1988). Ensuite, le séquençage complet d'Arabidopsis permet l'utilisation de nombreux outils génétiques (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Enfin, les végétaux sont connus pour assimiler facilement minéraux et nutriments et par conséquent, les petits composés chimiques (Blackwell et Zhao, 2003).

4.2. Méthodologie

L'approche par génétique chimique peut être comparée à celle de la génétique classique comme le montre la figure 20.

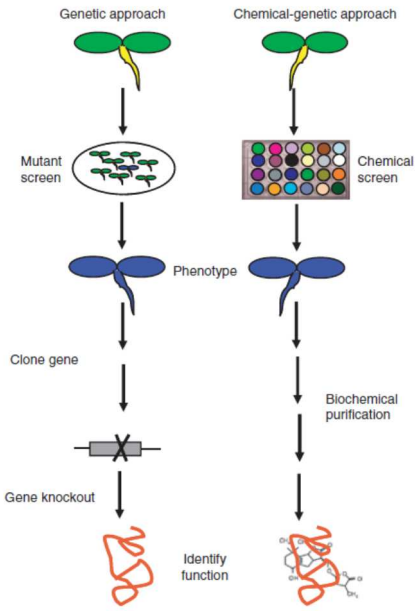


Figure 20 : Comparaison entre les méthodes de génétique fonctionnelle classique et génétique chimique.

(McCourt et Desveaux, 2010)

Les différences résident essentiellement lors du dépistage phénotypique où le criblage des molécules remplace le criblage de mutants, ainsi que sur les méthodes d'identification de la cible (Stockwell 2000, 2004).

Tableau 2 : Comparaison entre les approches directes et inverses en génétiques classique ou chimique.

(Adapté de Stockwell, 2000)

Génétique directe		Génétique inverse	
Approche par génétique classique	Approche par génétique chimique	Approche par génétique classique	Approche par génétique chimique
Mutagénèse aléatoire	Ajout de molécules sur l'organisme à étudier	Mutation d'un gène d'intérêt (*e.g.* par *knock-out*)	Déterminer les molécules se liant à des protéines purifiées d'intérêts.
Sélection de mutant avec un phénotype d'intérêt	Sélection des molécules produisant un phénotype d'intérêt	Générer des organismes possédant le gène muté	Ajouter la molécule qui lie la protéine à l'organisme étudié
Identification du gène muté	Identification de la protéine qui se lie à la molécule	Observer le phénotype	Observer le phénotype

La génétique classique nécessite la modification du gène d'intérêt *via* le génie génétique en « éteignant » ce dernier par *knock-out,* par exemple. A l'inverse, la génétique chimique s'intéresse plutôt au produit de l'expression de ce gène en altérant l'activité de la protéine (Walsh et Chang, 2006).

Comme pour la génétique classique, on retrouve des approches directes ou inverses. Les procédures se décrivent en 3 étapes pour mener à l'identification de la cible, comme décrit dans le Tableau 2 et la figure 21 (Asami *et al.*, 2003 ; Walsh et Chang, 2006 ; Kashani et Van der Hoorn, 2007).

Les tests en génétique chimique directe peuvent se réaliser sur un organisme entier, des tissus ou encore à l'échelle cellulaire (Agee et Carter, 2009) ; l'idéal étant de travailler dans des plaques à puits permettant l'utilisation d'outils et d'infrastructures de criblages (Hicks et Raikhel, 2009 ; McCourt et Desveaux, 2010).

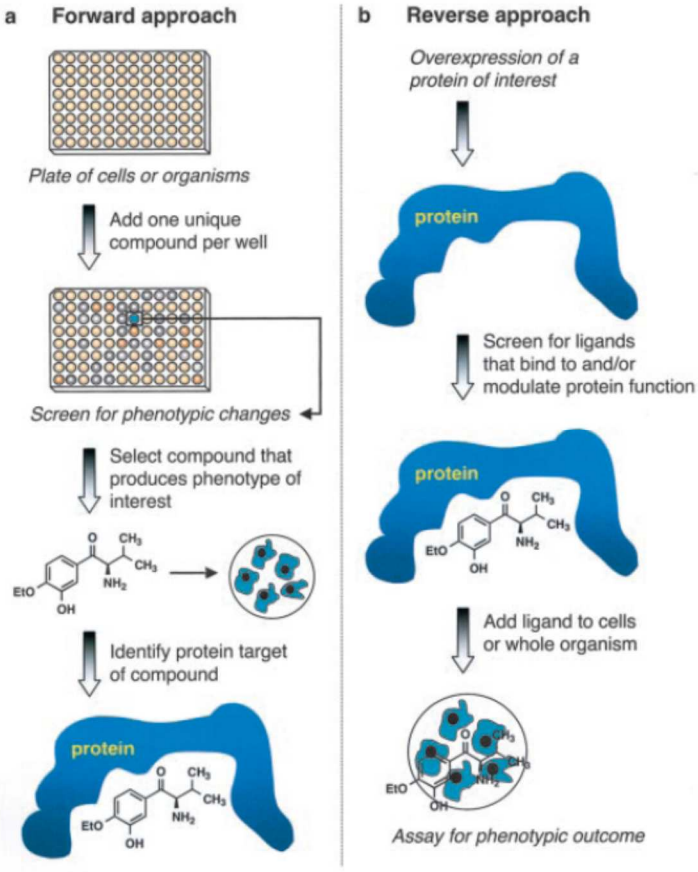


Figure 21 : Illustration des approches directes et inverses en génétique chimique.

(Blackwell et Zhao, 2003)

4.3. Les outils de la génétique chimique

Avant de pouvoir mener des expériences de génétiques chimiques, plusieurs outils sont nécessaires : une chimiothèque et un test biologique robuste, fiable et rapide.

4.3.1. La librairie de produits

La chimiothèque est une collection formatée de molécules chimiques diverses qui seront testées lors d'un projet établi (Sylvain Rault, CERMN Université de Caen, communication personnelle). Toute personne gérant cette librairie de molécules est appelée un chimiothécaire. Les molécules de la chimiothèque sont soit synthétisées chimiquement soit extraites d'organismes divers et donc d'origine naturelle. Dans le second cas, lorsqu'il s'agit d'un mélange de molécules non purifiées, on utilisera préférentiellement le terme extractothèque plutôt que chimiothèque. Il conviendra alors de déterminer quelle molécule est véritablement responsable du phénotype observé. Il existe enfin les molécules apparentées aux produits naturels mais qui ont été synthétisées par voie chimique (Walsh et Chang, 2006).

La diversité de synthèse de produit est considérable. Ainsi, avec 30 alkynes, 62 amines et 62 acides carboxyliques, il est possible de synthétiser près de 2 millions de composés (Walsh et Chang, 2006). Néanmoins, parmi ceux-ci, de très nombreuses molécules peuvent avoir une forte ressemblance structurale dans une seule librairie. Pour réduire le nombre de molécules à cribler, des chimiothèques essentielles ont été élaborées afin de représenter la diversité de l'ensemble d'une collection. Elles sont constituées de « chefs de familles » où une molécule représente l'ensemble de ses dérivés. Dans le cas où un chef de famille se conduit en *hit* (composé induisant le phénotype d'intérêt), l'ensemble des molécules de la famille sera alors testé (S. Rault, communications personnelles).

Plusieurs entreprises se sont spécialisées dans la production et la vente de chimiothèques telles que Peakdale®, ChemDiv™ ou ChemBridge®. Mais il existe également des programmes internationaux tels que l'ICBG (*International Cooperative Biodiversity Groups*) qui finance des projets pour isoler des molécules naturelles, et dispose donc d'une grande bibliothèque de produits naturels (Beattie *et al.*, 2005). A

l'échelle nationale, les laboratoires académiques ont regroupé leurs molécules (naturelles, synthétiques, extraits, *etc*) *via* la chimiothèque nationale afin d'en promouvoir la valorisation scientifique et industrielle **(http://chimiotheque-nationale.enscm.fr/).**

4.3.2. Evaluation du test biologique

Avant le criblage d'une chimiothèque, il est conseillé de réaliser le calcul du facteur Z'. Cette formule ci-après est un paramètre statistique qui permet d'évaluer la validité du test biologique pour le criblage (Zhang *et al.*, 1999). Plus la valeur s'approchera de 1 et plus le test biologique sera considéré comme reproductible. Pour une valeur inférieure ou égale à 0,5, le test biologique n'est pas adapté pour le criblage et nécessite d'être fortement amélioré.

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma_p + 3\sigma_n}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Où **μ** = la moyenne ; **σ** = écart-type ; **p** = contrôle positif ; **n** = contrôle négatif.

Il existe un autre test dont l'utilisation est conseillée en parallèle du facteur Z' (Roquemore *et al.*, 2003). Il s'agit du rapport signal sur bruit, dont la formule la plus appropriée pour un test de criblage est :

$$S : N = \frac{|\mu_p - \mu_n|}{\sqrt{{\sigma_p}^2 + {\sigma_n}^2}}$$

Où les valeurs μ, σ, n et p sont identiques à Z'.
Dans le cas de ce rapport signal sur bruit, on considère qu'un test est fiable dès lors que la valeur est supérieure à 8.

A titre d'exemple, un test biologique sur l'adhésion cellule-cellule de tissu épithélial, les facteurs Z' et S/N étaient respectivement de 0,8 et 48 confirmant la robustesse de leur test (Graham *et al.*, 2007).

4.3.3. Les principales étapes du crible

Les principales étapes du criblage identifiées par Toth et Van der Hoorn (2010) sont :

1) Etablir un test robuste préférentiellement en utilisant de petits volumes et des plaques à puits.
2) Réaliser un criblage primaire pour identifier les premiers candidats.
3) Réaliser un criblage secondaire en modulant les concentrations puis identifier les *hits* obtenus indépendamment de la première lecture.
4) Caractériser les phénotypes et identifier les cibles.

Certains chercheurs préconisent de réaliser le criblage secondaire à trois reprises, puis de valider le crible trois autres fois après avoir utilisé un nouveau lot de produits (Guillemot, 2010).

4.3.4. La pharmacomodulation et l'étiquetage des produits

Les composés bioactifs identifiés suite à un premier crible sont appelés les « *hits* ». Ceux-ci agissent généralement en tant qu'antagonistes, mais peuvent agir comme agonistes (McCourt et Desveaux, 2010). Les *hits* n'étant pas nécessairement les molécules les plus adaptées et les plus affines pour leurs substrats, les propriétés des composés peuvent éventuellement être optimisées (Toth et van der Hoorn, 2010). Il faudra transformer le *hit* en « *lead* » de manière à obtenir une structure privilégiée (Beghyn *et al.*, 2008).

La transformation de la molécule de *hit* en *lead* peut être réalisée en suivant différentes voies (Figure 22). La première est la méthode SAR pour *structure-activity relationship* (Figure 22A) qui fait varier pas à pas la structure générale de la molécule *hit*. La deuxième est l'amélioration pharmacocinétique (Figure 22B) où aucun composé n'est ajouté à la molécule de départ, seuls les groupements chimiques existants sont remplacés. Enfin, le *hit* peut être fragmenté (Figure 22C) afin de tester l'efficacité de chacun des constituants de la molécule (Keseru et Makara, 2006 ; Walsh et Chang,

2006). De multiples méthodes sont disponibles pour vérifier l'affinité entre les protéines et les petites molécules (Stockwell, 2004).

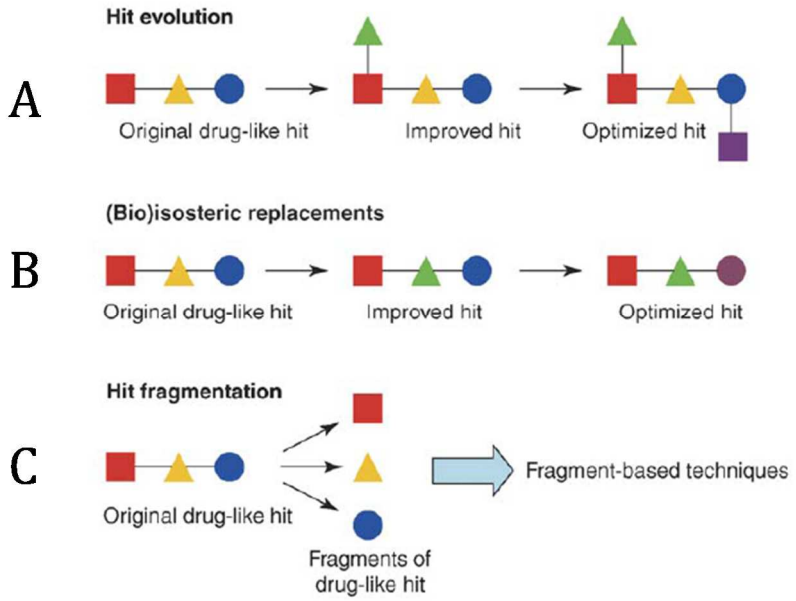


Figure 22 : Présentation des différents processus *Hit-to-lead* utilisés afin d'améliorer les affinités d'une molécule d'intérêt.

A : Amélioration par *Structure-activity relationship* (SAR). B : Amélioration pharmacocinétique. C : Fragmentation

(Keseru et Makara, 2006)

Une fois le *hit* transformé en *lead*, la localisation des produits dans les cellules, les tissus ou l'organisme devra être déterminée et la cible devra être caractérisée. Des traitements biochimiques, rendus possibles par une dérivation rapide des molécules, sont alors nécessaires afin d'étiqueter les composés chimiques (Blackwell et Zhao, 2003). De nombreux « *tag* » permettent une localisation du composé chimique dans la cellule et une purification de la cible (Walsh et chang, 2006). Pour cela, il est possible de modifier les produits en greffant des marqueurs (Walsh et Chang, 2006) comme l'ajout d'un « *linker tag* » qui permet une immobilisation du produit sur des billes d'agarose (Khersonsky *et al.*, 2003) ou l'ajout d'un colorant ou d'un fluorophore (Rosania *et al.*, 2003). Afin d'assembler ces éléments sur les molécules, les chimistes ont recours à la

« *click chemistry* » permettant un assemblage rapide et simple de groupements chimiques (McCourt et Desveaux, 2010). La technique la plus utilisée est la réaction de cycloaddition entre un azide et un alkyne (Kolb et Sharpless, 2003). Cette pratique a l'avantage d'empêcher un encombrement stérique d'un substrat visé par une molécule portant un marqueur trop imposant (Figure 23a). Il est ainsi préférable qu'un composé chimique testé porte un groupement azide, pour pouvoir réagir facilement avec un groupement alkyne, lui-même portant un marqueur (*tag*) (Figure 23b) (Speers et Cravatt, 2004).

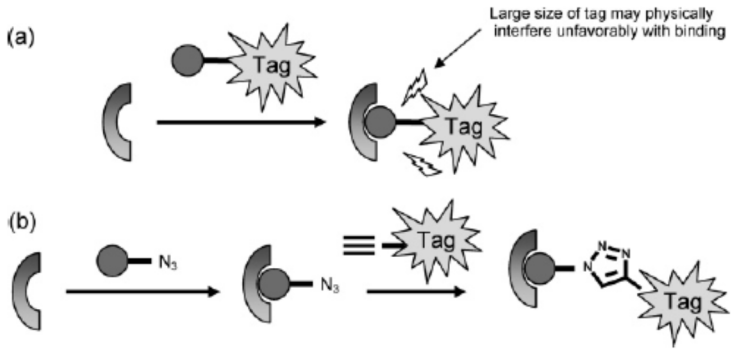


Figure 23 : Schéma illustrant l'étiquetage d'une molécule via la "*Click Chemistry*"

(a) le produit est directement étiqueté avec un marqueur de grande taille pouvant interférer avec le ligand. (b) le produit porte un groupement azide qui se liera facilement au groupement alkyne présent sur l'étiquette.

(Walsh et Chang, 2006)

En utilisant des chimiothèques composées de molécules déjà étiquetées, l'expérimentateur s'assure que le groupement additionnel ne perturbe pas l'affinité entre le substrat et son ligand. Par contre, l'utilisation de molécules non étiquetées devra faire l'objet d'une analyse complémentaire de type SAR, pour s'assurer que le complexe ultérieurement ajouté ne perturbe pas cette affinité (Ahn et Chang, 2007).

4.3.5. La Bioinformatique et les bases de données

De nombreux outils bioinformatiques se sont développés pour subvenir aux besoins des utilisateurs de cette méthode. On retrouve tout d'abord des sites internet

tels que PubChem ou ChemMine qui disposent de nombreux outils en ligne (Girke *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2010). Outre les importantes bases de données, il est également possible de dessiner les structures en 2D ou 3D des molécules, de les confronter à des structures similaires, établissant ainsi un travail de type SAR. Enfin, ce genre d'outils permet de rassembler les molécules sous forme de famille, de « *cluster* » (**http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ et http://bioweb.ucr.edu/ChemMineV2/**).

De même, des outils interactifs tels que Copicat® ont été créés pour prédire *in silico* les interactions entre protéines et produits chimiques (Yokota *et al.*, 2009). Cette méthode de criblage virtuel est en plein essor depuis la mise en place de bases de données (McInnes, 2007). Néanmoins, cet aspect de recherche concerne davantage les chemoinformaticiens (Gasteiger, 2006).

4.4. Avantages/inconvénients

Comme toute technique, la génétique chimique possède ses avantages et ses inconvénients. Selon Alaimo *et al.*, (2001) et Blackwell et Zhao, (2003), les principales raisons pour lesquelles cette approche est utilisée sont:

1. le test est rapide à effectuer puisqu'il s'applique directement sur les cellules, tissus ou organismes à étudier.
2. le phénotype peut être réversible après transfert dans un milieu sans produit.
3. l'ajout du produit peut être réalisé à tout moment et sur un tissu ou un organe donné permettant un contrôle spatio-temporel.
4. Il est possible d'observer un phénotype plus ou moins prononcé en modulant les doses de produit.
5. la génétique chimique peut palier les problèmes fréquemment observés en génétique classique, comme la létalité due à une mutation dans un gène indispensable au développement (Surpin et Raikhel, 2004 ; Hicks et Raikhel, 2009) ou à l'inverse l'absence de phénotype due à la redondance de gènes (Hicks et Raikhel, 2009). En effet, un produit pourra perturber l'ensemble des protéines d'une même famille (Blackwell et Zhao, 2003). Pour cette raison, il est recommandé d'examiner l'expression globale du génome *via* les microarrays pour déterminer le champ d'action d'une molécule, à savoir agit-elle sur une ou plusieurs protéines ? (Southern, 2001 ; Blackwell et Zhao, 2003).

6. la création de multiples mutants par génétique classique est longue. Par une approche de génétique chimique, il pourrait être possible d'associer plusieurs molécules agissant indépendamment sur plusieurs cibles (Walsh et Chang, 2006).

L'inconvénient majeur de cette technique réside dans la difficulté à identifier le mode d'action et la cible (Kashani et Van der Hoorn, 2007). De plus, la plante peut par son métabolisme altérer la molécule. Celle-ci peut être éliminée de l'organisme ou même être clivée, ayant pour conséquence de rendre la molécule dangereuse, sans effet, ou agir comme principe actif envers d'autres protéines (effets secondaires) (Raikhel et Pirrung, 2005).

4.5. Application de la génétique chimique aux plantes

Cette approche a permis plusieurs découvertes dans le domaine végétal. La génétique chimique a ainsi permis de fournir de nombreuses informations sur les voies complexes de biosynthèse et/ou de signalisation des phytohormones comme l'auxine et les brassinostéroïdes (Walsh et Chang, 2006). L'auxine est fortement impliquée dans les différents stades de développement de la plante (Armstrong *et al.*, 2004) et en particulier dans l 'élongation cellulaire. Dans le but d'identifier des inhibiteurs de l'auxine, 10000 composés chimiques commerciaux ont été criblés sur des lignées d'*Arabidopsis thaliana* exprimant des gènes rapporteurs *GUS* (β-glucuronidase). Ces gènes sont sous le contrôle de promoteurs inductibles à l'auxine. L'apport d'auxine exogène entraîne l'expression du gène rapporteur *GUS* dans les racines (Armstong *et al.*, 2004). Trente molécules ont été décelées comme ayant un rôle perturbateur, c'est à dire n'induisant pas l'expression du gène rapporteur *GUS*. Parmi ces composés, deux molécules induisaient le même phénotype. Des études complémentaires par microarray ont alors montré que les deux composés étaient impliqués dans des mécanismes d'action similaires (Armstrong, 2004). Un autre crible a permis d'isoler le sirtinol provoquant une réduction importante de la croissance racinaire et capable d'activer les gènes inductibles par l'auxine. Le criblage de 60000 mutants EMS (Ethylmethanesulfonate) a ensuite permis d'isoler le mutant *sir1* résistant au sirtinol dont la mutation affecte un gène codant une protéine *UBIQUITIN-ACTIVATING ENZYME E1–LIKE PROTEIN* (Zhao *et al.*, 2003). Ultérieurement, il a été montré que le sirtinol subissait dans la plante une série de transformations sous l'action d'enzymes conduisant

à la production d'un composé actif activant la voie de signalisation auxinique (Dai *et al.*, 2005).

Un autre sujet de recherche, sur les brassinostéroïdes, a également fait l'objet de plusieurs études *via* une approche de génétique chimique. Ces hormones sont connues pour avoir, entre autre, de nombreux effets sur le développement des tubes polliniques, l'élongation des tiges ou des cellules (Asami et Yoshida, 1999). Ainsi, le brassinazole a été identifié suite à un crible visant à isoler des inhibiteurs de la biosynthèse des brassinostéroïdes (Asami *et al.*, 2000). Les auteurs ont montré que l'effet induit par cette molécule pouvait être restauré par l'ajout exogène de brassinolide, première hormone de cette famille isolée du pollen de *Brassica napus* (Grove *et al.*, 1979). Le ligand du brassinazole a été caractérisé par voie biochimique et serait la protéine DWF4, une enzyme permettant l'hydroxylation sur le C-22 des brassinostéroïdes (Asami *et al.*, 2001). De même, un mutant résistant au brassinazole, *bzr1*, a été isolé et présente une mutation dans un gène codant la protéine BZR1, une protéine nucléaire qui est un répresseur de facteur de transcription (He *et al.*, 2005). Ces exemples démontrent qu'une utilisation combinée de génétique classique et chimique permet de caractériser des intermédiaires dans les voies de signalisation ainsi que dans des mécanismes d'action complexes (Walsh et Chang, 2006).

D'autres travaux plus récents ont permis d'isoler des molécules perturbant l'alignement microtubules-cellulose (Yoneda *et al.*, 2007) ou encore de caractériser le gène *XEG113* codant une arabinosyltransférase spécifique pour la *O*-glycosylation des extensines (Gille *et al.*, 2009).

Ces quelques exemples montrent que l'approche de génétique chimique tend à se développer de plus en plus dans le domaine végétal. Néanmoins, à ce jour, aucun exemple de génétique chimique usant d'une approche inverse n'a été dénombré dans ce domaine (Kashani et van der Hoorn, 2007).

Objectifs du sujet de recherche

Le projet a été initialement conçu pour identifier et caractériser les molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire des tubes polliniques sur les tissus femelles chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* par une approche de génétique chimique. Dans ce contexte, le projet s'inscrit dans la thématique « Glycomolécules pariétales et croissance cellulaire » du laboratoire Glyco-MEV (Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, EA 4358).

Le projet est découpé en deux étapes distinctes dont les objectifs scientifiques sont :

i) d'accroître nos connaissances sur les parois du gamétophyte mâle et du sporophyte femelle, véritable interface de contact impliquée dans les mécanismes d'adhésion

ii) d'identifier des composés d'une chimiothèque capables de perturber l'adhésion cellulaire des tubes polliniques sur une matrice reconstituée.

Le premier objectif de mes travaux de thèse a consisté à caractériser la paroi des tubes polliniques par des approches microscopiques et biochimiques. Nos travaux se sont principalement focalisés sur les familles polysaccharidiques pectiques et hémicellulosiques. Nous avons également amorcé la caractérisation des tissus femelles sur lesquels les tubes polliniques adhèrent *in vivo*.

Le deuxième objectif de nos recherches a été d'identifier des molécules perturbant l'adhésion des tubes polliniques. Dans cette optique, nous sommes parvenus, dans un premier temps, à élaborer et à caractériser une matrice reconstituée mimant le tissu de transmission et permettant l'adhésion *in vitro* du tube pollinique. Dans un deuxième temps, une approche de génétique chimique a été mise en place pour le criblage de molécules sur notre test d'adhésion des tubes polliniques.

Matériel et Méthodes

1. Matériel Végétal

Plantes : Tomate cerise : *Solanum lycopersicum* Mill. Var. cerasiformae cv. West Virginia (WVA106) (Solanaceae). Tabac : *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) et Arabette des dames : *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. écotype Columbia 0 (Brassicaceae).

Culture des plantes : Les graines sont semées dans des bacs contenant de la terre stérile. Les cultures se font dans des phytotrons respectant une photopériode de 16 h jour/8 h nuit. La température y est alors respectivement pour chaque période de 20°C et 16°C pour la culture d'Arabidopsis et de 25°C et 20°C pour le tabac et la tomate. L'hygrométrie relative ambiante est maintenue à 60 %.

Récolte des graines : Pour Arabidopsis et Nicotiana, les plantes sont laissées sans irrigation jusqu'à ce qu'elles soient entièrement sèches. Les plantes d'Arabidopsis sont alors coupées et transférées dans un sac qui, après friction, va laisser s'échapper les graines qui seront passées sur tamis et stockées à +4°C et à l'obscurité. Les capsules de tabac sont récoltées et découpées pour extraire les graines. Elles sont également stockées à +4°C à l'obscurité.

Culture des cellules en suspension de tabac et de tomate : Les cellules de tabac BY-2 (Bright-Yellow 2) sont cultivées dans des fioles de 250 mL contenant un milieu Murashige et Skoog liquide (4,3 g/L) complémenté par du saccharose 30 g/L, KH_2PO_4 100 mg/L, myo-inositol 51 mg/L, thiamine 1 mg/L, 2,4 acide dichlorophenoxyacetique 0,22 mg/L, pH = 5,6. La culture est placée dans une chambre noire sous agitation à 140 rpm. Les cellules sont repiquées chaque semaine en transférant 10 mL de culture dans 150 mL de milieu frais. Les cellules utilisées sont âgées de 4 jours.
Les cellules de tomate var. Dombito proviennent du laboratoire « Chimie des Substances Naturelles », Université de Limoges. Ces cellules, conditionnées dans l'éthanol 70% ou dans un milieu de fixation, nous ont été gracieusement données par Aurélie Muschitz.

2. Récolte et culture *in vitro* du pollen en milieu liquide

Arabidopsis thaliana : Les fleurs fraîchement ouvertes sont récoltées à l'aide d'une pince brucelles et sont regroupées par 40 dans des tubes coniques contenant 1 mL de milieu de germination (MG). Ce milieu, optimisé par Boavida et McCormick (2007), se compose de 5 mM $CaCl_2$, $2H_2O$, 0,01% (w/v) H_3BO_3, 5 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, $7H_2O$ et 10% (w/v) de saccharose. Le pH est très exactement ajusté à 7,5. Les tubes sont agités manuellement pour libérer les grains de pollen dans le milieu. Les fleurs sont écartées à l'aide d'une pince avant de centrifuger les tubes pendant 5 min à 3200 g. Le MG est enlevé et 250 µL de MG frais sont ajoutés pour une culture en pilulier ou 1,6 mL pour la culture en plaques 96-puits. Les grains de pollen sont alors incubés à 22°C pendant 6h ou 16h à l'obscurité sans agitation. Les tubes polliniques sont observés et leur taux de germination est estimé.

Tomate : Les fleurs de tomates au stade de l'anthèse sont récoltées par 5 et débarrassées de leurs pétales et sépales. Les étamines soudées sur le pistil sont alors placées dans 5 mL de MG BK (Brewbaker et Kwack, 1963) constitué de 1,62 mM H_3BO_3, 1,25 mM $Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$, 2,97 mM KNO_3 et 1,65 mM $MgSO_4$, $7H_2O$ contenant 15% de saccharose. Après 6h de culture à 28°C sous une agitation à 180 rpm, les étamines et le pistil sont enlevés et les tubes polliniques sont observés pour s'assurer de la germination des tubes. Ensuite les tubes sont filtrés à travers une membrane en nylon de maille 50 µm afin d'éliminer les grains de pollen non germés.

Tabac : Les fleurs de tabac sont également récoltées au stade de l'anthèse. Les 5 anthères de 3 fleurs sont agitées dans 5 mL de milieu BK, pour libérer les grains de pollen qui sont cultivés à 22°C pendant 6h avant d'observer les tubes polliniques.
Dans tous les cas, les tubes polliniques sont soit fixés pour les travaux d'immuno-localisation soit stockés dans l'éthanol 70% pour les analyses biochimiques.

3. Méthodes de microscopie

3.1. Immunolocalisation et Microscopie à épifluorescence

Fixation des échantillons : Les tubes polliniques cultivés pendant 6h ou 16h sont fixés dans du tampon PIPES 100 mM, pH 6,9, 4 mM $MgSO_4$, $7H_2O$, 4 mM EGTA, 10% (w/v)

saccharose et 5% (v/v) de formaldéhyde puis déposés sur des lames à puits préalablement traités avec 0,01% (v/v) de poly-L-Lysine. Les lames sont placées sous une hotte jusqu'à évaporation du milieu de fixation avant d'être rincées 3 fois avec du Phosphate Buffer Saline 1X (PBS).

Immunomarquages indirects : Les tubes polliniques fixés sont ensuite incubés une nuit à +4°C en présence d'un anticorps primaire dilué au 1/5 (ou 1/10 pour l'anticorps MAC 207) dans du PBS 1X-lait 3% (w/v), dirigé contre des épitopes de polysaccharides pariétaux (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes pariétaux

Anticorps primaire	Organisme de production	Epitope reconnu	Référence
Anticorps anti-AGP			
LM 2	Rat	β-GlcA liés de glycanes AGP	Yates *et al.*, 1996
JIM 13	Rat	glycanes AGP	
MAC 207	Rat	glycanes AGP	
Anticorps anti-extensines			
LM 1	Rat	extensines	Smallwood *et al.*, 1995
Anticorps anti-pectiques			
JIM 5	Rat	HG faiblement méthylestérifié	Clausen *et al.*, 2003
JIM 7	Rat	HG hautement méthylestérifié	
LM 5	Rat	(1→4)-β-D-galactane	Jones *et al.*, 1997
LM 6	Rat	(1→5)-α-L-arabinane	Willats *et al.*, 1998
LM 8	Rat	xylogalacturonan	Willats *et al.*, 2004
LM 13	Rat	(1→5)-a-L-arabinan	Moller *et al.*, 2008
Anticorps anti-XyG			
LM 15	Rat	Structure XG	Marcus *et al.*, 2008
CCRC-M1	Souris	α-Fuc-(1→2) terminal	Puhlmann *et al.*, 1994
Anticorps anti-β-glucanes			
Anti-callose	Souris	(1→3)-β-D-glucane	Meikle *et al.*, 1991

Les puits sont rincés à 3 reprises avec du PBS 1X-lait 3% et traités avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome FITC (Fluorescéine IsoThioCyanate). Ces anticorps

IgG anti-rat ou anti-souris sont dilués au 1/50 dans du PBS 1X-lait 3% et les tubes polliniques sont traités pendant 3h à 30°C. Les lames sont ensuite abondamment rincées avec du PBS-1X avant observation.

Coloration cytochimique : Les tubes polliniques sont incubés avec 0,01% de calcofluor (w/v) dans l'eau pour mettre en évidence les β-glucanes ou 0,1% (w/v) de bleu d'aniline dans un tampon 100 mM K_3PO_4, pH 12 pour la détection de la callose (Johnson-Brousseau et McCormick, 2004).

Enrésinement des pistils : Les pistils d'*Arabidopsis thaliana* ont été fixés pendant 4h, sous vide, dans un tampon PIPES 50 mM pH 7,0 en présence de 4% de formaldéhyde, 1 mM $CaCl_2$ et 2% de glutaraldéhyde. Après 3 rinçages de 10 min dans du tampon dépourvu de fixateurs, les pistils sont déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes de 25%, 50%, 75%, 95% et 100% d'alcool pendant 2 h chacun. Les pistils sont ensuite incubés une nuit dans de l'éthanol 100% et enrésinés dans du méthacrylate composé de buthylmétacrylate et méthylmétacrylate (4:1 ; v/v). Les infiltrations se font dans un mélange méthacrylate-éthanol absolu dans les proportions 1:3 sur une nuit, 1:1 pendant 5 h et 3:1 sur une nuit et finalement deux bains dans du méthalcrylate 100% pendant 12 h chacun. Les pistils sont placés dans des cupules en plastique remplies de méthacrylate contenant du benzoin méthyl éther à 5 mg/mL. La résine est alors solidifiée sous une lampe UV à 4°C pendant 24 h.

Microtomie : Les blocs de résine sont coupés à l'aide d'un ultramicrotome EM-UC6 Leica. Des sections de 1 mm d'épaisseur sont placées sur des lames à puits préalablement traitées avec 0,01% de poly-L-lysine.

Observations: Les lames sont recouvertes d'une lamelle avant d'être observées au microscope optique Leica DLMB équipé d'un bloc fluorescence pour observer le FITC (absorption, 485 – 520 nm ; émission, 520 – 560 nm), ou les colorants cytochimiques (absorption, 355 – 425 nm ; émission, 480 – 490 nm). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra Leica DFC300FX.

3.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

Cryofixation : Les tube polliniques âgés de 6h sont placés dans des cupules en or (diamètre : 1,2 mm ; profondeur : 200 µm) préalablement enduites de lécithine de soja

diluée à 100 mg/mL dans du chloroforme. Une fois les cupules remplies de l'échantillon, l'excès de MG est éliminé et les tubes polliniques sont cryofixés sous haute pression à l'aide d'une HPF (*High Pressure Freezing*) EM-PACT de Leica. Les taux de refroidissement sont d'environ 10000°C/s sous une pression de 7,5 bars. Les cupules sont ensuite stockées dans de l'azote liquide.

Déshydratation : Les échantillons sont ensuite transférés dans un automate de substitution (EM-AFS, Leica) à -140°C, et plongés dans de l'acétone anhydre contenant 2% d'osmium (v/v). La substitution se fait avec différents paliers de température commençant à -90°C pendant 72h puis la température est progressivement augmentée jusqu'à -30°C. Après 12h, la température est augmentée à nouveau de 2°C/h jusqu'à 0°C. Après 2h à cette température, les échantillons sont rincés à température ambiante avec de l'acétone anhydre.

Enrésinement : Des bains de 8h ont été réalisés à +4°C dans une résine acétone-Spurr dans les proportions 2:1, 1:1 et 1:2 avant de placer les échantillons dans de la résine pure pendant 2 jours. La polymérisation se fait à 60°C pendant 16h.
Ultramicrotomie : Les blocs de résine sont coupés à l'aide d'un ultramicrotome EM-UC6 Leica. Des sections de 90 nm d'épaisseur sont déposées sur des grilles de nickel préalablement recouvertes de formvar.

Immunomarquage : Les grilles sont réhydratées avec un tampon TBS (Tris-buffered saline) + 0,2% BSA (Sérum d'albumine bovin). La saturation se fait dans une solution TBS/BSA 0,2%/lait 3% pendant 30 min. Après 3 brefs rinçages au TBS/BSA 0,2%, les grilles sont incubées pendant 3h à 25°C avec un anticorps primaire non dilué pour les anticorps LM15 et CCRC-M1 ou dilué dans un tampon TBS/BSA 0,2% au ½ pour l'anticorps LM6 et 1/100 pour l'anticorps anti-callose (Tableau 3). Les grilles sont ensuite rincées 6 fois pendant 5 minutes dans une solution TBS/BSA 0,2% avant d'être traitées 1h à 25°C avec l'anticorps secondaire approprié (Tableau 3) couplé à des particules d'or de 10 nm de diamètre dilué au 1/20. Les grilles sont à nouveau rincées 6 fois 5 min avec du TBS/BSA 0,2% puis dans du TBS pendant 1 min avant d'être plongées 10 min dans du TBS + glutaraldéhyde 2%. Les coupes sont rincées 5 min dans du TBS puis 2 fois dans de l'eau mQ.

Contraste : Les coupes sont contrastées avec 0,5% (w/v) d'acétate d'uranyle solubilisé dans du méthanol et incubées 10 min à l'obscurité. Les grilles sont ensuite rapidement rincées 10 fois dans de l'eau avant d'être incubées 10 min avec du citrate de plomb 1%. Dix rapides rinçages à l'eau mQ sont effectués avant de mettre les grilles à sécher à température ambiante.

Observation : Les grilles sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Tecnai 12 Bio-Twin; Philips) réglé à 80 kV. Les images sont acquises à l'aide d'une camera Erlangshen ES500W, Gatan.

3.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Préparation des échantillons : Les tubes polliniques âgés de 6h ont été fixés dans un tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 contenant 1% glutaraldéhyde, 4% formaldéhyde et 10% saccharose pendant 2 h à température ambiante. Après rinçage dans le tampon, les tubes polliniques sont incubés 2 h à l'obscurité dans une solution de tétraoxyde d'osmium 1%. Après 3 rinçages, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'une heure de concentration croissante en éthanol : 10%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, une nuit à 75%, et 2h à 85%, 96% et 100%. Les tubes sont placés sur la nuit dans de l'éthanol 100% et stockés à +4°C. Avant métallisation, les échantillons subissent un traitement au HMDS 100% pendant 5 min. Les grains de pollen ont été observés directement sur le support d'observation avant métallisation sans fixation et déshydratation préalable.

Observations : Les tubes polliniques et les grains de pollen ont été observés à l'aide d'un MEB Zeiss EVO40 EP dont le voltage est réglé à 10kV.

4. Méthodes générales de biochimie

4.1.Extraction pariétale

Obtention de la paroi brute : Les cellules ou les organes sont immergés dans l'éthanol 70% et homogénéisés à l'aide d'un potter ou d'un mortier. Les broyats sont incubés au bain-marie pendant 15 min à 70°C, puis filtrés ou centrifugés (10 min à 3200*g*) afin d'éliminer le surnageant. Le culot est soumis à 2 lavages à l'éthanol 70% entrecoupés de période d'incubation au bain-marie à 70°C. La phase éthanolique est écartée pour traiter

la fraction insoluble avec un mélange chloroforme/méthanol (v:v). Enfin, la fraction insoluble est lavée avec de l'acétone pour éliminer les pigments. Au final, la fraction obtenue se compose de la paroi brute appelée résidu insoluble à l'alcool (AIR = *Alcohol Insoluble Residue*).

Fractionnement de la paroi : Deux méthodes ont été utilisées au cours de nos travaux pour extraire les pectines de la paroi brute AIR.
Extraction des pectines par un traitement à l'imidazole : Quelques milligrammes de paroi brute sont immergés dans une solution d'imidazole 500 mM ajustée à pH 7. Après agitation sur la nuit, la solution est centrifugée pendant 15 min à 5000 g. Le culot est à nouveau traité avec une solution d'imidazole sur la nuit. Les surnageants sont regroupés et dialysés contre de l'eau mQ et lyophilisés.

Extraction des pectines par un traitement à l'oxalate d'ammonium : Quelques milligrammes d'AIR ou de résidu insoluble à l'extraction avec l'imidazole sont traités par de l'oxalate d'ammonium 100 mM. Le mélange est chauffé à 100°C pendant une heure puis centrifugé à 5000 g pendant 15 min. Après dialyse, le surnageant est lyophilisé.

Extraction des hémicelluloses : Le culot issu de l'extraction à l'oxalate d'ammonium est solubilisé dans du KOH 4 M contenant 20 mM de $NaBH_4$ durant 12h à température ambiante. Le pH est ramené à 5,5 à l'aide d'acide acétique glacial. Une centrifugation de 15 min à 5000 g permet de récupérer d'une part la fraction insoluble (enrichie en cellulose) et d'autre part le surnageant enrichi en hémicelluloses. Après dialyse contre de l'eau mQ, la fraction solubilisée par le KOH est lyophilisée. La partie insoluble est rincée abondamment à l'eau et séchée.

4.2. Analyse des monosaccharides

4.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (GC)

Préparation des échantillons : Entre 0,5 et 2 mg d'échantillon sont placés dans des vials adaptés au passeur automatique d'échantillons. Avant chaque analyse, les fractions sont lyophilisées en présence de 50 µL d'une solution d'inositol 2 mM utilisé comme témoin interne. L'échantillon est repris dans 250 µL de méthanol-HCl 1 M et placé 16 h dans une étuve à 80°C. Ce traitement clive les polysaccharides pour les convertir en

méthylglycosides libres. Le méthanol-HCl est ensuite évaporé sous une rampe à air et l'échantillon est lavé 2 fois dans 250 µL de méthanol et séché de nouveau sous air afin d'éliminer toute trace d'acide. Les fractions sont silylées en ajoutant 200 µL de réactifs hexaméthyldisilizane / triméthylchlorosilane / pyridine (3:1:9) puis chauffées à 110°C pendant 20 min, afin de dériver les méthylglycosides en triméthyl-silyl glycosides. L'agent de silylation est ensuite évaporé doucement sous un flux d'air. Après évaporation et 2 lavages au cyclohexane, les dérivés sont solubilisés dans 1 mL de cyclohexane.

Analyse : Un volume de 1 µL d'échantillon est prélevé par le passeur d'échantillon (équipé d'une seringue Hamilton de 10 µL) et injecté en GC pour l'analyse de son contenu en monosaccharide. Le chromatographe en phase gazeuse est un appareil Varian 3800, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). A chaque monosaccharide correspond différents dérivés dont les aires principales détectées sont intégrées (intégrateur STAR Workstation Varian 5.52). L'attribution et la quantification des pics sont réalisées par comparaison au temps de rétention de monosaccharides standards (rhamnose, galactose, fucose, xylose, arabinose, mannose, glucose, acide galacturonique, acide glucuronique) et au témoin interne, l'inositol. Les résultats obtenus pour chaque ose sont exprimés en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des monosaccharides présents.

4.2.2 Analyse des liaisons après dérivation des sucres en acétates d'alditols partiellement méthylés

Perméthylation : (D'après Ciucanu et Kerek, 1984 ; Smith *et al.*, 1994) Quelques mg d'échantillon sont placés dans des tubes en verre et recouverts de 200 µL de DMSO anhydre. Après ajout de 5 mg de NaOH finement broyés en poudre, les tubes sont placés durant 2 h dans un sonicateur (puissance maximale). Il est alors ajouté 50 µL de iodométhane (ICH_3). Les tubes sont vortexés et laissés incubés à température ambiante pendant 1 h. Deux volumes d'eau et 1 volume de dichlorométhane sont successivement ajoutés. La phase organique est lavée 3 fois avec 1 mL d'eau mQ.

Hydrolyse : Les polysaccharides méthylés sont hydrolysés avec 1 mL d'acide trifluoroacétique (TFA) 2M pendant 2 h à 110°C.

Réduction : Après évaporation, les résidus secs sont réduits pendant 3h dans un mélange 50 µL de NH_4OH 2M et 50 µL de $NaBD_4$ préparé à 30mg/mL dans du NH_4OH 2M. L'excès d'agent réducteur est ensuite détruit par l'ajout de 20 µL d'acide acétique glacial. Après séchage, les culots sont alors rincés à 3 reprises dans 500 µL d'un mélange d'acide acétique et de méthanol (1:9) avant un ultime rinçage avec 500 µL de méthanol.

Acétylation : Les culots sont solubilisés dans une solution d'acétique anhydre et de pyridine (v:v) et portés à 100°C pendant 3h. Après évaporation, les culots sont repris dans du dichlorométhane et de l'eau mQ. La phase organique est rincée 3 fois par 1 mL d'eau mQ avant évaporation.

Analyse : Les échantillons sont repris dans 100 µL de dichlorométhane. Les acétates d'alditols partiellement méthylés sont séparés par GC (Hewlett-Packard 6890) et analysés par un spectromètre de masse électrospray (Autospec, Micromass).

4.3 Analyse du XyG par Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Préparation des échantillons : Entre 0,5 et 2 mg de paroi AIR ou de fractions extraites au KOH sont incubés dans 500 µL d'acétate d'ammonium 10 mM pH 5 contenant 5 unités d'enzyme *endo*-(1→4)-β-glucanase (EC 3.2.1.4 ; Megazyme) et placés à 37°C pendant 16h sous agitation à 180 rpm. De l'éthanol absolu est apporté jusqu'à un volume total de 2 mL, puis l'échantillon est centrifugé à 10 000 g pendant 10 min pour culoter la paroi non digérée. Le surnageant, contenant les oligosaccharides est transféré dans des tubes coniques de 15 mL puis évaporé sous rampe à air. Les fragments de XyG sont repris dans une solution TFA 0,1% préparée dans l'eau mQ afin d'obtenir plusieurs dilutions. 1 µL de chacune des dilutions est déposé sur une plaque cible en présence de 1 µL de matrice. La matrice utilisée est de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) préparé à 5 mg/mL dans un mélange acétonitrile/TFA 0,1 %, 30/70 v/v). Le mélange échantillon-matrice obtenu est homogénéisé sur la plaque cible.

Analyse : Les spectres de masse MALDI-TOF ont été enregistrés sur un spectromètre de masse à temps de vol Voyager DE-Pro (Applied Biosystems, Californie, USA). Les paramètres du spectromètre de masse et les traitements de données sont respectivement réalisés par les logiciels Data Voyager™ et Data Explorer™ 4.0 Software. Le spectromètre est équipé d'un laser à azote de longueur d'onde 337 nm. Le temps

d'impact du laser est de 3 ns. La pression au niveau de la source est de 10^{-7} Torr et celle de l'analyseur est de 10^{-8} Torr. Tous les spectres ont été obtenus en mode d'ionisation positif et en mode réflectron. Les ions sont accélérés sous une tension d'accélération de 20 kV. Chaque acquisition est une moyenne de 1000 ou 2000 tirs lasers et le spectre final est la moyenne de 3 à 10 acquisitions. Les spectres ont été calibrés de façon externe avec des calibrants commerciaux (Applied Biosystems ou Sigma-Aldrich).

4.4 Dot blot

De 0,5 à 10 µg d'échantillons sont déposés sur une membrane de nitrocellulose. Après avoir séché la membrane, celle-ci est saturée sur la nuit dans du PBS-lait 3%, puis incubée 2h à température ambiante avec un anticorps primaire (Tableau 3) dilué au 1/25 dans le PBS-lait 3%. Après 3 rinçages de 10 min dans du PBS-lait 3%, la membrane est incubée pendant 2h avec l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/1000 dans du PBS-lait 3%. Après 3 rinçages de 10 minutes dans du PBS-lait 3% et un rinçage final dans du PBS 1X, les épitopes sont révélés en présence du mélange BCIP/NBT (kit commercial, Promega). La réaction est stoppée en plongeant les membranes dans de l'eau mQ.

5 Méthodes de génétique chimique

Préparation de la chimiothèque : Les molécules de la chimiothèque (CERMN, Université de Caen) ont été fournies sous forme solide. Les molécules ont donc été solubilisées dans 100% de DMSO anhydre de façon à obtenir une concentration de 10 mM puis réparties dans des plaques 96-puits pour former une plaque mère. Une plaque fille a ensuite été constituée avec des molécules de concentration finale 500 µM diluées dans de l'eau mQ. C'est à partir de cette dernière plaque que seront prélevées les molécules.

Observation de la chimiothèque : Pour observer la couleur naturelle des molécules, les plaques sont scannées. Pour observer la fluorescence naturellement émise par ces molécules, les plaques ont été placées sur une plaque U.V. et prises en photographies.

Estimation du nombre de grains de pollen et du taux de germination : Le culot obtenu après la récolte de 40 fleurs est resuspendu dans du MG frais de façon à obtenir une concentration de pollen issue de 1, 2, 3, 4, 5, 10 ou 20 fleurs dans 200 µL (Tableau 4).

Tableau 4 : Volumes appliqués par puits pour déterminer le taux de germination

Densité (Nombre de fleurs)	1	2	3	4	5	10	20
Volume (µL) de MG contenant le pollen de 80 fleurs/400µL de MG	5	10	15	20	25	50	100
Volume (µL) de MG	195	190	185	180	175	150	100

Après germination pendant 6 h dans une plaque 96-puits, 50 µL de chacun des puits sont prélevés après homogénéisation et déposés sur une lame de malassez. Les grains de pollen germés et non germés sont dénombrés permettant d'établir la densité et le taux de germination du pollen. On estime qu'il y a germination à partir du moment où la taille du tube est au moins égale à la taille d'un grain de pollen. Le pollen provenant de 5 fleurs a été choisi pour la suite des expérimentations.

Estimation de la concentration optimum de DMSO : Les puits d'une plaque 96-puits sont remplis de MG contenant le pollen de 5 fleurs et une concentration de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 et 1% de DMSO q.s.p. (quantité suffisante pour) 200 µL (Tableau 5).

Tableau 5 : Volumes appliqués par puits pour étudier l'influence du DMSO

Concentration finale de DMSO	1%	0,5%	0,2%	0,1%	0,05%	0,01%	0%
Volume (µL) de DMSO 2% dilué dans du MG	100	50	20	10	5	1	0
Volume (µL) de MG contenant le pollen de 40 fleurs/400µL	50 µL (Correspond au pollen de 5 fleurs)						
Volume de MG (µL)	50	100	130	140	145	149	150

Les plaques 96-puits sont spécifiquement adaptées pour accueillir du DMSO et sont vierges de tout traitement. Après germination pendant 6 h, les grains de pollen germés

ou non sont dénombrés à l'aide d'une lame de malassez. Nous avons choisi de tester nos molécules à une concentration finale 20 µM ce qui représente 0,2% de DMSO.

Préparation de la matrice : Les extraits pariétaux sous forme solide sont solubilisés dans de l'eau mQ à concentration de 1mg/mL. Les tubes sont centrifugés 10 min à 2000 g pour culoter le matériel insoluble. Le surnageant, appelé matrice, est aliquoté dans des tubes de 1 mL et stocké à -20°C. Tout aliquot décongelé est stocké par la suite à 4°C.

Préparation du témoin digéré à l'EPG : Les AIR, préparés à 1 mg/mL, sont digérés dans un volume final de 500 µL d'acétate d'ammonium 10 mM pH 5 en présence de 5 unités de l'enzyme *endo*-α-(1→4)-polygalacturonase (EPG, EC 3.2.1.15) purifiée à partir d'*Aspergillus niger* (Megazyme). Après une nuit à 30 °C sous agitation à 180 rpm, les tubes sont chauffés 10 min à 95°C pour inactiver l'enzyme et centrifugés 10 min à 2000 g. Le surnageant est aliquoté et utilisé comme témoin.

Détermination de la concentration optimale en matrice : Dans un premier temps, la matrice est déposée dans les puits aux concentrations de 10, 20, 30, 40, 50 et 70 µg dans 70 µL d'eau. En effet, à des volumes inférieurs, la surface totale des puits n'est pas recouverte. Les plaques sont ensuite placées à 22°C pendant 24h jusqu'à évaporation complète de l'eau.

Germination du pollen sur la matrice : Le pollen de 5 fleurs d'Arabidopsis dans 200 µL de MG est placé dans chacun des puits contenant la matrice. La plaque est recouverte d'un film plastique pour éviter l'évaporation et incubée à 22°C pendant 6 h. La plaque est alors rincée 2 fois puits par puits avec un fin filet d'eau du robinet, l'arrivée de l'eau se faisant en haut de chaque puits, la plaque étant inclinée à 45°. Entre chaque rinçage, la plaque est retournée et ardemment égouttée.

Criblage des molécules : Avant de remplir les puits contenant la matrice, le MG et les molécules sont homogénéisés dans une plaque intermédiaire q.s.p. 200 µL de MG par puits. Le tout est délicatement transféré dans les puits contenant la matrice sans agitation. De nombreux puits servent de contrôle et ne contiennent que du DMSO dilué à la concentration finale de 0,2%. Le volume final dans le puits essai est de 200 µL. Lors du criblage primaire, les molécules sont testées à 20 µM. Au cours du criblage secondaire, l'effet dose-réponse a été étudié avec des concentrations allant de 1 à 20 µM (Tableau 6).

Tableau 6 : Volumes appliqués par puits lors des criblages secondaires des molécules pour étudier l'effet dose-réponse

Concentration finale de la molécule (µM)	1	2,5	5	10	15	20
Volume de la molécule (µL)	0,4	1	2	4	6	8
Complément DMSO 5% (µL)	7,6	7	6	4	2	0
Volume (µL) de pollen 40 fleurs / 200 µL	25 (Correspond au pollen de 5 fleurs)					
Volume de MG (µL)	167 (q.s.p. 200 µL)					

La germination et le rinçage se déroulent comme précédemment, à ceci près que les eaux polluées sont récupérées dans un container réservé pour le recyclage de déchets lors des rinçages.

Observation des plaques de criblage : Les plaques 96-puits sont observées à l'aide d'un microscope inversé Leica équipé d'un appareil photo Nikon Coolpix X995. Seule la partie centrale des puits est observée. Les photos sont ensuite analysées en utilisant le logiciel ImageJ permettant de comptabiliser les grains de pollen germés ou non pour une surface donnée. Ce logiciel a également permis de mesurer la longueur des tubes polliniques. Nous avons pu, de cette manière, déterminer le rendement d'adhésion en dénombrant les pourcentages de grains de pollen germés ou non avant rinçage, puis après rinçage de notre plaque 96-puits.

Résultats

1. Caractérisation des matrices extracellulaires du gamétophyte mâle et du tissu de transmission femelle

L'adhésion des tubes polliniques sur le tissu de transmission a été observée *in vivo* chez *Arabidopsis thaliana* (Lennon *et al.*, 1998). La paroi constitue la première interface de contact entre les tubes polliniques et les tissus femelles. Chez le lys, cette adhésion fait intervenir, entre autres, des composés polysaccharidiques de type HG (Mollet *et al.*, 2000). Qu'en est-il chez *Arabidopsis thaliana* ? Nous avons déterminé quels étaient les composés polysaccharidiques constitutifs des parois des tubes polliniques et du tissu de transmission d'*Arabidopsis thaliana.* Ces travaux ont fait l'objet de deux publications (*Cf* ci-après). Un troisième article, focalisé sur l'analyse du XyG des tubes polliniques de tabac et de tomate (en cours de soumission), complète les données et nous permet de penser que les XyG sont des acteurs majeurs lors de la reproduction sexuée.

1.1. Article 1 : Caractérisation polysaccharidique de la matrice extracellulaire des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana*

Peu d'informations sont disponibles sur la composition pariétale des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana*. Les modèles habituellement utilisés pour les études de biologie cellulaire sont *Nicotiana tabacum* pour les eudicotylédones et *Lilium longiflorum* pour les monocotylédones. La raison principale étant que chez ces espèces, la culture *in vitro* des tubes polliniques est parfaitement maîtrisée. Pour Arabidopsis, Boavida et McCormick (2007) n'ont optimisé que très récemment le milieu de germination, rendant possible une culture reproductible *in vitro*. En utilisant ce milieu de culture, nous avons entrepris dès le début des travaux de thèse en 2008, une culture *in vitro* de masse des tubes polliniques qui a permis une caractérisation poussée de la paroi, aussi bien par des approches de microscopie que de biochimie.

La première approche, par immunocytochimie et microscopie, a permis de détecter, à l'échelle cellulaire et subcellulaire, les épitopes pariétaux associés aux pectines, hémicelluloses, β-glucanes et glycoprotéines. Certains de ces épitopes sont localisés par

domaines où plusieurs zones sont établies pour le tube pollinique : la zone apicale et l'arrière de l'apex et les parois internes et externes.

La seconde approche, par biochimie, nous informe de la composition monosaccharidique de la paroi totale, de fractions enrichies en pectines ou en hémicelluloses à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. L'arabinose apparait comme le monosaccharide majoritaire comme il avait été montré chez le camélia et le tabac (Nakamura et Suzuki, 1981 ; Rae *et al.*, 1985). Les fractions enrichies en polysaccharides hémicellulosiques indiquent la présence de polymères de type XyG. Une étude plus fine par MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry*) révèle que les fragments de XyG sont majoritairement fucosylés et fortement *O*-acétylés. Une comparaison avec les XyG issus de Solanaceae fera d'ailleurs l'objet de recherches complémentaires (*Cf* Article 3).

De plus, notre étude confirme la présence d'une double paroi des tubes polliniques. Une paroi interne riche en callose et absente dans la zone apicale des tubes polliniques et une seconde riche en pectines et hémicelluloses. Les HG fortement méthylestérifiés sont préférentiellement détectés dans la zone apicale tandis que les HG faiblement méthylestérifiés se trouvent principalement en arrière de cette zone. Bien que présente en faible quantité, la cellulose est localisée tout le long de la paroi. Finalement, nous révélons pour la première fois, la présence de XyG dans la paroi des tubes polliniques. Ces XyG ont une composition sensiblement différente de ceux trouvés dans les organes végétatifs de la plante mère.

Article 1 :

Titre : **Biochemical and immunocytological characterizations of Arabidopsis pollen tube cell wall**

Auteurs : **Flavien Dardelle**, Arnaud Lehner, Yasmina Ramdani, Muriel Bardor, Patrice Lerouge, Azeddine Driouich et Jean-Claude Mollet

Publié dans : Plant Physiology. 2010. Volume 153. Pages 1563-1576.

1.2. Article 2 : Localisation des pectines dans la paroi des tubes polliniques et du tissu de transmission d'*Arabidopsis thaliana*

L'adhésion cellulaire des tubes polliniques requiert la présence de pectines dans le tissu de transmission (Mollet *et al.*, 2000). Après avoir établi la présence de ces composés dans la paroi des tubes polliniques d'Arabidopsis, nous avons voulu déterminer la localisation de ces polymères dans les tissus femelles.

La microscopie électronique à balayage a permis d'observer une différence ultrastructurale de la paroi des tubes polliniques dans la zone apicale et à l'arrière de l'apex. Nos résultats confirment que les HG faiblement méthylestérifiés sont localisés en arrière de l'apex tandis que les HG fortement méthylestérifiés sont situés dans l'apex. Les chaines arabinanes du RG-I sont, quant à elles, localisées sur l'ensemble de la paroi du tube. Le pistil et le tissu de transmission présentent aussi une forte intensité de marquage des HG et des chaines arabinanes ou comme présenté dans la figure 24, en XGA spécifiquement détectés dans le tissu de transmission.

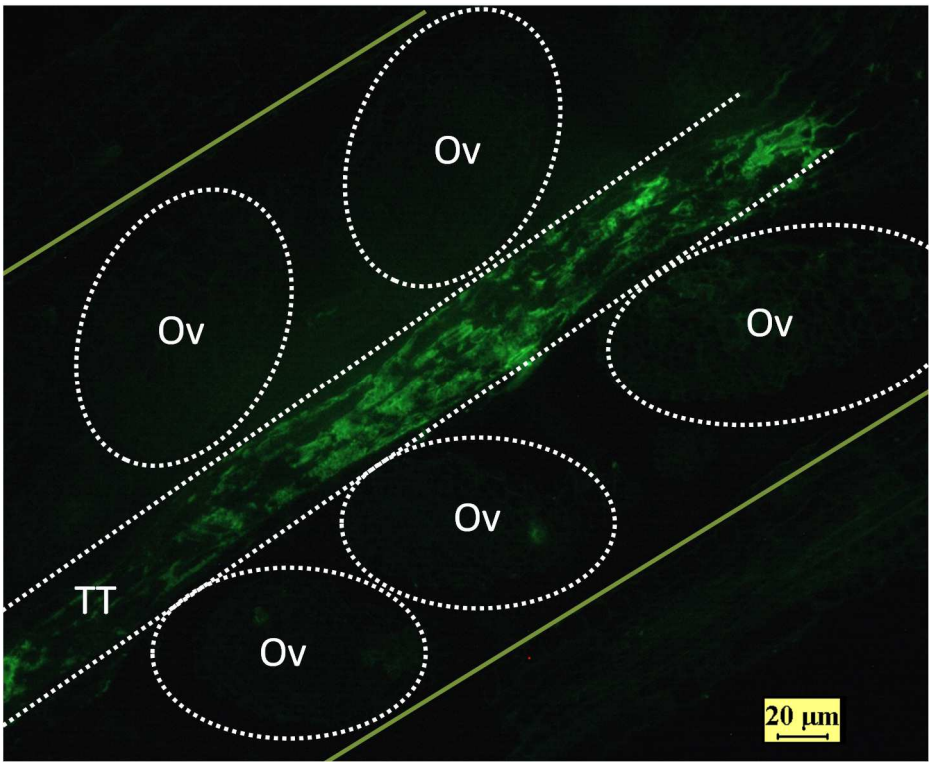


Figure 24 : Localisation des épitopes associés aux xylogalacturonanes par l'anticorps LM8 dans le pistil d'*Arabidopsis thaliana* avant pollinisation.

TT : Tissu de transmission ; Ov : Ovule

(N'Gouala Finassi *et al.*, non publié)

Article 2 :

Titre : **Pectins in the cell wall of *Arabidopsis thaliana* pollen tube and pistil**

Auteurs : Arnaud Lehner, **Flavien Dardelle**, Odile Soret-Morvan, Patrice Lerouge, Azeddine Driouich et Jean-Claude Mollet

Publié dans : Plant Signaling & Behavior. 2010. Volume 5. Pages 1282-1285.

1.3. Article 3 : Caractérisation des xyloglucanes chez les Solanacées

Peu d'informations sont disponibles concernant les XyG des tubes polliniques. Notre étude précédente (*Cf* article 1) a révélé la présence de structures du XyG fortement *O*-acétylés et fucosylés chez les tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana*. Les différentes proportions dans les structures du XyG entre les organes végétatifs et les tubes polliniques suggèrent que le fucose et les résidus *O*-acétylés pouvaient avoir une fonction importante dans la reproduction sexuée. Or, certaines familles de plantes, telles les Solanaceae, ne possèdent pas de XyG fucosylés. Seuls des arabino-XyG y sont retrouvés (York *et al.*, 1996). La question initialement posée est la suivante : si la fucosylation et l'*O*-acétylation sont des caractéristiques majeures pour la croissance des tubes polliniques, comment se comportent les tubes polliniques d'espèces ne possédant que des arabino-XyG ?

Cet article a donc pour principal objectif de caractériser les XyG de tubes polliniques de tomate et de tabac et de les comparer aux XyG issus d'organes végétatifs. Nos résultats ont montré que les tubes polliniques de ces deux espèces possèdent des XyG fucosylés. Pour les tubes polliniques du tabac, nous n'avons retrouvé aucun fragment XyG arabinosylé tandis que ceux de la tomate présentent à la fois des arabino-XyG et des fuco-galacto-XyG. Ces données suggèrent que les enzymes permettant la fucosylation du XyG des tubes polliniques sont actives. La machinerie permettant la biosynthèse du XyG est donc différente selon qu'il s'agisse des tubes polliniques ou des organes végétatifs chez la tomate et le tabac. Finalement, ces résultats suggèrent que le gamétophyte mâle, plus conservateur, n'a pas évolué à la même vitesse que les organes végétatifs.

Article 3 :

Titre : **Solanaceae pollen tube and vegetative organs have structurally divergent cell wall xyloglucan**

Auteurs : **Flavien Dardelle**, Arnaud Lehner, Muriel Bardor, Christophe Rihouey, Patrice Lerouge, Azeddine Driouich et Jean-Claude Mollet

Solanaceae pollen tubes and vegetative organs have structurally divergent cell wall xyloglucan

Flavien Dardelle[1], Arnaud Lehner[1], Christophe Rihouey[2], Muriel Bardor[1, 3], Patrice Lerouge[1], Azeddine Driouich[1], Jean-Claude Mollet[1]*

[1] Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, UPRES EA 4358, IFRMP 23, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

[2] Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces, UMR CNRS 6270 University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

[3] Present address: Bioprocessing Technology Institute, Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), 20 Biopolis Way, #06-01 Centros, Singapore 138668.

***Corresponding author:** jean-claude.mollet@univ-rouen.fr, phone (+33) 2 35 14 66 89; fax: (+33) 2 35 14 66 15.

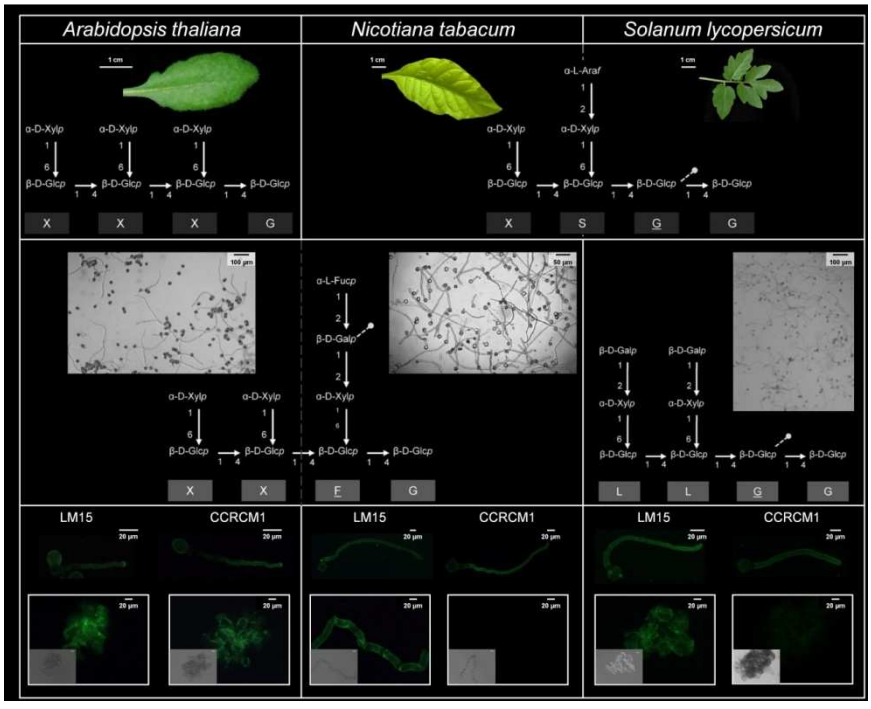
Running title: Atypical xyloglucan in Solanaceae pollen tubes.

Summary

Fertilization in plant relies on the proper targeting of the ovules by the pollen tube, a fast growing tip-polarized cell. During growth, a massive vesicle secretion promotes the proper assembly of the pollen tube cell wall that plays a capital role on the growth dynamic, mechanical properties and presumably guidance by interaction with the female tissues [1-4]. One of the cell wall polymers, typically xyloglucan (XyG) in most eudicots, is known for maintaining cell wall integrity and allowing cell expansion [5, 6]. We previously reported on *Arabidopsis thaliana* pollen tube cell wall that XyG were highly fucosylated and *O*-acetylated compared to the one found in vegetative organs [7], suggesting an important role of fucosylation and acetylation of XyG in pollen tube

growth. Interestingly, the XyG contained in vegetative organs and cell suspension of plants from the clade Asterids (Eudicot including the Solanaceae) lacks the fucosyl residues and instead exhibits an arabinoXyG, due presumably to an adaptative and/or selective diversification [8-14]. Here, we show that *Nicotiana tabacum* and *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) pollen tubes contained fucosylated XyG with a high level of *O*-acetylation. Thus, pollen tubes and vegetative organs from Solanaceae plants have structurally divergent XyG suggesting that the pollen tubes have a specific set of functional biosynthetic enzymes. The presence of fucosylated XyG in the pollen tubes from Arabidopsis (Malvid, Brassicaceae) and tobacco/tomato (Asterids, Solanaceae) also suggests that the male gametophyte is more conservative and it has not evolved at the same pace than the vegetative sporophyte. Thus, fucosyl residues and *O*-acetylation of XyG may play an important role in this capital step of plant reproduction resulting in seed production. As a matter of fact, the intermediate structure of XyG (mix of arabinosylated, galactosylated and fucosylated XyG) found in the pollen tube originating from the human selected tomato plants may reduce the fitness of the pollen tube growth in the female tissues resulting in the reduction of the number of seeds per fruit, phenomenon observed by comparing the fruits from domesticated plants and the wild ancestor.

Graphical abstract:



Highlights:

• Tobacco and tomato cell suspensions are not labeled with CCRC-M1, antibody recognizing the terminal fucosyl residue in XyG whereas pollen tubes are strongly labeled.

• Fucosylated XyG are the main structure found in tobacco pollen tube cell wall whereas a mix of arabinosylated, fucosylated and galactosylated fragments are detected in tomato pollen tubes cell wall by MALDI-TOF MS.

• High level of *O*-acetylation is found in pollen tube XyG.

• In Solanaceae, vegetative organs are composed of arabinoXyG while pollen tubes contain fucogalactoXyG.

Results and Discussion

Xyloglucan (XyG) is one of the main cell wall polymers able to interact by hydrogen bounding with cellulose and is implicated in regulating cell elongation [5]. In fast tip-growing pollen tubes, the sperm cell carrier, little information is available concerning the structure of this polysaccharide and its function during sexual plant reproduction. We showed previously on Arabidopsis pollen tube that the XyG is highly fucosylated and *O*-acetylated compared to the XyG of vegetative organs (Figure 1A) [7] suggesting an important role of these two features in pollen tube growth and interaction with the female tissues. To test this hypothesis, we investigated the XyG of pollen tubes from the model plants (tobacco and tomato, Solanaceae) that do not display fucosyl residue in the XyG from the vegetative organs (leaf and root) or cell suspension, but instead, are composed of arabinosylated XyG (Figure 1B) [8-11].

Pollen tubes present different xyloglucan cell wall epitopes

Using a well described germination medium [15], tobacco and tomato pollen germination rates were consistently over 80% and after 6 hours of growth, pollen tubes were actively growing with tubes reaching 800 µm in length (Figures 2A and 2B).

Two monoclonal antibodies (LM15 and CCRC-M1) were used to detect XXXG motif [16] and the terminal α-fucose-(1,2)-β-galactose residues [17] of XyG, respectively. Probing with the LM15 antibody, a strong signal was detected on the cell suspension and the pollen tube cell walls from Arabidopsis (Figures 2C and 2F), tobacco (Figures 2D and 2G) and tomato (Figures 2E-2H). It was shown previously that the CCRC-M1antibody did not label XyG in tobacco root [18]. We also observed a lack of labelling on the tobacco (Figure 2J) and tomato (Figure 2K) cell suspensions whereas Arabidopsis exhibited a strong labelling (Figure 2I). Interestingly, the cell walls of tobacco and tomato pollen tubes were also strongly and evenly labelled in the tip region and in the shank of the tubes (Figures 2M and 2N) as observed in Arabidopsis (Figure 2L). These data indicate that fucosylated epitopes recognized by CCRC-M1 are present in tobacco and tomato pollen tube cell wall but not detected in the cell wall of the cell suspensions. Controls did not show any fluorescence.

Tobacco and tomato pollen tubes have fucogalactoxyloglucan and galactoxyloglucan

To confirm this immunolabelling data, we investigated the composition of the XyG using the fingerprinting method named OLIgosaccharide Mass Profiling (OLIMP) [19, 20]. XyG is a polymer that can be cleaved by *endo*-glucanases releasing small oligosaccharides (< 1800 Da). The resulting fragments can be analyzed by matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Based on the mass ion ratio, the structure of the oligosaccharide can be identified and represented by the one-letter code nomenclature established by [21]. The letter corresponds to the last monosaccharide residue of the side chain (Figure 1) [21]. *O*-acetylation of XyG is rarely noticed because in most cases analyses of XyG are performed on alkali extracted polymers, treatment that removes the *O*-acetyl groups. To avoid this loss of information, the enzyme treatment was carried out (a) directly on the cell wall residue and (b) on the alkali extracted XyG to detect fragments that may have not been released from the less accessible XyG polymers. The underlined letter indicates the presence of *O*-acetylated group due to a shift of m/z=42. These groups are very likely to be substituted on the galactosyl or unsubstituted glucose of the backbone as described in many XyG (Figure 1) [5, 6].

Spectra of the fragments released by endo-glucanase treatment of the cell wall residue showed a different distribution of the ions between the pollen tubes, the cell suspension

and the leaf (Figures 3, 4, S1 and Tables S1, S2, S3, S4). Tobacco and tomato leaf XyG harbored dominantly arabinoXyG type with the monoacetylated XSGG/SXGG motifs (Figures 3A-B, 4A-B) in a proportion of 33.9 and 31%, respectively (Figures 4A-B, Table S3 and S4). In tobacco, the biacetylated XSGGG represented 26.6%, and in tomato the GSGG motifs accounted for 15.5% (Tables S3 and S4). Proportions and distributions of the oligosaccharides are concomitant with the published data obtained by chromatography analyses [8-11]. Spectra from the suspension-cultured cells (Figures S1A-B, Tables S3-S4) presented almost identical ion distributions with the same dominant fragments than in leaf although a slight difference occurred in their relative abundances. Neither fucosylated nor galactosylated fragments were detected above the signal to noise ratio on the spectra from tobacco (Figure 3A) confirming the absence of such fragments [8-9, 11]. On the other hand, no fucosylated but galactosylated XyG were detected in tomato leaf and cell suspension (Figures 3D, 4B, Table S4) as described in the literature [8, 10-11]. The spectra obtained from the endo-glucanase sensitive cell wall residue of tobacco pollen tubes (Figure 3C) showed a completely different profile with the dominance of both galactosylated and fucogalactosylated fragments, assigned by the letters L and F, respectively (Figures 3C-E, 4A). The main fragments were XXFG and XLFG with 29.7% and 23% of relative abundance (Figure 4A, Table S1), both containing at least one *O*-acetyl group probably harbored on the galactosyl residues. The double *O*-acetylated XLFG fragment (m/z=1639) has to our knowledge never been described. Here, no arabinosylated fragments were detected in contrast with the vegetative organs [8-11]. The spectra obtained from tomato pollen tubes appeared to be intermediate as three categories of XyG oligosaccharides, arabinosylated (XSGG), galactosylated (XXGG, LXGG/GXXGG) and fucogalactosylated (XXFG) were detected (Figures 3D, 4B, Table S2). If fucosylated XyG is important for pollen tube growth and sexual reproduction, we may speculate that this intermediate XyG profile observed in tomato may reduce the fitness of the pollen tubes and may be related to human selection, as domesticated tomato display lower number of seeds per fruit compared to the wild ancestor [22, 23]. The spectra obtained from the alkali soluble pollen tube cell wall material did not reveal any new fragment in tobacco (Figure 3E, Table S1). In tomato, the XLLG may have appeared (Figure 3F) suggesting that this motif may be more closely associated with cellulose and was not readily digested in the cell wall fraction. As expected, the noticeable difference in both spectra is an increase of the

relative abundance of the fragments lacking the *O*-acetylated group due to the saponification by alkali (Figures 3E-F). Finally, MALDI-TOF MS confirms also that the fragments are carrying a fucose (a 6-deoxy-L-galactose) and not a L-galactose that was found in the XyG of the mutant *mur1* to compensate the absence of the fucosyl residue [24].

All together, our data show that Solanaceae pollen tubes are able to synthesize fucogalactoXyG suggesting that XyG galactosyl and fucosyl transferases are functional in this specific cell.

O-acetylation is present in high level in the pollen tube cell wall

Proportion of *O*-acetylated XyG in tobacco pollen tubes seems to be similar to those found in XyG of *Arabidopsis thaliana* pollen tube cell wall [7]. To date, no specific XyG *O*-acetyltransferase has been identified and the function of *O*-acetylation is not clear. It has been suggested that the *O*-acetyl groups may protect the polymer from enzyme degradation or lead to a more hydrophobic cell wall [20, 25]. In many microorganisms, *O*-acetylation of polysaccharides is correlated with virulence [26, 27]. For example, the pathogenic fungus, *Cryptococcus neoformans*, deleted in the *cas1p* gene is more virulent than the wild strain. This gene codes for an enzyme that catalyzes the fixation of an *O*-acetyl group on the capsular glucuronoxylomannan polysaccharide [28, 29]. Moreover, microorganisms with weakly *O*-acetylated polymers have a better adhesion to the host cell but on the contrary highly-acetylated polymers are more resistant to enzyme degradation by the host cell [27]. Recently, it was shown that Arabidopsis mutants with a reduction in the level of cell wall polymer O-acetylation were more resistant to the *Botrytis cinerea* pathogen [30]. It was hypothesized that a decrease in *O*-acetylation of cell wall polymers may facilitate the activation of defense mechanisms [30]. Pollen tube growth and guidance involve molecules produced by the female organ related to plant defense mechanisms implying a dual role in development and defense [31-36]. The high level of XyG acetylation may (a) facilitate the progression of the pollen tube within the female tissue and (b) protect the integrity of the cell wall against degrading enzymes produced by the female counterpart.

CONCLUSION

Our results show that fucosylated and galactosylated XyG are common features of Arabidopsis (Malvid, Brassicaceae) and tobacco/tomato (Asterids, Solanaceae) pollen tubes. Moreover, the different nature of XyG between the pollen tube and vegetative organ cell wall was somehow surprising but it probably indicates that the male gametophyte, more conservative, has not evolved as rapidly as the vegetative sporophyte, more subject to adaptation under environmental pressure or human selection. Our data reveal that gametophytic and sporophytic cells from the same plant can have different biosynthetic machinery. It also indicates that fucosylation of XyG is an important feature in plant reproduction. However, in order to draw a general conclusion, analyses of pollen tube XyG on other species are required, especially with plants containing other hemicelluloses such as xylans. Finally, studies on pollen tubes with deletion of XyG fucosyltransferase genes should give more insight on the role of fucosyl residues in XyG. The annotation of the sequenced genome of tomato should facilitate the search for the genes involved in the biosynthesis of XyG.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant growth

Nicotiana tabacum (tobacco) and *Solanum lycopersicum* cv. West Virginia 106 (tomato) seeds were planted in a sterilized soil and cultured in a growth chamber with a photoperiod of 16h light/8h dark cycle at 25°C and 22°C during the light and dark phase, respectively. Relative humidity was maintained at 60% and plants were watered every two days.

Cell suspension culture

Tobacco BY-2 cells were cultured in the dark under agitation as previously described [37]. Tomato (*Solanum lycopersicum*, L. cv. Dombito) cell suspension, initiated from hypocotyl sections of tomato seedlings, was cultured as reported in [38] and provided by A. Muschitz (University of Limoges, France). Arabidopsis cell suspension was

provided by F. Bouteau (University of Paris VI, France) and was grown as shown in [39]. Cells were harvested by filtration after 5 days of growth. Cells were chemically fixed with 4% formaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline: 8 $g.L^{-1}$ NaCl, 0.29 $g.L^{-1}$ KCl, 1.45 g L^{-1} Na_2HPO_4, 0.24 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4) for immunolocalization or washed with and stored in 70% EtOH at 4°C for biochemical analysis.

Pollen tube growth

Pollen grains were collected from freshly dehisced anthers and stamens of 3 flowers (tobacco) or 5 flowers (tomato) were submerged in 5 mL of BK medium (1.62 mM H_3BO_3, 1.25 mM $Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$, 2.97 mM KNO_3, and 1.65 mM $MgSO_4$ $7H_2O$; [15] containing 15% sucrose. Pollen was suspended by vortex and stamens were removed with tweezers. Pollen tubes were grown at 22°C in the dark for 6 h. During this period, pollen tubes are actively growing and germination rate exceeds 80%. For immunolocalization experiments, pollen tubes were directly chemically fixed according to [7]. For XyG analyses, pollen tubes were separated from the culture medium and ungerminated pollen grains by filtration using a 50-µm nylon mesh filter and rinsed several times with 70% EtOH. Pollen tubes were stored at 4°C in 70% EtOH.

Immunolocalization of XyG epitopes

LM15 (Plant Probes, UK) and CCRC-M1 (Gift of M. Hahn, CCRC, University of Georgia, USA) monoclonal antibodies were used for the detection of XXXG motif and α-Fuc-(1→2)-β-Gal epitopes, respectively [16, 17]. Pollen tubes and cell suspensions were immunolabeled as described in [7, 37], respectively. Controls were performed by omitting the incubation with the primary antibody. Samples were observed with a Leica DMLB microscope under bright field optics and fluorescence illumination with FITC filter sets (absorption: 485-520 nm; emission, 520-560 nm). Pictures were digitally acquired with a Leica DFC300FX camera with the same exposure time.

Cell wall extraction

Cells or leaves were homogenized with a glass potter and treated three times with 70% EtOH at 70°C. The insoluble residues were treated successively with a chloroform/methanol mixture (1:1, v/v) and acetone to yield the cell wall extract.

Preparation of xyloglucan fragments

One to 5 mg of cell wall extract was incubated overnight at 37°C under agitation at 180 rpm in 500 µL of an *endo*-(1-4)-β-D-glucanase (5 units, E.C. 3.2.1.4, Megazyme) prepared in 10 mM ammonium acetate buffer pH 5.0. After the addition of 1.5 mL of EtOH 96% and centrifugation (10 min at 8000*g*), the supernatant was evaporated to concentrate the XyG oligomers. XyG from tamarind seeds was treated similarly and used as a control.

Extraction of the enzyme-resistant hemicellulose fraction

The enzyme-resistant pellet was treated overnight with 4M KOH supplemented with 20 mM $NaBH_4$ to extract the enzyme-resistant XyG. Solutions were neutralized with acetic acid to pH 6, centrifuged and the supernatant was dialyzed against ddH_2O. The hemicellulose-enriched fraction was freeze-dried and submitted to a new *endo*-(1-4)-β-D-glucanase digestion.

MALDI-TOF MS

A voyager DE-Pro MALDI-TOF MS (Applied Biosystems) equipped with a 337-nm nitrogen laser was used to analyze XyG fragments. Mass spectra were performed in the reflector delayed extraction mode using 2,5-dihydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich) as matrix. The matrix, freshly dissolved at 5 $mg.mL^{-1}$ in a solution composed of 70:30 acetonitrile/ 0.1% TFA, was mixed with the water solubilized oligosaccharides in a ratio 1:1 (v/v). The spectra were recorded in a positive mode, using an acceleration voltage of 20,000 V with a delay time of 100 ns and above 50% of the laser energy. They were externally calibrated using commercially available mixtures of peptides and proteins (ProteoMass™ MALDI Calibration Kit, Sigma-Aldrich). Laser shots were accumulated for each spectrum in order to obtain an acceptable signal to noise ratio (sum of 2 spectra of

1000 shots per spectrum). Analyses were performed from three independent biological samples.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information includes four tables and one figure.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by le Grand Réseau de Recherche Végétal, Agronomie et Transformation des Agroressources (GRR VATA) of the region Haute-Normandie and by the University of Rouen. XXX is greatly acknowledged for her comments on and proofreading of the manuscript. Finally, the authors are thankful to Pr. F. Bouteau (University of Paris VI, France) and Dr. A. Muschitz (University of Limoges, France) for providing the Arabidopsis and tomato cell suspensions and to the Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les Peptides 23 (IFRMP23) for the use of the cell imaging facilities (PRIMACEN). Authors have no conflict of interest.

REFERENCES

[1] Lord, E.M., and Russell, S.D. (2002) The mechanisms of pollination and fertilization in plants. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *18*, 81-105.

[2] Johnson, M.A. and Lord, E.M. (2006) Extracellular guidance cues and intracellular signaling pathways that direct pollen tube growth. In The Pollen Tube: A cellular and molecular perspective, R. Malho, ed., Vol. 3 (Springer, Heidelberg), pp. 223-242.

[3] Mollet, J.C., Faugeron, C., and Morvan, H. (2007) Cell adhesion, separation and guidance in compatible plant reproduction. In Plant Cell separation and adhesion, J. Roberts & Z. Gonzalez-Carranza, ed, Annu. Plant Rev. *25*, 69-90.

[4] Geitmann, A. (2010) Mechanical modeling and structural analysis of the primary plant cell wall. Curr. Opin. Plant Biol. *13*, 693–699.

[5] Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. Annu. Rev. Plant Biol. *61*, 263-289.

[6] Hayashi, T and Kaida, R. (2010) Functions of xyloglucan in Plant cells. Mol. Plant, *4*, 17-24.

[7] Dardelle, F., Lehner, A., Ramdani, Y., Bardor, M., Lerouge, P., Driouich, A., and Mollet, J.C. (2010) Biochemical and immunocytological characterizations of Arabidopsis pollen tube cell wall. Plant Physiol. *153*, 1563-1576.

[8] York, W.S., Kumar Kolli, V.S., Orlando, R., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (1996). The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. Carbohydr. Res. *285*, 99-128.

[9] Sims, I.M., Munro, S.L., Currie, G., Craik, D., and Bacic, A. (1996) Structural characterisation of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of Nicotiana plumbaginifolia. Carbohydr. Res. *293*, 147-172.

[10] Jia, Z., Qin, Q., Darvill, A.G., York, W.S. (2003) Structure of the xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. Carbohydr. Res. *338*, 1197-1208.

[11] Hoffman, M., Jia, Z., Pena, M.J., Cash, M., Harper, A., Blackburn, A.R., Darvill, A.G., and York, W.S. (2005) Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. Carbohydr. Res. *340*, 1826–1840.

[12] Angiosperm Phylogeny Group (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group for the orders and families of flowering plants: APGII. Bot. J. Linn. Soc. *141*, 399-436.

[13] Del Bem, L.E., and Vincentz, M.G.A. (2010) Evolution of xyloglucan-related genes in green plants. BMC Evol. Biol. *10*, 341.

[14] Popper, ZA.., and Tuohy, M.G. (2010) Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls. Plant Physiol. *153*, 373-383.

[15] Brewbaker, J.L., and Kwack, B.H. (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot. *50*, 859-865.

[16] Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y., Herve, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G.T., and Knox, J.P. (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. BMC Plant Biol., *8*, 60.

[17] Puhlmann, J., Bucheli, E., Swain, M.J., Dunning, N., Albersheim, P., Darvill, A.G., and Hahn, M.G. (1994) Generation of monoclonal antibodies against plant cell wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal α-(1,2)-linked fucosyl-containing epitope. Plant Physiol. *104*, 699-710.

[18] Balestrini, R., Hahn, M.G., Faccio, A., Mendgen, K., and Bonfante, P. (1996) Differential localization of carbohydrate epitopes in plant cell walls in the presence and absence of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Physiol. *111*, 203-213.

[19] Lerouxel, O., Choo, T.S., Séveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P., and Pauly, M. (2002) Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. Plant Physiol. *130*, 1754-1763.

[20] Obel, N., Erben, V., Schwarz, T., Kuhnel, S., Fodor, A., and Pauly, M. (2009) Microanalysis of plant cell wall polysaccharides Mol. Plant *2*, 922-932.

[21] Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.P., Seitz, H.U., Kato, Y., Pérez L.E., MacLachlan, G.A., et al (1993) An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. Physiol. Plant. *89*, 1-3.

[22] Bai, Y.L., and Lindhout, P. (2007) Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? Ann. Bot. *100*, 1085-1094.

[23] Orsi, C.H., and Tanksley, S.D. (2009) Natural variation in an ABC transporter gene associated with seed size evolution in Tomato species. PLoS Genet. 5, e1000347.

[24] Zablackis, E., York, W.S., Pauly, M., Hantus, S., Reiter, W.D., Chapple, C.C., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (1996). Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of Arabidopsis *mur1*. Science *272,* 1808-1810.

[25] Pauly, M., and Scheller, H.V. (2000) *O*-Acetylation of plant cell wall polysaccharides: identification and partial characterization of a rhamnogalacturonan *O*-acetyl-transferase from potato suspension-cultured cells. Planta *210*, 659-667.

[26] Zou, C.H., Knirel, Y.A., Helbig, J.H., Zähringer, U., and Mintz, C.S. (1999) Molecular cloning and characterization of a locus responsible for *O*-acetylation of the O polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. J. Bacteriol. *181*, 4137-4141.

[27] Anantharaman, V., and Aravind, L. (2010) Novel eukaryotic enzymes modifying cell-surface biopolymers. Biol. Direct, *5*, 1.

[28] Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2009) The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Adv. Appl. Microbiol. *68*, 133-216.

[29] Janbon, G., Himmelreich, U., Moyrand, F., Improvisi, L., and Dromer, F. (2001) Cas1p is a membrane protein necessary for the *O*-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. Mol. Microbiol. *42*, 453-469.

[30] Manabe, Y., Nafisi, M., Verhertbruggen, Y., Orfila, C., Gille, S., Rautengarten, C., Cherk, C., Marcus, S.E., Somerville, S., Pauly, M., Knox, J.P., Sakuragi, Y., Scheller, H.V. (2011) Loss-of-function mutation of REDUCED WALL ACETYLATION2 in Arabidopsis leads to reduced cell wall acetylation and increased resistance to *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. *155*, 1068-1078.

[31] Park, S.Y., Jauh, G.Y., Mollet, J.C., Eckard, K.J., Nothnagel, E.A., Walling, L.L., and Lord, E.M. (2000) A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. Plant Cell *12*, 151-163.

[32] Prado, A.M., Colaco, R., Moreno, N., Silva, A.C., and Feijo, J.A. (2008) Targeting of pollen tubes to ovules is dependent on nitric oxide (NO) signaling. Mol. Plant *1*, 703-714.

[33] Dresselhaus T., and Marton, M.L. (2009) Micropylar pollen tube guidance and burst: adapted from defense mechanisms? Curr. Opin. Plant Biol. *12*, 773-780.

[34] Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, Sprunck S, Takeuchi H, Yui R, Kasahara RD, Hamamura Y, Mizukami A, Susaki D et al., (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. Nature *458*, 357-361.

[35] Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, Wuest SE, Ingram G, Panstruga R, Grossniklaus U. (2010) Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. Science *330*, 968-971.

[36] Chae, K., and Lord, E.M. (2011) Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins. Ann Bot. *doi: 10.1093/aob/mcr015.*

[37] Chevalier, L., Bernard, S., Ramdani, Y., Lamour, R., Bardor, M., Lerouge, P., Follet-Gueye, M.L., and Driouich, A. (2010) Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. Plant J. *64*, 977-989.

[38] Muschitz, A., Faugeron, C., and Morvan, H. (2009) Response of cultured tomato cells subjected to excess zinc: role of cell wall in zinc compartmentation. Acta Physiol. Plant. *31*: 1197-1204.

[39] Errakhi, R., Meimoun, P., Lehner, A., Vidal, V., Briand, J., Corbineau, F., Rona, J.P., and Bouteau, F. (2008) Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. J. Exp. Bot. *59*, 3121-3129.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Graphic representation of the possible endo-glucanase fragments released from the (A) fucogalactoXyG and (B) arabinoXyG.

The structures of the XyG fragments are shown according to the one letter code nomenclature proposed by [21]. Underlined and boldfaced letters represent *O*-acetylated side chains.

Figure 2. *In vitro*-grown pollen tubes and immunolocalization of non-fucosylated and fucosylated XyG in Arabidopsis, tobacco and tomato cell suspensions and pollen tubes.

(A, B) 6 hour-old *in vitro* pollen tubes of tobacco (A) and tomato (B) grown in liquid medium.

(C-H) Immunofluorescence labelling with LM15 of non-fucosylated XyG (XXXG motif) on Arabidopsis cell suspension (C) and pollen tubes (F), tobacco cell suspension (D) and pollen tubes (G) and tomato cell suspension (E) and pollen tubes (H). In (C-E) inserts are the corresponding bright field images.

(I-N) Immunofluorescence labelling with CCRC-M1 of fucosylated XyG on Arabidopsis cell suspension (I) and pollen tubes (L), tobacco cell suspension (J) and pollen tubes (M) and tomato cell suspension (K) and pollen tubes (N). In (I-K) inserts are the corresponding bright field images.

In (G, H, M and N) a close up of a pollen tube is shown.

Figure 3. MALDI-TOF mass spectra of endo-glucanase-generated XyG fragments from tobacco and tomato.

(A) Spectrum from tobacco leaf cell wall
(B) Spectrum from tomato leaf cell wall
(C) Spectrum from tobacco pollen tube cell wall
(D) Spectrum from tomato pollen tube cell wall
(E) Spectrum from the KOH extracted pollen tube cell wall of tobacco
(F) Spectrum from the KOH extracted pollen tube cell wall of tomato

The structures of the XyG fragments are shown according to the nomenclature proposed by [21] and shown in Figure 1. Underlined and boldfaced structures represent *O*-acetylated side chains. * indicates the shift of m/z = 16 corresponding to the signal of the fragments with K^+ adduct ion instead of Na^+.

Figure 4. Comparison of the oligosaccharide profiles of the endo-glucanase sensitive XyG from pollen tube and leaf cell wall.

(A) Tobacco

(B) Tomato

The mean relative abundance (n = 3, ± SD).

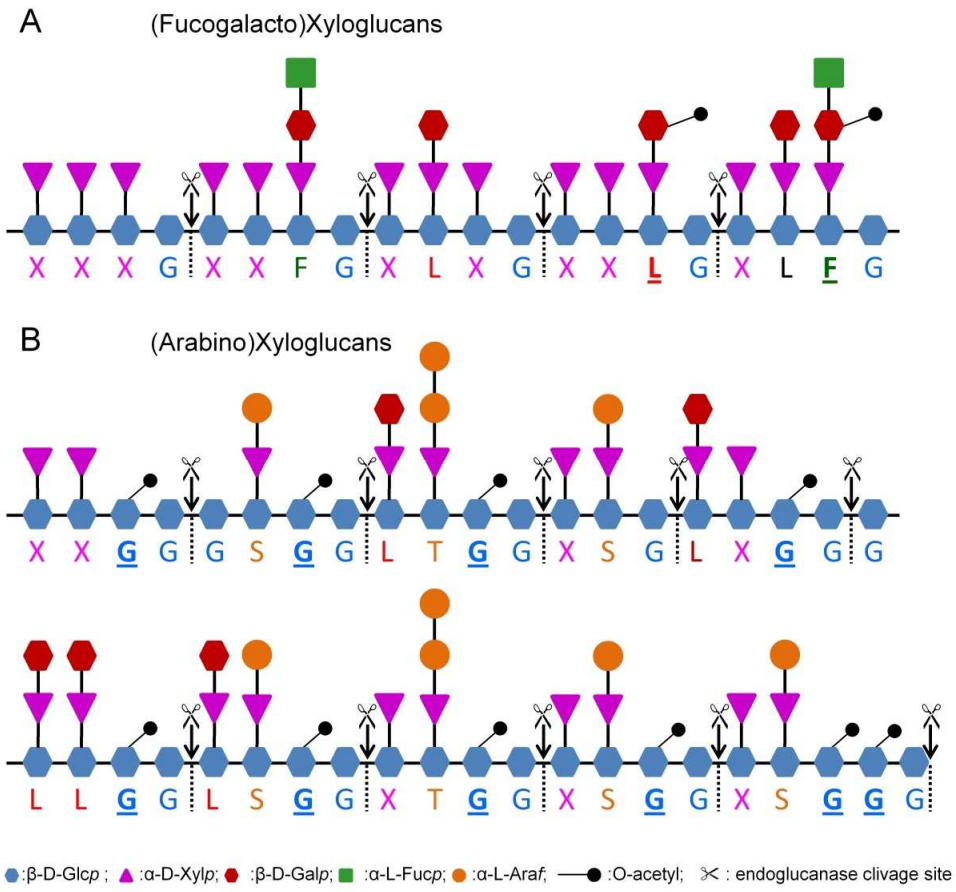


Figure 1. Graphic representation of the possible endo-glucanase fragments released from the (A) fucogalactoXyG and (B) arabinoXyG.

The structures of the XyG fragments are shown according to the one letter code nomenclature proposed by [21]. Underlined and boldfaced letters represent *O*-acetylated side chains.

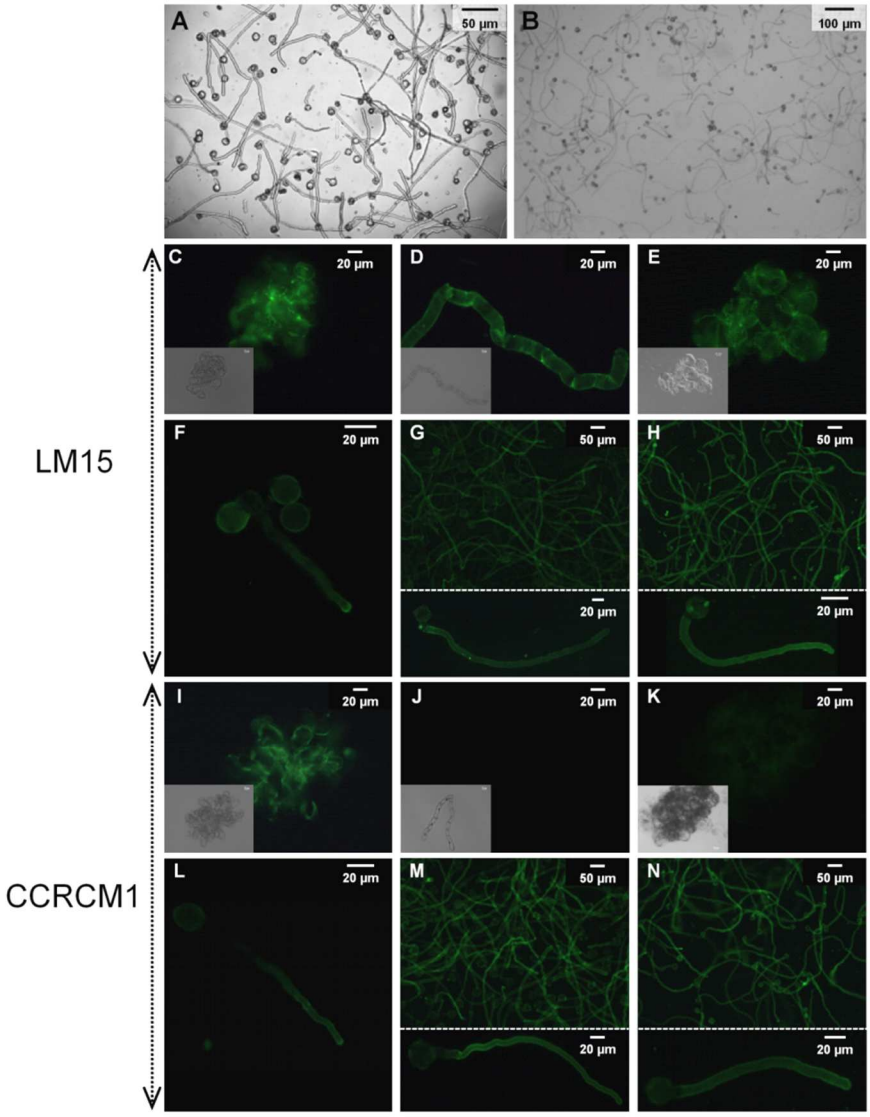


Figure 2. *In vitro*-grown pollen tubes and immunolocalization of non-fucosylated and fucosylated XyG in Arabidopsis, tobacco and tomato cell suspensions and pollen tubes.

(A, B) 6 hour-old *in vitro* pollen tubes of tobacco (A) and tomato (B) cultured in liquid medium.

(C-H) Immunofluorescence labelling with LM15 of non-fucosylated XyG (XXXG motif) on Arabidopsis cell suspension (C) and pollen tubes (F), tobacco cell suspension (D) and pollen tubes (G) and tomato cell suspension (E) and pollen tubes (H). In (C-E) inserts are the corresponding bright field images.

(I-N) Immunofluorescence labelling with CCRC-M1 of fucosylated XyG on Arabidopsis cell suspension (I) and pollen tubes (L), tobacco cell suspension (J) and pollen tubes (M) and tomato cell suspension (K) and pollen tubes (N). In (I-K) inserts are the corresponding bright field images. In (G, H, M and N) a close up of a pollen tube is shown.

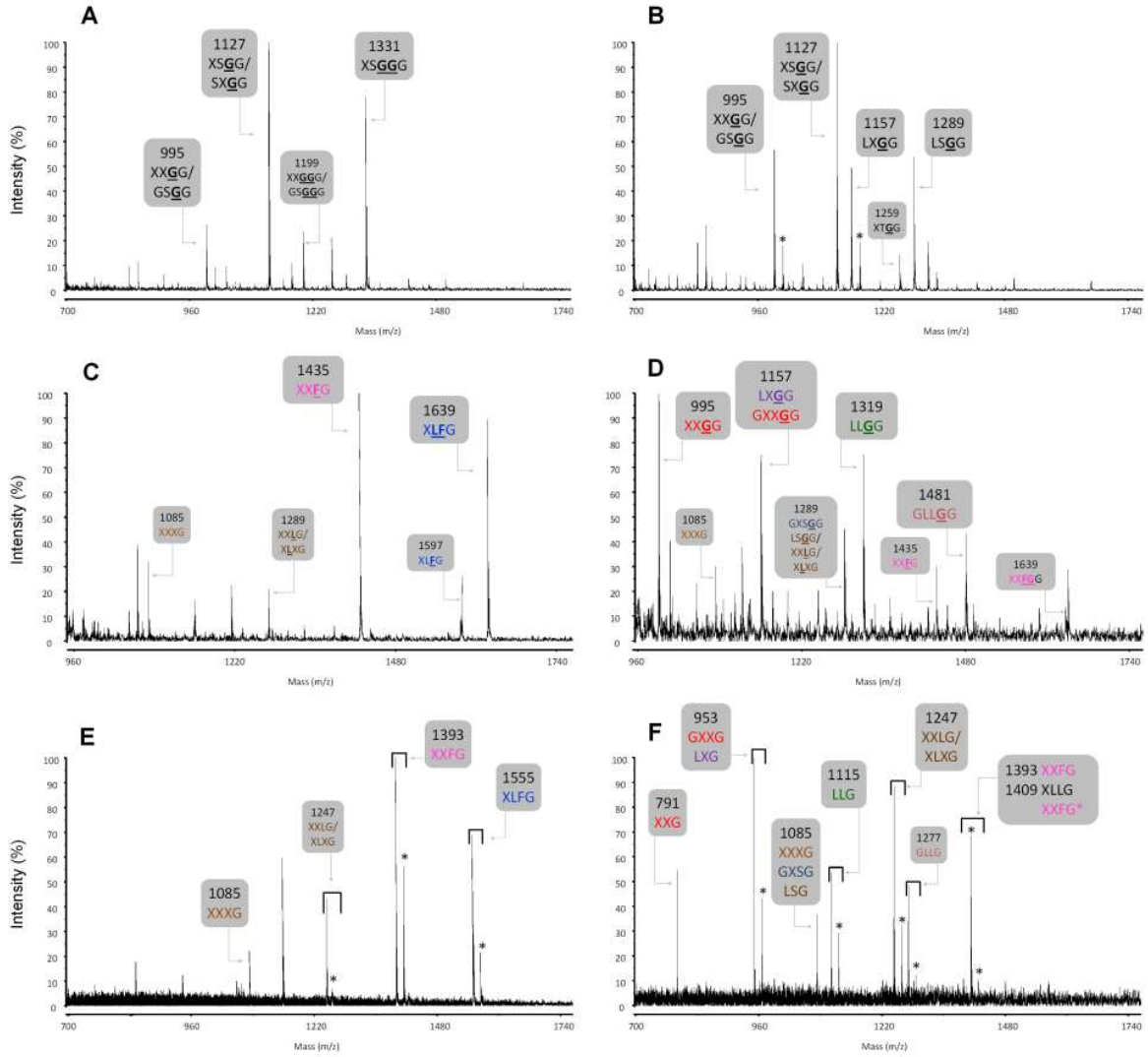


Figure 3. MALDI-TOF mass spectra of endo-glucanase-generated XyG fragments from tobacco and tomato.

(A) Spectrum from tobacco leaf cell wall
(B) Spectrum from tomato leaf cell wall
(C) Spectrum from tobacco pollen tube cell wall
(D) Spectrum from tomato pollen tube cell wall
(E) Spectrum from the KOH fraction extracted from the tobacco pollen tube cell wall
(F) Spectrum from the KOH fraction extracted from the tomato pollen tube cell wall
The structures of the XyG fragments are shown according to the nomenclature proposed by [21] and shown in Figure 1. Underlined and boldfaced structures represent *O*-acetylated side chains. * indicates the shift of m/z = 16 corresponding to the signal of the fragments with K^+ adduct ion instead of Na^+.

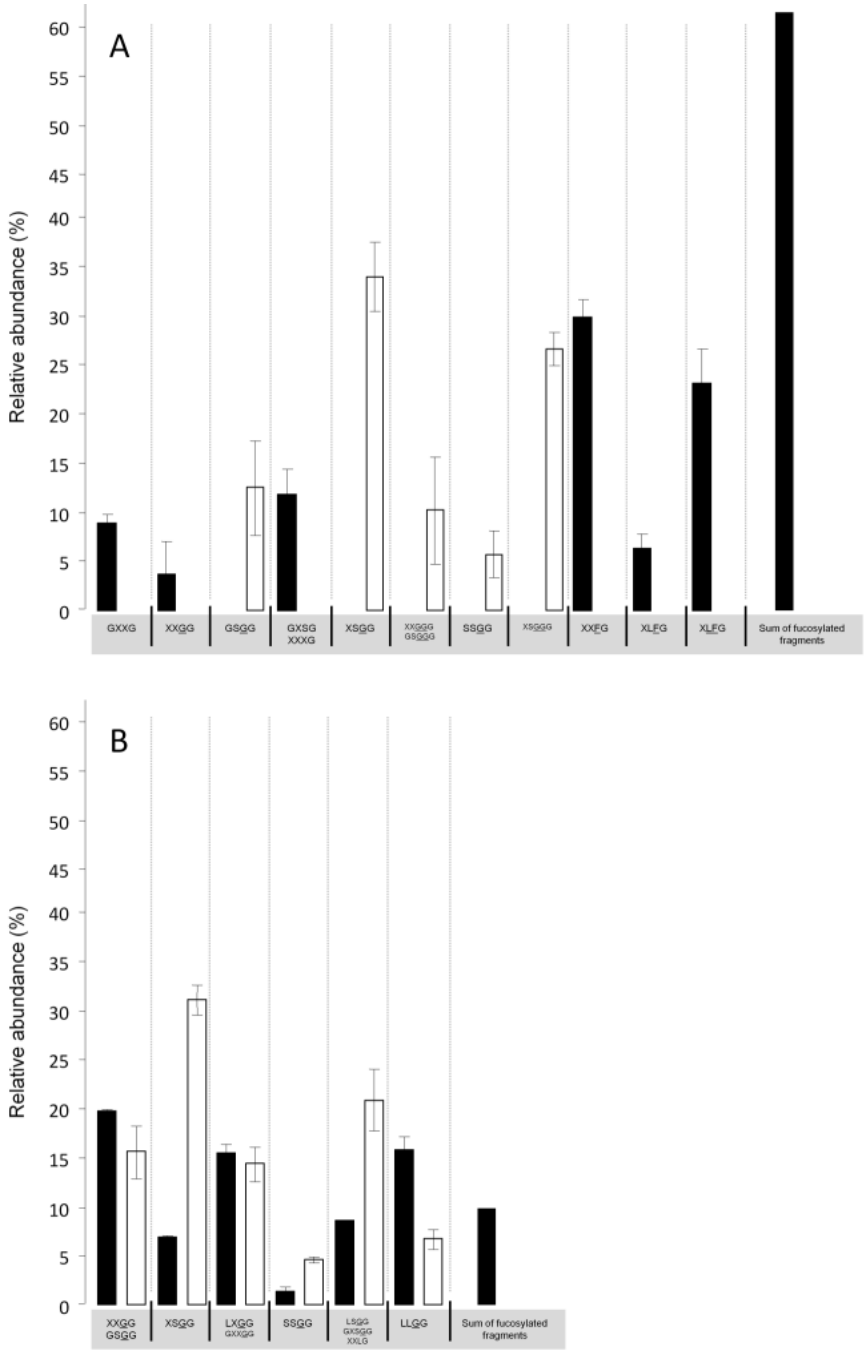


Figure 4. Comparison of the oligosaccharide profiles of the endo-glucanase sensitive XyG from pollen tube and leaf cell wall. (Black: Pollen tubes; White: Leaf)

(A) Tobacco

(B) Tomato

The mean relative abundance (n = 3, ± SD).

Supplemental data

Table S1. Relative quantification of XyG oligosaccharides released after endo-glucanase digestion on the tobacco pollen tube cell wall and the KOH extracted fraction

Mass [a]	Cell wall	KOH	Composition[b]	Possible structure[c]
953	8.8 ± 1[d]	1.0 ± 0.8	Hex_4Pent_2	GXXG
995	3.6 ± 3.4	-	$Hex_4Pent_2OAc_1$	XXGG
1037	-[e]	-		
1055	-	-		
1085	11.7 ± 2.7	5.2 ± 1.2	Hex_4Pent_3	XXXG
1127	-	-		
1157	3.1 ± 0.4	-	$Hex_5Pent_2OAc_1$	GXXGG
1169	-	-		
1199	-	-		
1247	4.5 ± 2	16.8 ± 2.7[f]	Hex_5Pent_3	XXLG/XLXG
1259	-	-		
1289	4.9 ±1.6	-	$Hex_5Pent_3OAc_1$	XXLG/XLXG
1319	-	-		
1331	-	-		
1393	3.0 ± 0.6	50.4 ± 1.4[f]	$Hex_5Pent_3Dox_1$	XXFG
1421	-	-		
1435	29.7 ± 1.9	-	$Hex_5Pent_3Dox_1OAc_1$	XXFG
1555	< 1	26.6 ± 3.3[f]	$Hex_6Pent_3Dox_1$	XLFG
1597	6.2 ± 1.6	-	$Hex_6Pent_3Dox_1OAc_1$	XLFG/XLFG
1639	23.0 ± 3.5	-	$Hex_6Pent_3Dox_1OAc_2$	XLFG
Fucosylated	61.9	77		
O-acetylated	71.9	-		

[a]Mass of the fragments $[M+Na^+]^+$.

[b]Hex, hexose; Pent, pentose; Dox, deoxyhexose; OAc, O-acetyl substituent.

[c]Underlined structures represent *O*-acetylated side chains.

[d]Values are expressed as percentage and are means ± SD from MALDI spectra obtained after endo-glucanase digestion from three different pollen tube cell wall extracts.

[e] not detected above the signal to noise ratio.

[f]Relative abundance of these fragments corresponds to the total of the K^+ and Na^+ adducts as shown in Figure 3E.

Table S2. Relative abundance of XyG oligosaccharides released after endo-glucanase digestion on the tomato pollen tube cell wall and the KOH extracted fraction

Mass [a]	Cell wall	KOH	Composition[b]	Possible structure[c]
953	5.5 ± 0.4[d]	29.9 ± 2.8[f]	Hex_4Pent_2	GXXG
995	19.7 ± 0.2	1.2 ± 0.5	$Hex_4Pent_2OAc_1$	XXGG / GSGG
1037	-[e]	-	-	-
1055	3.3 ± 0.4	-	Hex_3Pent_4	SSG
1085	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.5	Hex_4Pent_3	GXSG / XXXG
1115	-	11.8[f]	Hex_5Pent_2	LLG
1127	6.9 ± 0.1	-	$Hex_4Pent_3OAc_1$	XSGG
1157	15.4 ± 0.9	-	$Hex_5Pent_2OAc_1$	GXXGG
1169	-	-	-	-
1199	2.8 ± 0.4	-	$Hex_5Pent_2OAc_2$	GSGGG / XXGGG
1247	3.4 ± 0.3	24.2 ± 1[f]	Hex_5Pent_3	XXLG / XLXG
1259	1.4 ± 0.4	-	$Hex_4Pent_4OAc_1$	SSGG
1277	-	10 ± 0.6[f]	Hex_6Pent_2	GLLG
1289	8.6	-	$Hex_5Pent_3OAc_1$	XXLG/XLXG
1319	15.8 ± 1.3	-	$Hex_6Pent_2OAc_1$	GLLG
1331	< 1	-	$Hex_5Pent_3OAc_2$	XSGGG
1393	< 1	1.8 ± 0.5	$Hex_5Pent_3Dox_1$	XXFG
1409	-	15.1 ± 1.6[f]	Hex_6Pent_3	XLLG
1421	1.7 ± 0.1	-	$Hex_5Pent_4OAc_1$	GSSGG
1435	4.5 ± 1.1	-	$Hex_5Pent_3Dox_1OAc_1$	XXFG
1555	-	-	-	-
1597	1.5 ± 0.7	-	$Hex_6Pent_3Dox_1OAc_1$	XLFG/XLFG
1639	3.0 ± 1.3	-	$Hex_6Pent_3Dox_1OAc_2$	XLFG
Fucosylated	10	1.8		
O-acetylated	62.6	-		

[a]Mass of the fragments $[M+Na^+]^+$.

[b]Hex, hexose; Pent, pentose; Dox, deoxyhexose; OAc, O-acetyl substituent.

[c]Underlined structures represent *O*-acetylated side chains.

[d]Values are expressed as percentage and are means ± SD from MALDI spectra obtained after endo-glucanase digestion from three different pollen tube cell wall extracts.

[e] not detected above the signal to noise ratio.

[f]Relative abundance of these fragments corresponds to the total of the K^+ and Na^+ adducts as shown in Figure 3F.

Table S3. Relative abundance of XyG oligosaccharides released after endo-glucanase digestion of the cell wall of tobacco BY-2 cells and leaves.

Mass [a]	BY-2 cells	Leaves	Composition[b]	Possible structure[c]
953	- [d]	-	-	-
995	7.5 ± 0.4[e]	12.5 ± 4.8	$Hex_4Pent_2OAc_1$	XXGG / GSGG
1037	1.2 ± 0.2	4.2 ± 0.6	$Hex_4Pent_2OAc_2$	SGGG
1055	± 0.6	1.1 ± 0.6	Hex_3Pent_4	SSG
1085	1 ± 0.3	< 1	Hex_4Pent_3	GXSG
1127	36.5 ± 1	33.9 ± 3.5	$Hex_4Pent_3OAc_1$	XSGG
1157	< 1	1.3 ± 0.8	$Hex_5Pent_2OAc_1$	GXXGG
1169	-	-	-	-
1199	5.6 ± 0.2	10.2 ± 5.4	$Hex_5Pent_2OAc_2$	GSGGG / XXGGG
1247	< 1	< 1	Hex_5Pent_3	GXXXG
1259	7.0 ± 0.3	5.7 ± 2.4	$Hex_4Pent_4OAc_1$	SSGG
1289	2.9 ± 0.5	2.3 ± 0.6	$Hex_5Pent_3OAc_1$	GXSGG
1319	-	-	-	-
1331	32.6 ± 1.1	26.6 ± 1.7	$Hex_5Pent_3OAc_2$	XSGGG
1393	-	-	-	-
1421	2.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3	$Hex_5Pent_4OAc_1$	GSSGG
1435	-	-	-	-
1555	-	-	-	-
1597	-	-	-	-
1639	-	-	-	-
Fucosylated	-	-		
O-acetylated	96.8	98.2		

[a]Mass of the fragments $[M+Na^+]^+$.

[b]Hex, hexose; Pent, pentose; Dox, deoxyhexose; OAc, O-acetyl substituent.

[c]Underlined structures represent *O*-acetylated side chains.

[d] not detected above the signal to noise ratio.

[e]Values are expressed as percentage and are means ± SD from MALDI spectra obtained after endo-glucanase digestion from three different cell wall extracts.

Table S4. Relative abundance of XyG oligosaccharides released after endo-glucanase digestion of the cell wall of tomato cell suspension and leaves.

Mass [a]	Cells	Leaves	Composition[b]	Possible structure[c]
953	1 ± 0.1[d]	< 1	Hex_4Pent_2	GXXG
995	17.5 ± 0.1	15.5 ± 2.7[f]	$Hex_4Pent_2OAc_1$	XXGG / GSGG
1037	-[e]	-	-	-
1055	< 1	4 ± 0.7	Hex_3Pent_4	SSG
1085	< 1	< 1	Hex_4Pent_3	GXSG
1127	26.1 ± 1.6	31 ± 1.5	$Hex_4Pent_3OAc_1$	XSGG
1157	9.8 ± 0.8	14.3 ± 1.8[f]	$Hex_5Pent_2OAc_1$	LXGG / GXXGG
1169	21.2 ± 0.4	-	$Hex_5Pent_1OAc_2$	TGGG
1199	3.8 ± 0.1	< 1	$Hex_5Pent_2OAc_2$	GSGGG / XXGGG
1247	-	-	-	-
1259	7.7 ± 0.5	4.6 ± 0.3	$Hex_4Pent_4OAc_1$	SSGG
1289	4.5 ± 0.2	20.8 ± 3.1	$Hex_5Pent_3OAc_1$	GXSGG
1319	1.5 ± 0.2	6.7 ± 1	$Hex_6Pent_2OAc_1$	LLGG
1331	4.5 ± 0.2	< 1	$Hex_5Pent_3OAc_2$	XSGGG
1393	-	-	-	-
1421	< 1	1.6 ± 0.4	$Hex_5Pent_4OAc_1$	GSSGG
1435	-	-	-	-
1555	-	-	-	-
1597	-	-	-	-
1639	-	-	-	-
Fucosylated	-	-		
O-acetylated	97.6%	96.5%		

[a]Mass of the fragments $[M+Na^+]^+$.

[b]Hex, hexose; Pent, pentose; Dox, deoxyhexose; OAc, O-acetyl substituent.

[c]Underlined structures represent *O*-acetylated side chains.

[d]Values are expressed as percentage and are means ± SD from MALDI spectra obtained after endo-glucanase digestion from three different cell wall extracts.

[e] not detected above the signal to noise ratio.

[f]Relative abundance of these fragments corresponds to the total of the K^+ and Na^+ adducts as shown in Figure 3B.

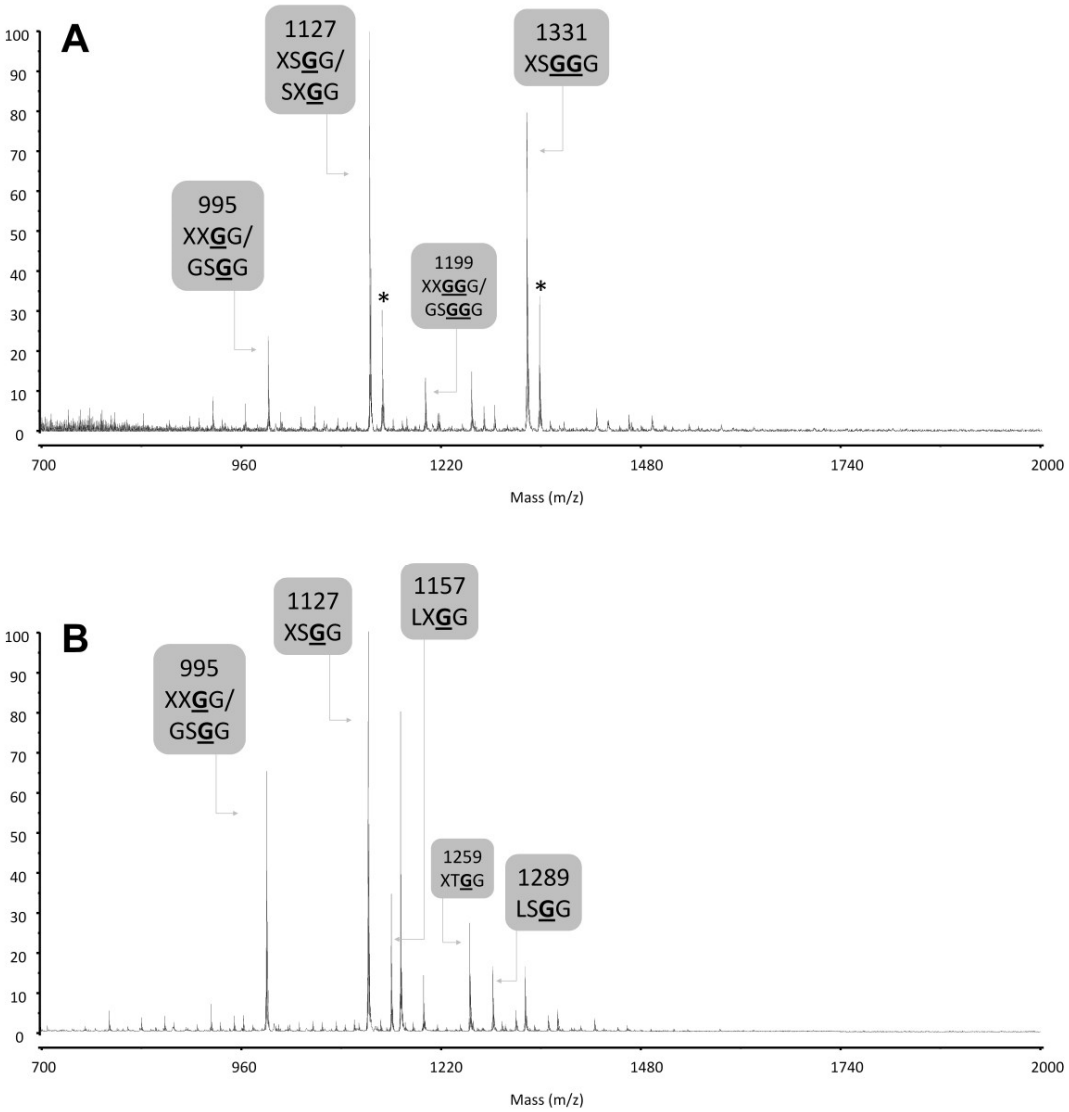


Figure S1. MALDI-TOF mass spectra of endo-glucanase-generated XyG fragments from tobacco (A) and tomato (B) cell suspension cultures.

The structures of the XyG fragments are shown according to the nomenclature proposed by Fry et al. (1993) and shown in Figure 1. Underlined and boldfaced structures represent *O*-acetylated side chains. * indicates the shift of m/z = 16 corresponding to the signal of the fragments with K^+ adduct ion instead of Na^+.

2. Etude de l'adhésion cellulaire des tubes polliniques par une approche de génétique chimique

2.1. Tests de germination *in vitro*

Avant d'appréhender le criblage de la chimiothèque, de nombreux paramètres doivent être optimisés : la culture des tubes polliniques en plaque 96-puits, la densité de pollen nécessaire à une bonne germination et l'influence du DMSO (DiMéthylSulfOxyde), solvant utilisé pour solubiliser les produits chimiques, sur la germination et la croissance des tubes polliniques. Malheureusement, le manque de matériel, et plus particulièrement de matrice, ne nous a pas permis de réaliser les études statistiques pré-criblage, à savoir le calcul du facteur Z' et S/N, car elles nécessitent trois réplicats d'une plaque 96-puits.

2.1.1. Influence de la densité de grains de pollen en culture sur la germination

Dans un premier temps, il est nécessaire d'optimiser le volume de milieu de culture et la densité de grains de pollen requis pour établir un test biologique reproductible. L'ensemble des expérimentations est réalisé dans un volume final de 200 µL. Une première expérience a permis de comptabiliser le nombre de grains de pollen collectés dans un volume final de 200 µL de milieu de germination en fonction du nombre de fleurs (Figure 25A). La seconde a permis de déterminer le taux de germination des grains de pollen selon la densité de pollen cultivé (Figure 25B).

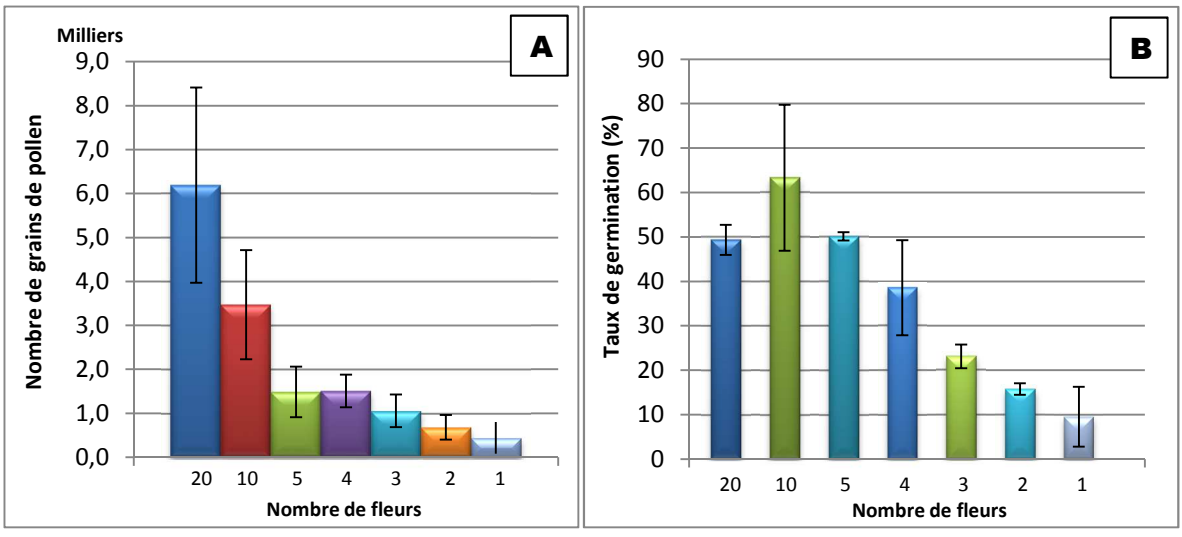


Figure 25 : Estimation (A) du nombre de grains de pollen collecté en fonction du nombre de fleurs utilisées et (B) mesure du taux de germination selon la densité de pollen cultivé.

La figure 25A montre une relative corrélation entre le nombre de grains de pollen collectés et le nombre de fleurs utilisées. Ainsi, pour 20 fleurs, le nombre moyen de grains de pollen récoltés est de 6200 soit une moyenne de 350 grains de pollen par fleur. La figure 25B montre une allure gaussienne dont le maximum de germination (63 %) est obtenu avec une densité de pollen issue de 10 fleurs. Néanmoins, à cette densité de culture (3500 grains de pollen dans 200 µL), les observations et le dénombrement au fond des puits de la plaque sont difficiles en raison du nombre trop important de tubes polliniques. De ce fait, nous avons opté, pour le criblage de la chimiothèque, pour une densité de pollen issue de 5 fleurs soit 1500 grains de pollen par puits. Dans ces conditions, la germination des grains de pollen, de l'ordre de 50 %, et cette densité, permettent une visibilité et un dénombrement sans difficulté.

2.1.2. Influence du DMSO sur la germination des grains de pollen

Le DMSO est un solvant aprotique polaire utilisé pour solubiliser et conserver les molécules de la chimiothèque. Néanmoins, le DMSO peut influencer et perturber les processus biologiques. Pour cette raison, différentes concentrations de DMSO ont été testées sur la germination des grains de pollen (Figure 26).

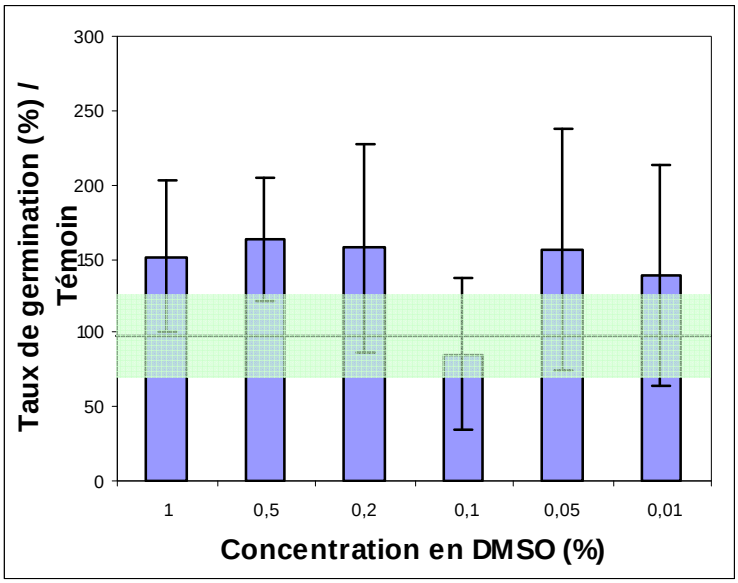


Figure 26 : Influence de la concentration en DMSO sur le taux de germination des grains de pollen.

Résultats de 3 expériences indépendantes et de 3 comptages par condition

Le taux de germination est exprimé par rapport au témoin (germination sans DMSO) dont l'intervalle créé par les écart-types est représenté par une bande bleu ciel (Figure 26). L'ensemble des valeurs est proche du contrôle suggérant que les concentrations en DMSO testées n'influencent pas la germination des grains de pollen. Pour le criblage primaire de la chimiothèque, nous utiliserons une concentration finale de molécules de 20 µM, correspondant à une concentration finale en DMSO de 0,2%. A cette concentration, le solvant n'affecte pas la germination des grains de pollen par rapport au contrôle.

2.2. Préparation de la chimiothèque

La chimiothèque dont nous disposons est constituée de 258 molécules. Huit proviennent de la chimiothèque commerciale peakdale® et isolées lors d'un crible primaire sur l'adhésion des tubes polliniques chez le lys (Mollet *et al.*, non publié). Les 250 autres composés ont été acquis suite à la signature d'un accord de transfert de matériel établi avec le laboratoire du CERMN (Centre d'Etude et de Recherche sur le Médicament de Normandie) de l'Université de Caen. Ces 250 composés fournis sous forme de poudre dans des piluliers sont des chefs de famille bioactifs et forment une chimiothèque essentielle. L'ensemble de ces molécules a été dissout dans 100% de DMSO et réparti dans 3 plaques mères de 96-puits à fond plat à une concentration de 10 mM (Figure 27). Les puits représentés en rouge servent aux contrôles et ne contiennent que du DMSO seul.

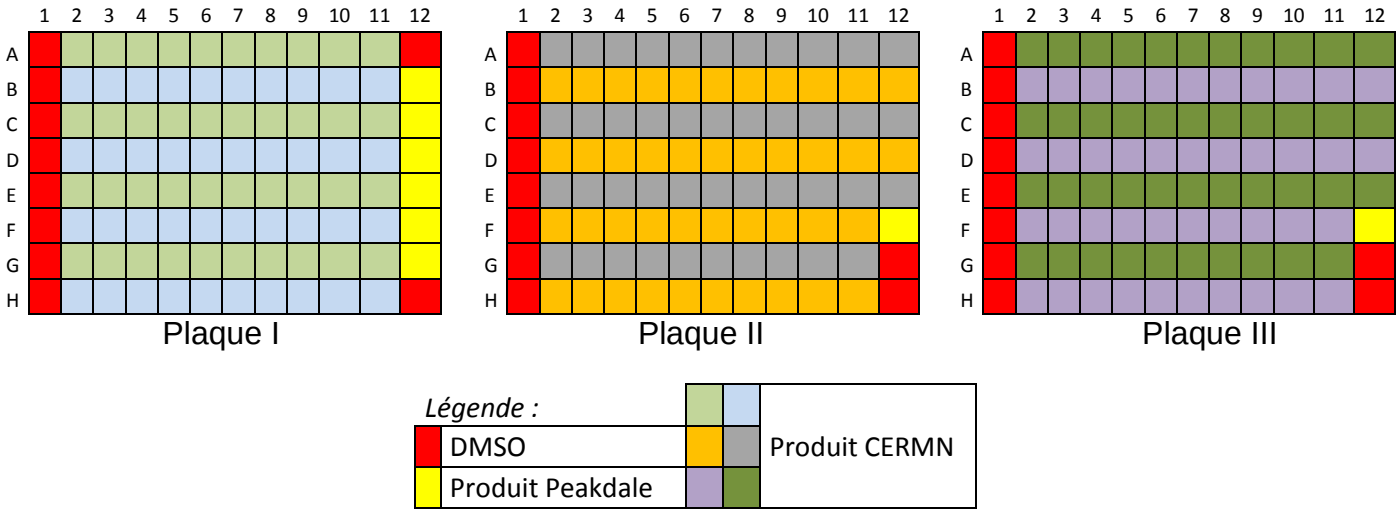


Figure 27 : Schéma illustrant la répartition des différentes molécules dans les plaques 96-puits.

Chacun des puits est noté par le numéro de la plaque et par le numéro du puits. Par exemple, la molécule de la plaque 1 situé sur la 2ème ligne et la 4ème colonne portera le nom de I-B4. Les composés sont pour la plupart incolores mais certains présentent dans le visible une coloration (orange, jaune ou brun) (Figure 28). D'autres composés émettent une fluorescence après excitation sous ultra-violet (Figure 28).

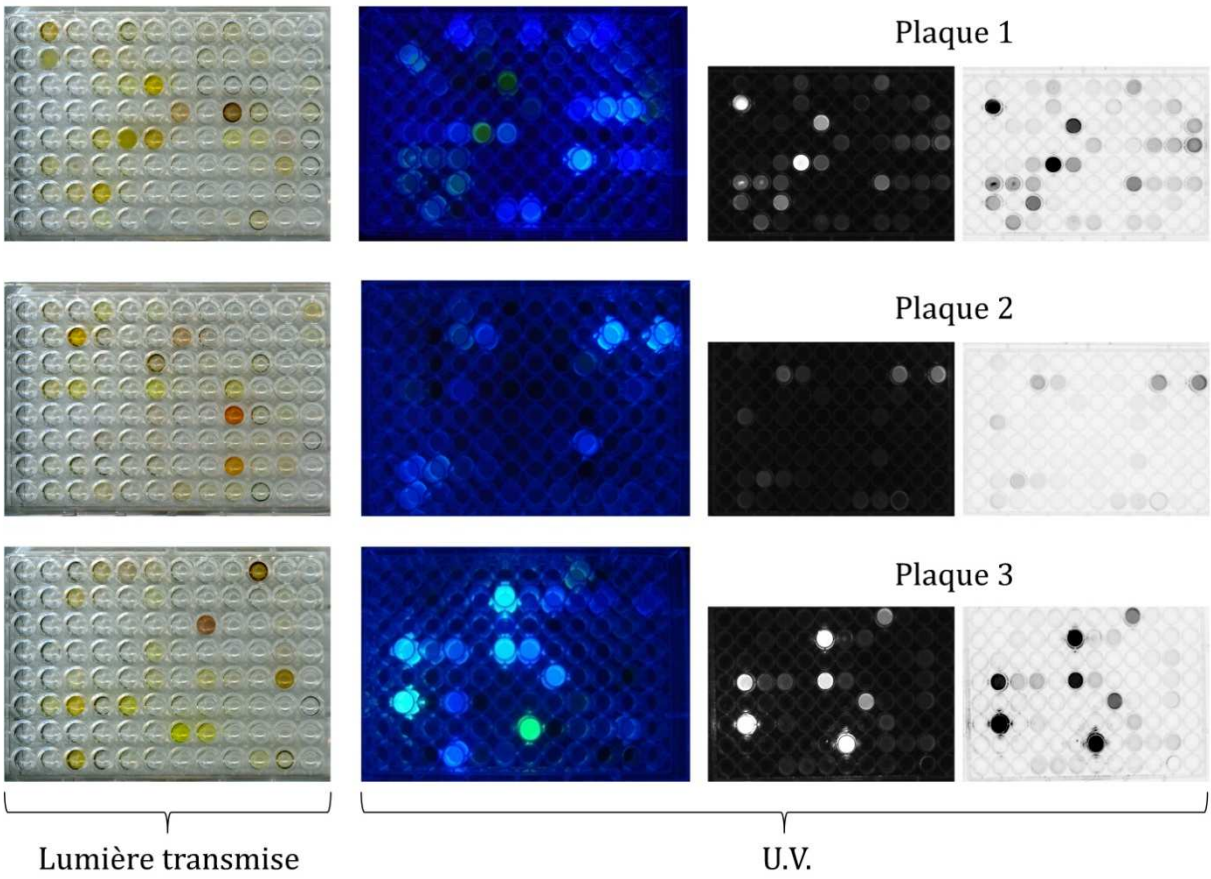


Figure 28 : Propriétés d'émission des molécules de la chimiothèque sous lumière visible et ultra-violet.

La fluorescence de ces molécules pourrait être un atout pour une future localisation directe évitant ainsi de devoir coupler chimiquement la molécule avec un fluorophore. Des plaques filles ont ensuite été préparées à 500 µM en diluant le DMSO dans de l'eau mQ. L'ensemble des piluliers, plaques mères et filles, est stocké au congélateur à - 80°C.

2.3. Mise en place de la matrice artificielle d'adhésion

La matrice est déposée au fond des puits et séchée par évaporation avant de réaliser le test d'adhésion. Le dépôt de la matrice entraîne une accumulation de matériel dans la

périphérie du fond du puits. Pour cette raison, seule la partie centrale est observée au microscope (Figure 29). Cette surface, colorée en rouge, correspond à environ 12 mm^2, soit 35 % de la surface totale d'un puits. Les lignes observées correspondent à des rayures façonnées sous la plaque.

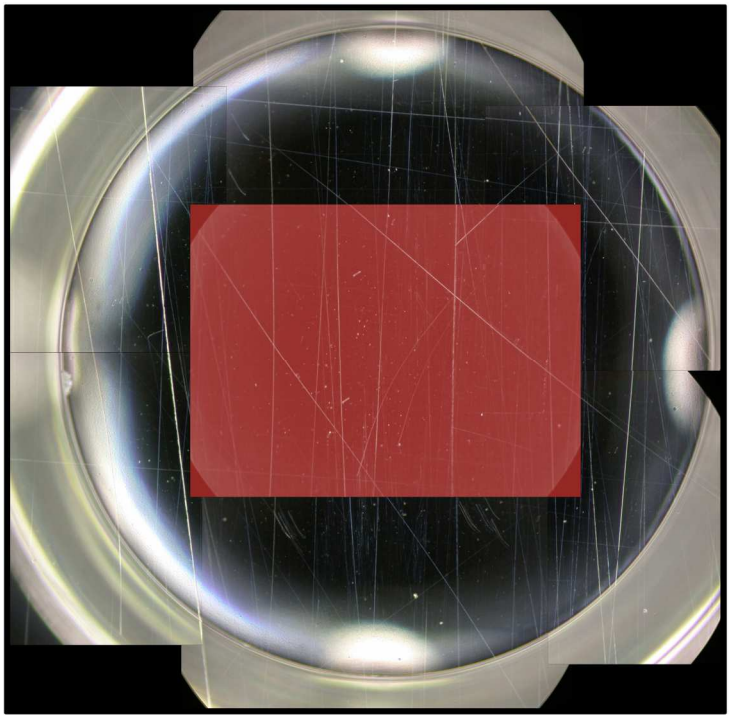


Figure 29 : Zone prise en compte dans le puits lors de l'examen de l'adhésion des tubes polliniques d'Arabidopsis.

La zone rouge indique l'aire observée.

2.3.1. Optimisation de la matrice d'adhésion

Les travaux d'adhésion des tubes polliniques menés *in vitro* chez le lys ont montré une optimisation de l'extraction des polymères pectiques adhésifs par 500 mM imidazole-HCl, pH 7 (Mollet *et al.*, 2000). Différents extraits pectiques ont été isolés par l'imidazole et l'oxalate d'ammonium à partir de fleurs d'*Arabidopsis thaliana*. En guise de témoin négatif, les matrices sont soit digérées par l'*endo*-polygalacturonase (EPG) (Figure 30), soit remplacées par de l'eau.

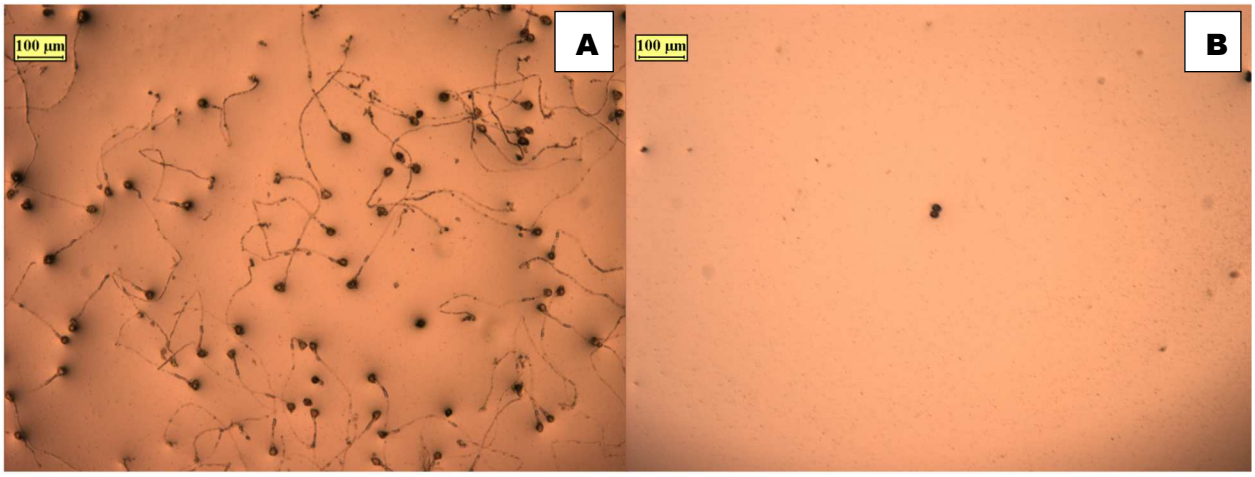


Figure 30 : Test d'adhésion des tubes polliniques d'Arabidopsis sur une matrice pectique extraite de fleurs avec l'imidazole.

A : matrice pectique brute non traitée. B : matrice préalablement digérée par l'EPG.

Dans la figure 30A, après avoir éliminé le milieu liquide de culture, les tubes polliniques restent adhérés à la matrice pectique. Si cette matrice est préalablement digérée par de l'enzyme EPG, on observe alors une perte totale de l'adhésion des tubes polliniques (Figure 30B). Seuls quelques grains de pollen non germés restent dans le fond du puits. Des résultats similaires ont été observés lorsque la matrice est remplacée par de l'eau mQ.

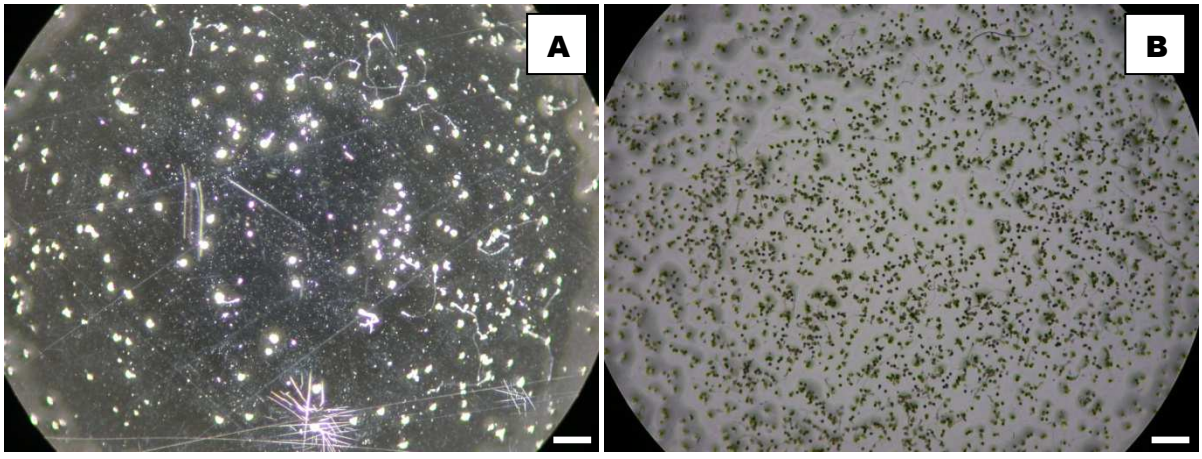


Figure 31 : Observation après rinçage de l'adhésion des tubes polliniques selon différentes concentrations de matrices.

A : 20 µg de matrice, peu de tubes sont adhérés ; B : 90 µg de matrice, les grains de pollen restent fixés à la matrice

Barre d'échelle : 220 µm

Afin de déterminer la quantité de matrice nécessaire pour obtenir une adhésion suffisante des tubes polliniques, des concentrations différentes de matrice sont déposées dans le fond des puits. La quantité optimale de matrice à déposer varie légèrement d'une préparation à une autre. Néanmoins, des quantités optimales de matrice de 50 à 70 µg permettent d'obtenir une adhésion significative. Des quantités inférieures réduisent considérablement le nombre de tubes polliniques adhérés (Figure 31A), inversement des quantités supérieures induisent l'adhésion importante de grains de pollen non germés (Figure 31B).

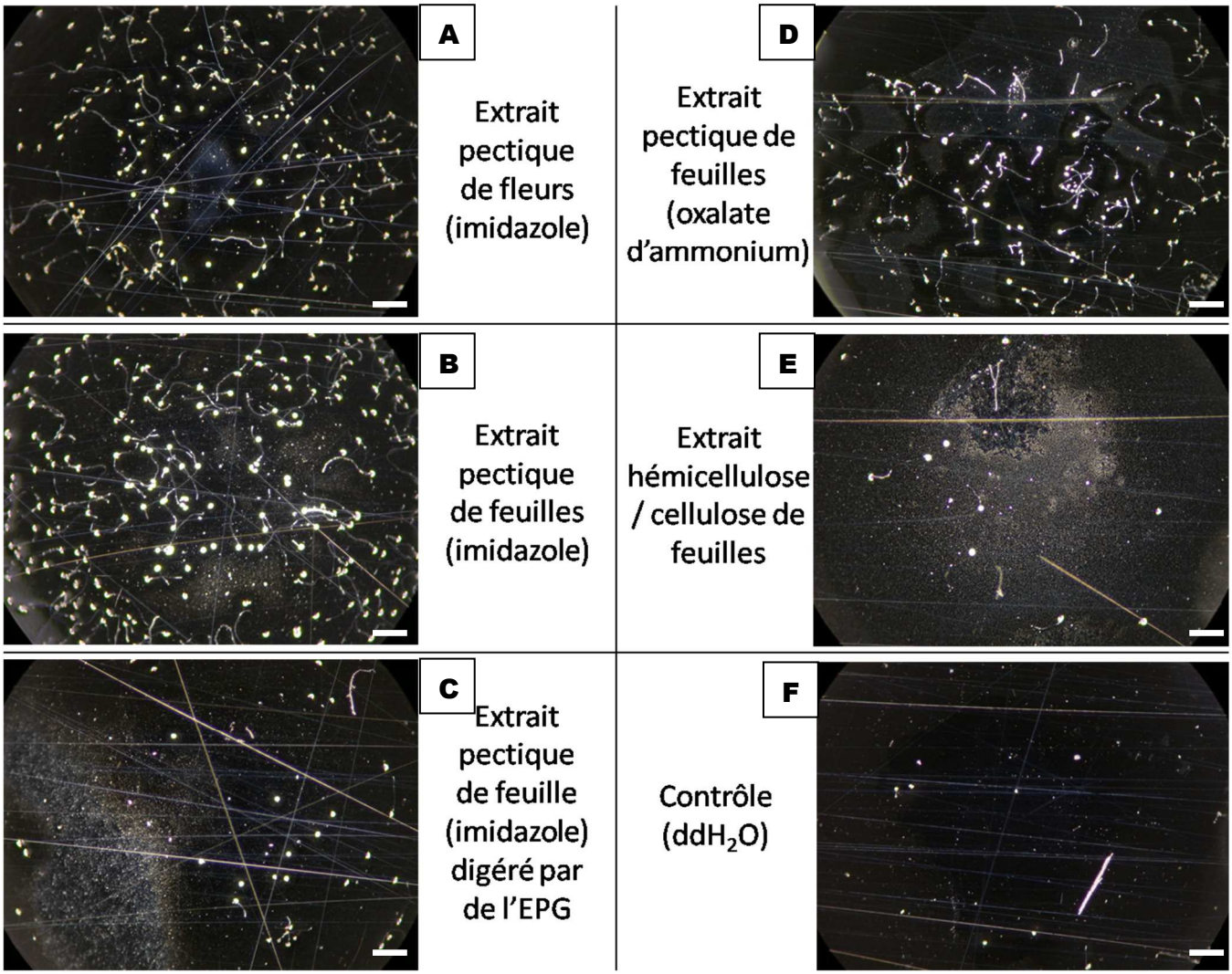


Figure 32 : Photographies illustrant l'adhésion des tubes polliniques d'Arabidopsis sur des extraits pectiques isolés à partir de fleurs et de feuilles avec l'imidazole et l'oxalate d'ammonium.

EPG : *endo*-polygalacturonase. Barre d'échelle : 330 µm

Dans un premier temps, les essais d'adhésion ont été réalisés avec des extraits pectiques issus de 10460 fleurs d'*Arabidopsis thaliana*. Malheureusement, le rendement d'extraction est faible puisque 10 mg d'extrait à l'imidazole ont été obtenus. Des extraits pectiques de feuilles dont les quantités sont moins limitantes ont été isolés afin de déterminer s'ils pouvaient se substituer à ceux extraits des fleurs. Pour cela, les parois de jeunes feuilles avant montaison ont subi un premier traitement à l'imidazole puis un second à l'oxalate d'ammonium. A la suite de ces traitements, le résidu insoluble (mélange hémicellulose - cellulose) a également été testé. Une partie de ces extraits à l'imidazole de feuilles a été digérée par l'EPG pour servir de témoin négatif. L'ensemble de ces fractions a été testé comme matrice adhésive (Figure 32).

Une adhésion importante des tubes polliniques est observée avec les extraits imidazole provenant de fleurs (Figure 32A) ou de feuilles (Figure 32B). Lorsque la matrice est digérée par l'EPG, seuls quelques grains et tubes polliniques restent adhérés sur la matrice (Figure 32C). L'extrait à l'oxalate d'ammonium à partir de feuilles induit aussi l'adhésion des tubes polliniques qui semblent cependant moins longs que ceux observés sur la matrice extraite à l'imidazole (Figure 32D). La matrice élaborée à partir du résidu insoluble n'induit pas d'adhésion (Figure 32E), tout comme le témoin négatif (Figure 32F). L'ensemble de ces observations a ensuite été quantifié en établissant le rendement d'adhésion des tubes polliniques. Ce rendement a été estimé en faisant le rapport du nombre de tubes polliniques adhérés (après rinçage) sur le nombre total de tubes polliniques présents dans le milieu de culture (avant rinçage) (Tableau 7).

Tableau 7 : Rendement d'adhésion des tubes polliniques selon l'origine des extraits pariétaux.

Résultat de 5 comptages indépendant avec 70 µg de matrice.

Organe	Fraction pariétale	Extraction et traitement	Rendement d'adhésion (%)
Fleur	Pectines	Imidazole	**39,4**
Feuille	Pectines	Imidazole	**33,1**
Feuille	Pectines	Imidazole + EPG	**2,4**
Feuille	Pectines	Oxalate d'ammonium	**13,0**
Feuille	Hémicellulose/cellulose	-	**2,3**

Le meilleur rendement d'adhésion est obtenu avec la fraction imidazole issue de fleurs d'Arabidopsis (39,4%). Néanmoins, l'adhésion induite par l'extrait imidazole de feuilles

montre un taux d'adhésion assez proche (33,1%) de celui mesuré avec l'extrait issu des fleurs. Le témoin (extrait digéré à l'EPG) et l'extrait insoluble hémicellulose / cellulose montrent un rendement d'adhésion qui ne dépasse pas 2,5%. Enfin, l'extrait pectique de feuilles isolé avec l'oxalate d'ammonium montre un taux d'adhésion intermédiaire (13%). Une expérience similaire réalisée en utilisant 50 µg de matrice a donné des résultats identiques. Ces résultats semblent indiquer que l'extraction avec l'imidazole à partir de fleurs et de feuilles induisent des taux d'adhésion assez proches.

2.3.2. Caractérisation de la matrice

Les différents extraits pariétaux ont été analysés en utilisant les techniques de *dot blot* couplées à des anticorps dirigés contre des épitopes polysaccharidiques et de chromatographie en phase gazeuse.

2.3.2.1. Composition monosaccharidique

La composition monosaccharidique des matrices extraites avec l'imidazole et induisant des rendements d'adhésion les plus importants est présentée dans la figure 33.

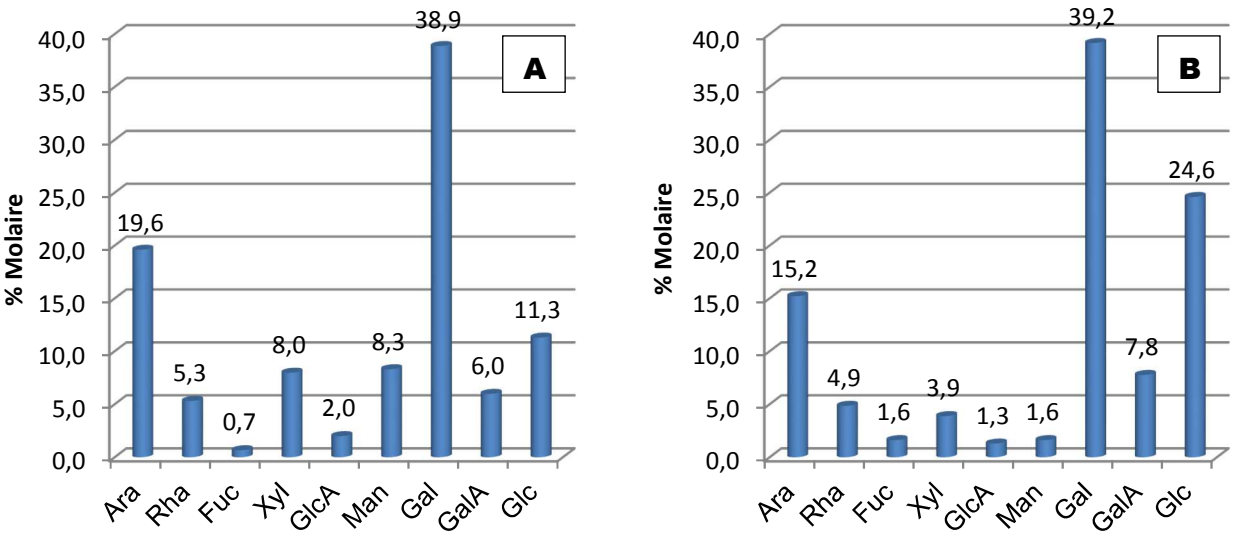


Figure 33 : Composition en monosaccharides des matrices pectiques (A) de fleurs et de feuilles (B) extraites avec l'imidazole.

Les deux graphiques de la figure 33 présentent un profil similaire. Le galactose et l'arabinose sont les monosaccharides majoritaires. L'extrait imidazole provenant des feuilles contient néanmoins un taux de glucose nettement plus important que dans celui

isolé des fleurs, provenant sans aucun doute de l'amidon. L'acide galacturonique représente une faible proportion dans les deux cas. Enfin, le ratio rhamnose/acide galacturonique est de 0,9 pour l'extrait imidazole issu de fleurs (Figure 33A) et de 0,6 pour l'extrait issu de feuilles (Figure 33B). Ceci semble indiquer que les RG-I sont les constituants majoritaires de la matrice par rapport aux HG.

Suite au traitement avec l'imidazole, la fraction insoluble a été incubée avec de l'oxalate d'ammonium. L'analyse monosaccharidique montre un profil différent (Figure 34A), tout comme la fraction résiduelle (Figure 34B) par rapport au profil des extraits à l'imidazole.

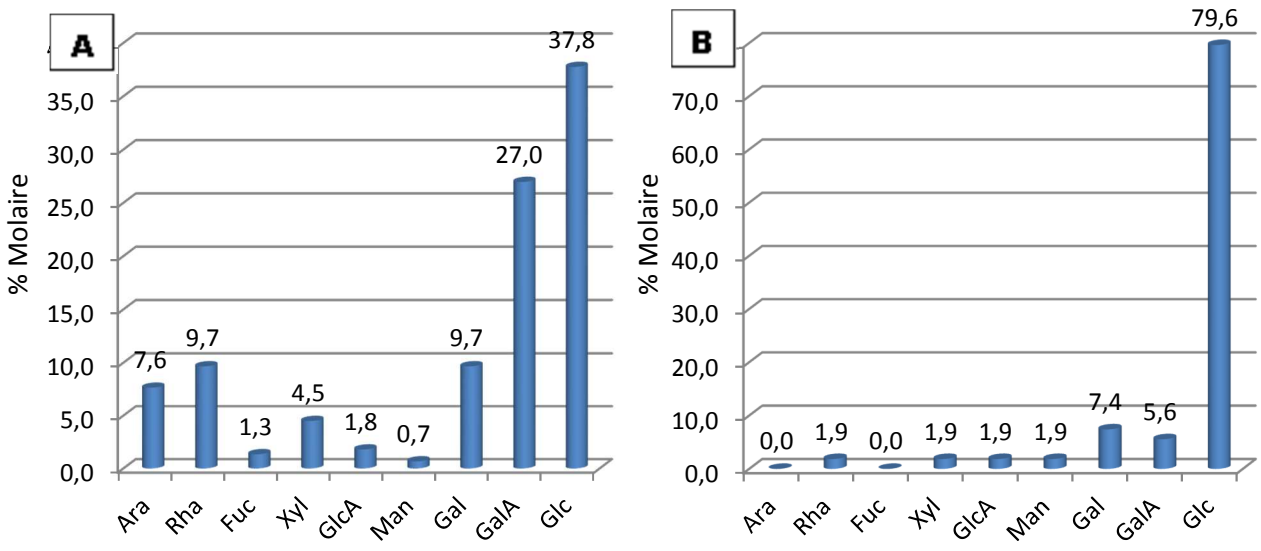


Figure 34 : Composition en monosaccharides de (A) l'extrait de feuilles isolé par l'oxalate d'ammonium et (B) du résidu hémicellulose/cellulose.

Contrairement aux fractions isolées avec l'imidazole, la fraction extraite par l'oxalate d'ammonium ne montre pas une teneur importante en arabinose et galactose (Figure 34A). Les monosaccharides majoritaires sont le glucose avec 37,8% et l'acide galacturonique avec 27%. Le rapport Rha/GalA est de 0,3 suggérant une dominance des HG. La fraction résiduelle enrichie en hémicelluloses et celluloses présente un taux en glucose élevé proche de 80 % (Figure 34B). Les autres monosaccharides sont observés dans de faibles proportions.

La teneur élevée en glucose, dans les fractions issues de feuilles, est très probablement originaire des amyloplastes.

2.3.2.2. Immuno-réactivité des extraits par dot blot

Différents anticorps dirigés contre des épitopes pectiques pariétaux ont été testés sur les différents extraits (Figure 35).

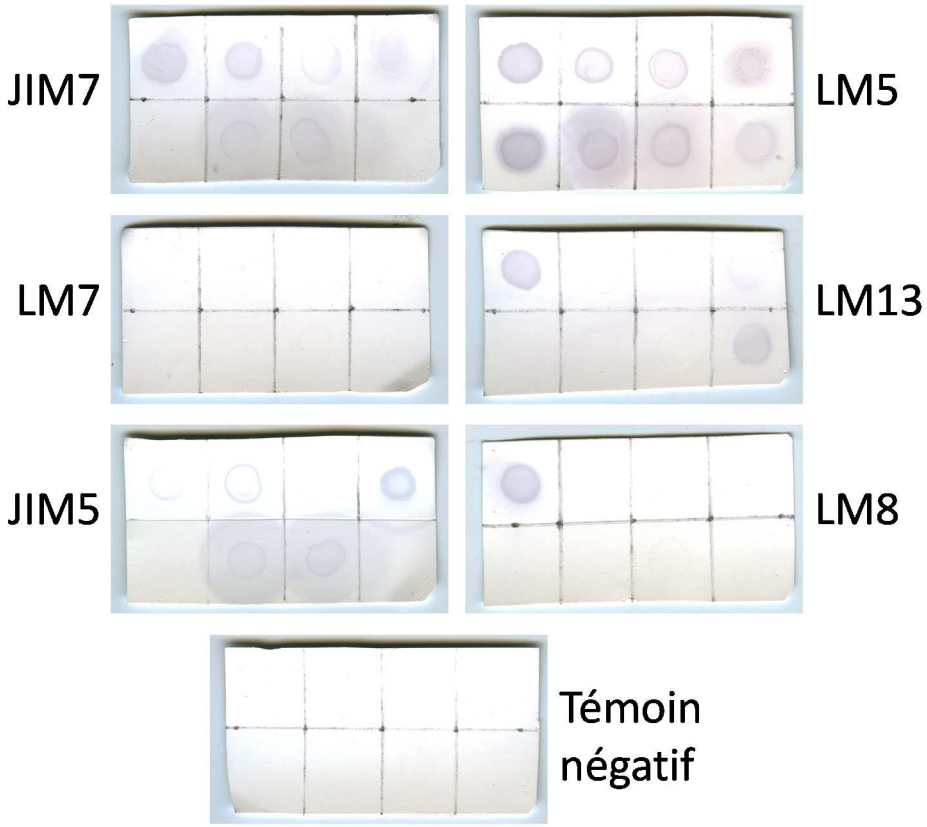


Figure 35 : Immuno-dot-blot des différentes matrices d'adhésion.

Légende : Répartition des extraits sur la membrane de nitrocellulose

Imidazole (fleurs)	Imidazole (feuilles)	Imidazole + EPG (feuilles)	Oxalate d'ammonium (feuilles)
Témoin pectines Méthylation : 84%	Témoin pectines Méthylation : 20-34 %	Témoin pectines Méthylation : 7,4 %	Témoin arabinanes

Les fractions extraites de fleurs et de feuilles par l'imidazole montrent un marquage similaire avec toutefois un marquage spécifique des anticorps LM8 et LM13 pour l'extrait floral. Ces deux anticorps sont spécifiquement et respectivement dirigés contre le xylogalacturonane et les longues chaines arabinanes du RG-I (Willats *et al.*, 2004, Moller *et al.*, 2008). L'anticorps JIM5 reconnait les épitopes HG faiblement méthylestérifiés principalement dans la fraction oxalate d'ammonium tandis que

l'anticorps JIM7 dirigé contre les HG partiellement méthylestérifiés marque les autres fractions, excepté la fraction obtenue avec l'oxalate d'ammonium. L'anticorps LM7, reconnaissant des HG possédant des groupements méthylestérifiés répartis aléatoirement (Clausen *et al.*, 2003) tout comme le témoin négatif, n'ont donné aucun marquage. Tous les extraits réagissent à l'anticorps LM5, spécifiquement dirigé contre les chaines galactanes du RG-I (Jones *et al.*, 1997). L'extrait issu de fleurs est le plus intensément marqué.

Les matrices sont riches en HG et en chaines galactanes. Les matrices extraites à l'imidazole sont plus riches en HG fortement méthylestérifiés que dans la fraction extraite à l'oxalate d'ammonium, et inversement pour les HG faiblement méthylés.

2.4. Le criblage de la chimiothèque

2.4.1. Criblage primaire

Ce sont les matrices de feuilles extraites à l'imidazole qui ont été choisies pour réaliser les différents criblages. Les différents paramètres établis : quantité de matrice : 70 µg ; concentration finale des molécules à tester : 20 µM (concentration généralement utilisée lors de criblages primaires) et concentration finale en DMSO : 0,2%, le criblage primaire des molécules a pu être entrepris. Sur les 258 molécules testées, plusieurs phénotypes autres qu'un défaut d'adhésion ont pu être observés. Un premier criblage visuel avant le rinçage des puits a permis de dénombrer 11 puits dont les molécules présentaient une précipitation empêchant l'exploitation des résultats. Par ailleurs, 60 molécules provoquent un défaut de germination et 47 semblent altérer la taille des tubes polliniques comparativement au témoin (Figure 36).

Dans la figure 36B, la majorité des grains de pollen n'a pas germé. Ceux qui ont germé présentent des tubes polliniques n'excédant pas 70 µm de long après 6h de culture tandis que la germination et la longueur des tubes ne sont pas affectées dans la condition témoin (Figure 36A). Dans la figure 36C, les tubes polliniques ont un taux de germination comparable à celui observé dans la condition témoin. Néanmoins, la longueur des tubes est inférieure (< 250 µm) à celle observée chez le témoin (> 500 µm).

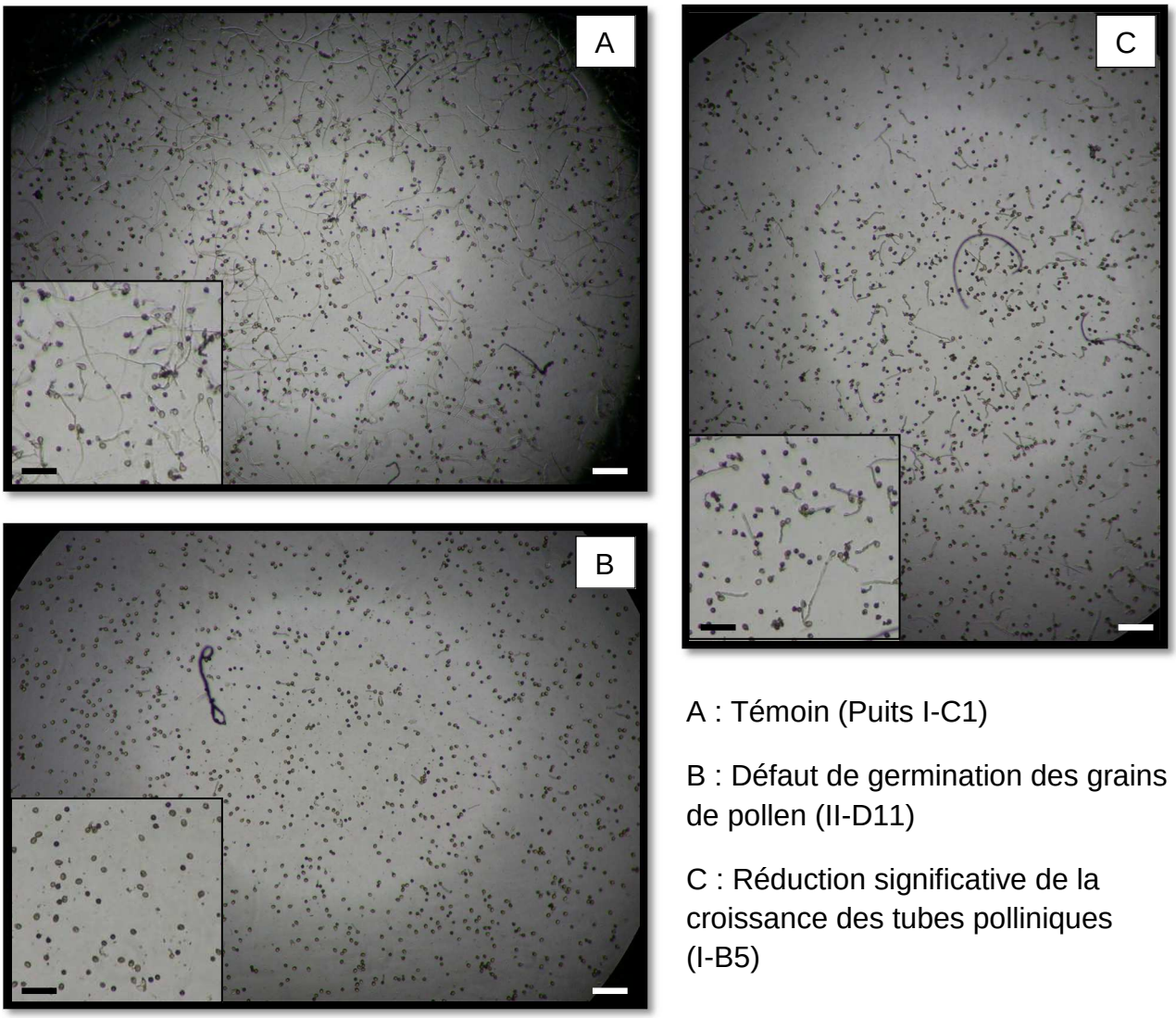


Figure 36 : Phénotypes mis en évidence lors du criblage primaire.

Barres d'échelle : 140 µm (noire) ; 220 µm (blanche)

Certains composés induisent d'autres phénotypes intéressants. Parmi ceux-ci, certains semblent accélérer la croissance des tubes polliniques car leurs longueurs sont supérieures à celles observées dans la condition témoin. D'autres composés induisent des phénotypes sévères avec des tubes polliniques gonflés et difformes, présentant de nombreuses dichotomies dans la zone apicale (Figure 37). Ces composés semblent interférer dans la machinerie impliquée dans la croissance polarisée des tubes polliniques. Ces phénotypes sont très similaires à ceux observés dans l'étude de certains mutants (Cheung et Wu, 2004 ; Bou Daher, 2011).

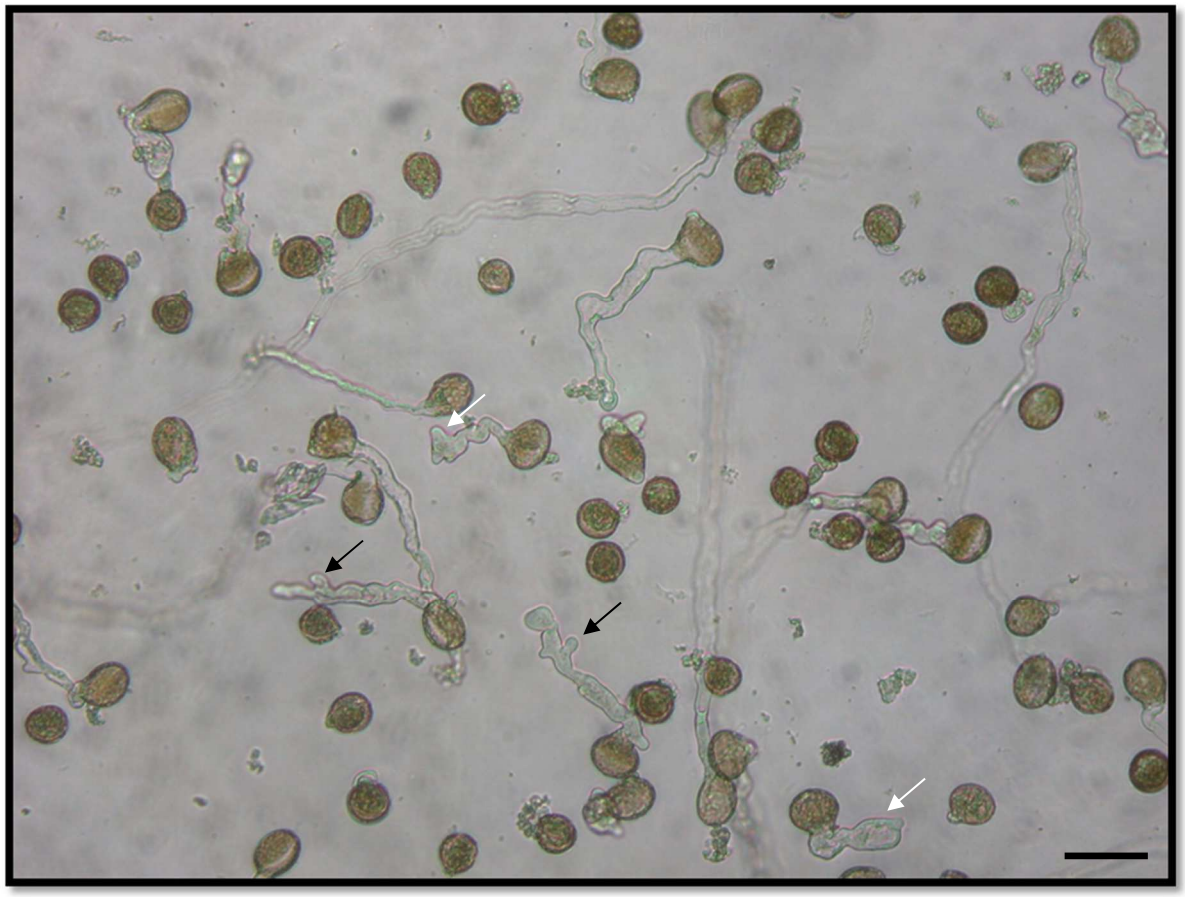


Figure 37 : Phénotypes induits après 6h de culture en présence de la molécule II-G2.

Barre d'échelle : 20 µm

Flèches noire : dichotomies ; Flèches blanches : zone apicale gonflée.

Après rinçage des puits et élimination des tubes polliniques n'ayant pas adhéré, la majorité des tubes polliniques en contact avec la matrice reste adhérés. Des dénombrements de tubes polliniques adhérés ont été réalisés afin de quantifier plus précisément les molécules ayant un impact sur l'adhésion. Cinq molécules semblent moduler les rendements d'adhésion par rapport au témoin. Parmi ceux-ci, trois produits (I-C7 ; I-F12 ; III-E6) semblent induire une augmentation du nombre de tubes polliniques adhérant à la matrice, les deux autres (I-G2 ; III-D7) semblent avoir un effet inverse et réduisent l'adhésion des tubes polliniques (Figure 38B) comparé au témoin (Figure 38A).

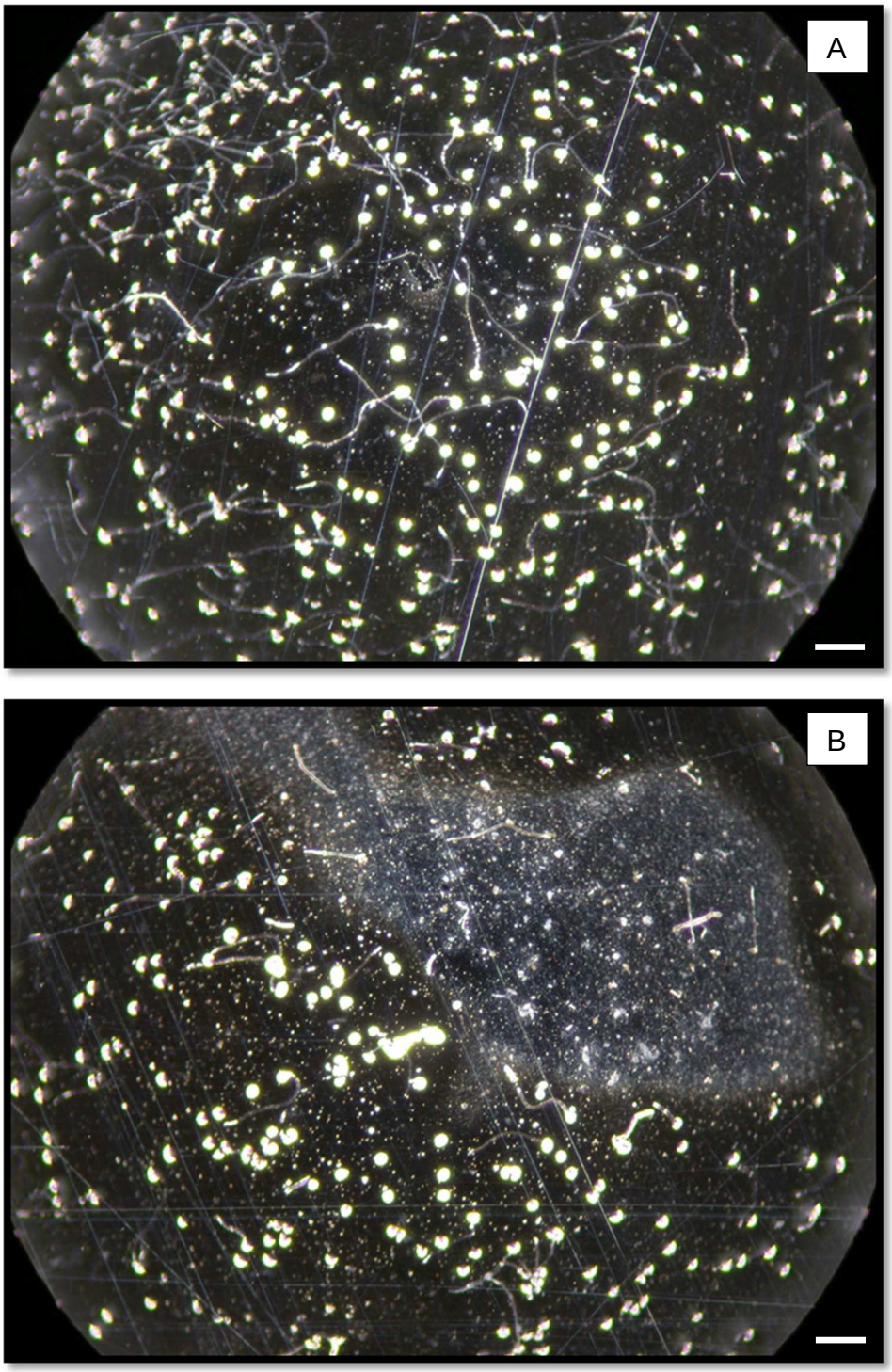


Figure 38 : Impact du composé I-G2 sur l'adhésion des tubes polliniques.

A : Témoin (Puits I-E1). B : Réduction de l'adhésion des tubes polliniques suite au traitement avec la molécule I-G2.

Barre d'échelle : 230 µm

2.4.2. Criblage secondaire : cibler les « *hits* » et effet dose-réponse

Le nombre de *hit* étant important et la nécessité de disposer d'une quantité importante de matrice pour tester à nouveau l'ensemble de la chimiothèque ou les 60 molécules mises en évidence lors du criblage primaire, nous a amené à cibler notre criblage secondaire sur un nombre limité de molécules bioactives. En effet, lors du criblage secondaire, un effet dose-réponse a été réalisé pour chacune des molécules aux concentrations de 1 – 2,5 – 5 – 10 – 15 et 20 µM. Pour sélectionner les molécules d'intérêts, nous avons pratiqué la méthode « *cherry peak* » qui consiste à prendre celles qui induisent les phénotypes les plus sévères. Nous avons donc sélectionné 18 molécules (Tableau 8).

Tableau 8 : Récapitulatif des 18 molécules sélectionnées pour le criblage secondaire

Effets des molécules	Numéro des molécules
Inhibent fortement la germination	I-B5 ; II-B9 ; II-H2 ; III-D6 ; III-H6
Altèrent la longueur des tubes	I-D5 ; II-D11 ; II-H3 ; III-A9 ; III-H7
Perturbent l'adhésion	I-C7 ; I-G2 ; I-F12 ; III-D7 ; III-E6
Provoquent des déformations	I-B9 ; I-E3 ; II-G2

Cinq molécules qui perturbent fortement la germination des grains de pollen (I-B5 ; II-B9 ; II-H2 ; III-D6 ; III-H6) et 5 molécules qui altèrent le plus la taille des tubes polliniques (I-D5 ; II-D11 ; II-H3 ; III-A9 ; III-H7). En effet, les phénotypes sévères obtenus par le traitement avec ces 10 molécules à 20 µM, nous ont empêchés de déterminer si elles pouvaient également perturber l'adhésion des tubes polliniques en raison de l'absence ou la faible longueur de ces tubes. Pour ces composés, il faut donc déterminer la concentration à laquelle les tubes sont phénotypiquement proches des tubes polliniques du contrôle et la tester sur l'adhésion. En plus de ces 10 molécules, les 5 molécules capables de moduler l'adhésion des tubes polliniques (I-C7 ; I-G2 ; I-F12 ; III-D7 ; III-E6) et les 3 molécules produisant des phénotypes anormaux (I-B9 ; I-E3 ; II-G2) ont aussi été sélectionnées.

2.4.2.1. Effet sur la germination des grains de pollen

Cinq concentrations différentes ont été testées de 1 à 20 µM (cette dernière concentration correspond à la concentration initialement testée lors du criblage primaire). Après culture des grains de pollen en présence de la molécule, ceux germés et non germés ont été dénombrés afin de déterminer le taux de germination (Figure 39).

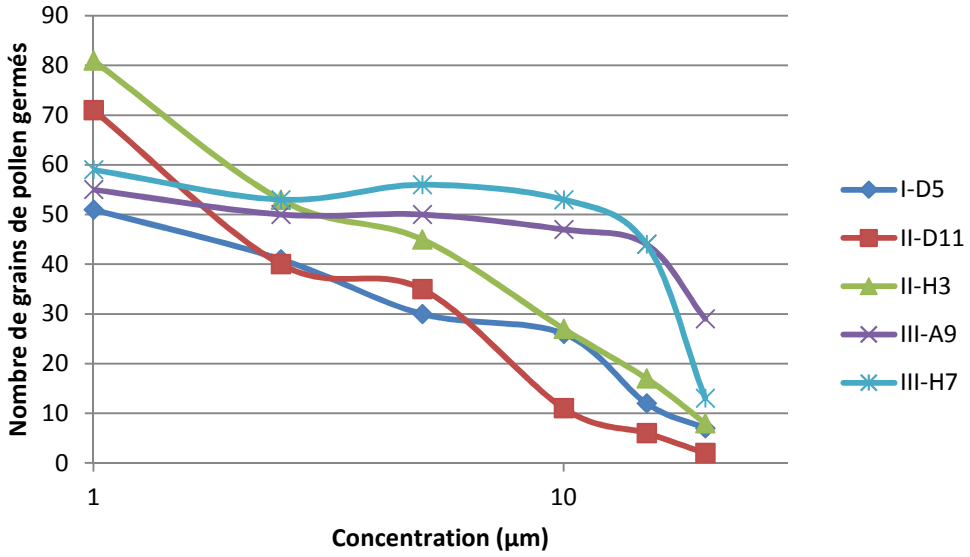


Figure 39 : Effet de la concentration des molécules sur la germination des grains de pollen.

D'après la figure 39, il apparaît une corrélation évidente entre la concentration de la molécule et son effet sur le taux de germination. Les cinq molécules testées lors de ce criblage secondaire affectent toutes la germination des grains de pollen. A des concentrations faibles (1 – 2,5 µM), les molécules n'ont peu ou pas d'effet sur la germination des grains de pollen. La molécule la plus inhibitrice est II-D11 puisque le taux de germination n'atteint que 10% avec un traitement à 15 µM et 3 % seulement à 20 µM. Les molécules I-D5 et II-H3 induisent une réponse quasi-identique aboutissant, respectivement, à une réduction du taux de germination de 87 % et 90 % entre les traitements à 1 µM et 20 µM. Pour III-A9 et III-H7, les effets sont moins nets sauf pour la concentration la plus élevée où une réduction du taux de germination est effective. En se référant à ces courbes, les concentrations des molécules permettant d'obtenir 80% de germination ont été déterminées. Ainsi, les concentrations retenues sont de 2,5 µM pour I-D5, III-A9 et III-H7 et 2 µM pour II-D11 et II-H3.

A ces concentrations, les molécules ont été testées à nouveau pour déterminer si elles influencent l'adhésion des tubes polliniques. Il en résulte que ces cinq molécules n'ont aucun effet significatif sur l'adhésion des tubes.

2.4.2.2. Molécules perturbant la croissance des tubes polliniques

Un effet dose-réponse de cinq molécules sur la croissance des tubes polliniques (Figure 40) révèle, pour certaines d'entre elles, une diminution progressive et importante de la longueur des tubes.

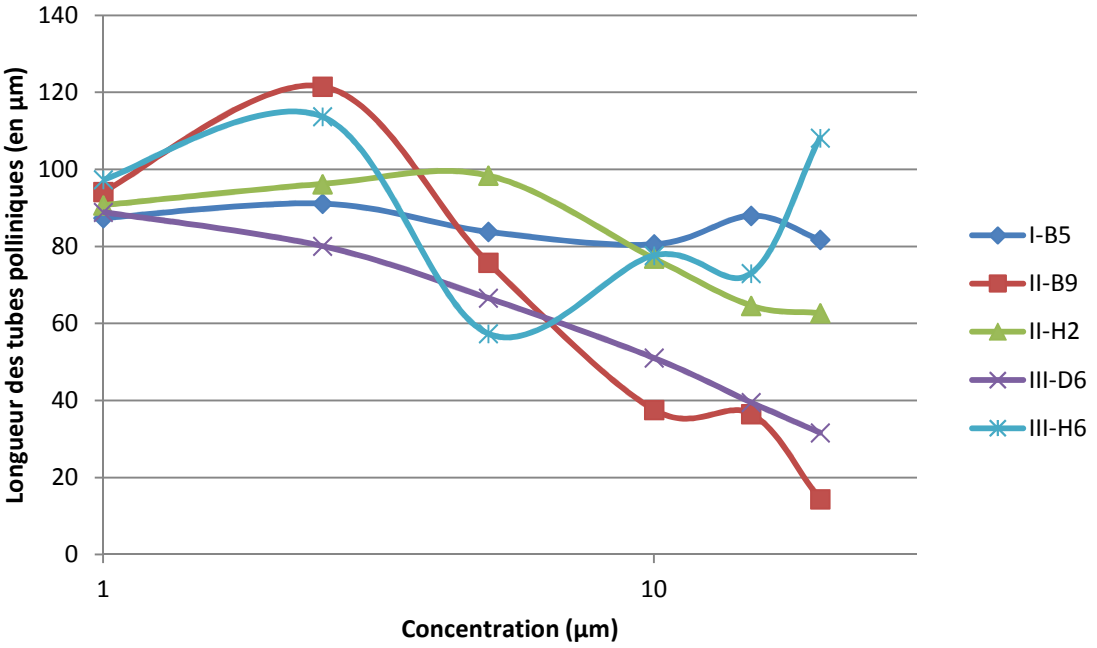


Figure 40 : Influence de la concentration des molécules sur la longueur des tubes polliniques.

Contrairement au criblage primaire, toutes les molécules ne semblent pas affecter l'élongation des tubes. La molécule II-B9 influence le plus la croissance des tubes polliniques. A la concentration la plus élevée (20 µM), et comparativement au témoin, les tubes polliniques sont en moyenne 8 fois plus petits. La courbe obtenue avec un traitement avec la molécule III-D6 présente une diminution régulière de la longueur des tubes polliniques au fur et à mesure que la concentration augmente. La molécule II-H2 affecte la longueur des tubes à partir de la concentration de 5 µM. Le traitement avec I-B5 perturbe peu la croissance des tubes polliniques. Enfin, pour la molécule III-H6, le profil de la courbe est surprenant mais semble indiquer peu ou pas d'effet. Ces deux

derniers composés ne semblent pas perturber la longueur des tubes comme il avait été observé lors du criblage primaire.

Toujours dans le but de tester ces molécules sur l'adhésion, des concentrations ont été déterminées afin d'avoisiner les 80 % de la longueur des tubes polliniques par rapport au témoin. Au final, des concentrations de 1 – 5 – 1 et 3 µM ont été respectivement utilisées pour les molécules II-B9, II-H2, III-D6 et III-H6. Du fait de la stabilité de la longueur des tubes en présence de la molécule I-B5, aucune valeur n'a été déterminée pour refaire l'expérience d'adhésion. Un nouveau criblage de ces molécules sur l'adhésion des tubes polliniques n'a pas révélé de phénotypes.

2.4.2.3. Hits influençant le phénotype des tubes polliniques

Pour les trois composés identifiés comme influant le phénotype des tubes polliniques, différentes concentrations ont été testées afin de valider les observations mises en évidence lors du criblage primaire.

La molécule I-B9, initialement sélectionnée pour sa capacité à favoriser la croissance des tubes polliniques, n'a pas reproduit le phénotype à toutes les concentrations testées. Pour les deux autres molécules (I-E3 et II-G2), les phénotypes observés au cours du criblage primaire sont confirmés. En effet, avec I-E3, on observe à nouveau des tubes dont les apex sont anormalement gonflés sans toutefois induire une rupture pariétale des tubes polliniques (Figure 41). Cette morphologie est dépendante de la concentration de la molécule puisque le phénotype n'est pas induit aux concentrations de 1 à 10 µM. Seules les concentrations de 15 et 20 µM provoquent le gonflement des tubes polliniques.

De même, le phénotype de tubes difformes obtenu en présence de la molécule II-G2 (Figure 37) est à nouveau observé pour des concentrations comprises entre 10 et 20 µM. A 10 µM, les tubes polliniques commencent à présenter quelques dichotomies. Les phénotypes les plus sévères sont obtenus à une concentration de 15 et 20 µM. Pour des concentrations inférieures à 5 µM, un phénotype normal est observé.

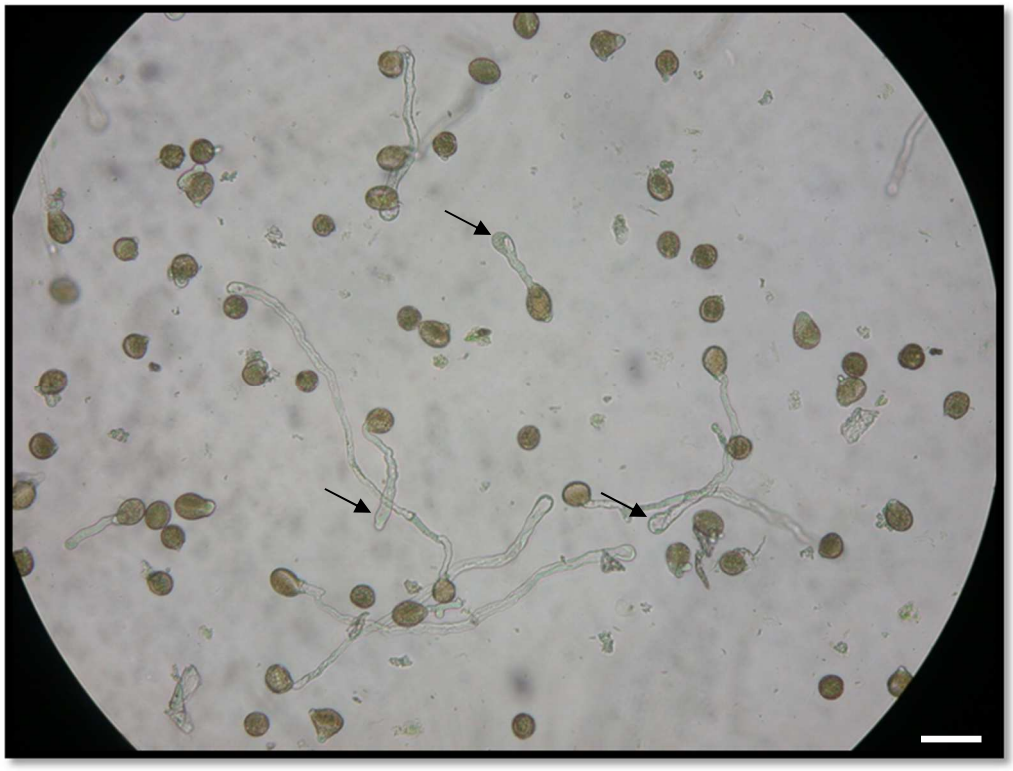


Figure 41 : Effet de la molécule I-E3 à 20 µM sur la morphologie des tubes polliniques.

Les flèches pointent vers les extrémités gonflées des tubes où la zone apicale reste stable et ne cède pas.

Barre d'échelle : 20 µm

2.4.2.4. Effet des molécules sur l'adhésion des tubes polliniques

Les cinq molécules initialement isolées pour leurs possibles implications dans l'adhésion des tubes polliniques ont été testées à des concentrations comprises entre 0 et 20 µM (Figure 42). Globalement, il apparaît un réel effet dose-réponse plus ou moins fort selon les molécules testées.

Dans l'ensemble, les courbes montrent une décroissance en deux temps. Toutefois, la molécule I-G2 qui avait induit le phénotype le plus flagrant lors du criblage primaire présente une linéarité dans sa courbe de tendance. Le taux d'adhésion des tubes polliniques traités n'excède pas 0,5 dès son utilisation à 1 µM. Ainsi, la molécule I-G2 possède à nouveau un effet significatif sur l'adhésion. Des concentrations encore inférieures devront être testées. De la même manière, la molécule I-C7 possède un rapport toujours inférieur à 0,5 signifiant que même son utilisation à de faibles concentrations diminue l'adhésion de plus de 50 %. La molécule I-F12 agit

incontestablement sur l'adhésion. Mais à la concentration la plus élevée, le rapport est toujours de 0,5, ce qui équivaut à 50% des tubes polliniques restés adhérés à la matrice.

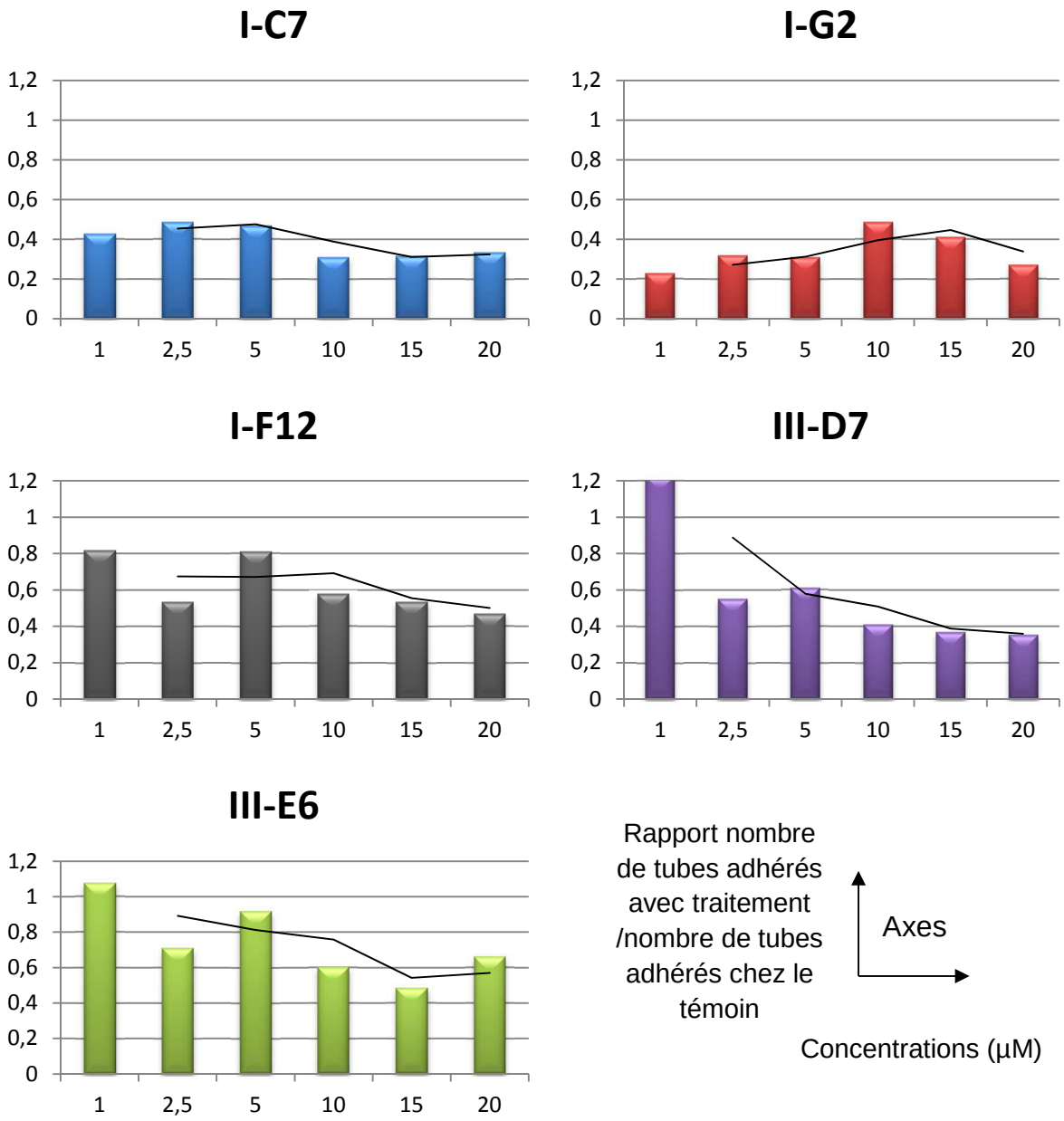


Figure 42 : Effet dose-réponse des molécules sur l'adhésion des tubes polliniques.

Les courbes représentent les tendances moyennes sur deux périodes.

Le même constat est effectué pour la molécule III-E6. Ces deux dernières molécules ne sont donc vraisemblablement pas les plus efficaces. Avec la molécule III-D7, la perte de l'adhésion est observée dès l'application de 2,5 µM. A 20 µM, 66% des tubes polliniques ne sont plus adhérés à la matrice.

Suite au criblage primaire, trois molécules augmentaient le rendement d'adhésion et deux le diminuaient. Lors du criblage secondaire, plus précis car testé à différentes concentrations, l'ensemble des molécules induit une perte d'adhésion des tubes polliniques. Cependant, ces cinq molécules n'influencent pas l'adhésion de la même manière. Deux molécules (I-C7 et I-G2) sont efficaces à partir de 1 µM, III-D7 à partir de 2,5 µM. Les deux autres (I-F12 et III-E6) ne permettent pas de réduire de 50% le taux d'adhésion des tubes polliniques.

Finalement, nous avons cherché à savoir si nos 5 molécules (Figure 43) possédaient des similitudes avec d'autres molécules préexistantes.

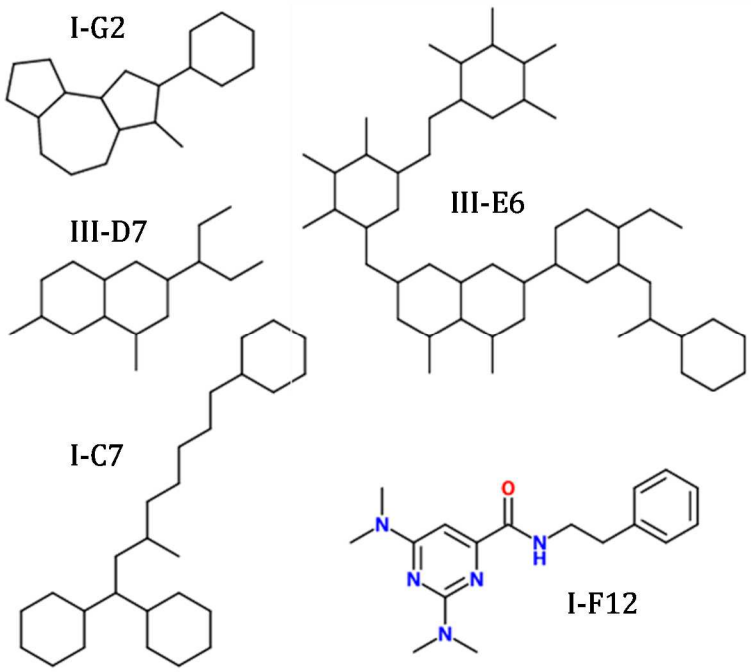


Figure 43 : Structures des molécules perturbant l'adhésion.

Les molécules I-G2, I-C7, III-D7 et III-E6 étant soumises à des règles de confidentialité, seuls leurs squelettes y sont représentés.

Réalisées sur le site **http://www.emolecules.com**

Un blast effectué sur le site de pubchem (**http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/**) révèle qu'aucune molécule connue ne s'approche de la structure de nos molécules. Cependant, quelques molécules ayant une identité supérieure à 95% sont identifiées et appartiennent à des chimiothèques commerciales.

Discussion

1. Parois et reproduction sexuée

1.1. Le tube pollinique

➲ Complément de discussion de l'article 1

La caractérisation biochimique et microscopique indique que la paroi des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana* présente de nombreuses similitudes avec la paroi primaire des cellules végétatives, mis à part la présence de callose. Ainsi, les tubes polliniques sont de très bons modèles pour étudier la biosynthèse, la mise en place de la paroi et aussi déterminer les fonctions des polysaccharides pariétaux (Malho, 2006 ; Geitmann, 2010). Nos résultats montrent que l'arabinose est un monosaccharide majoritaire. Dans l'article 1, nous émettions l'hypothèse que les protéines RGP1 et 2 (REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDES 1 & 2) seraient impliquées dans la biosynthèse des arabinanes (Dardelle *et al.*, 2010). De récents travaux montrent que ces deux protéines sont des mutases permettant de convertir l'arabino*pyranose* en arabino*furanose,* monosaccharide constituant les arabinanes des RG-I et AGP. D'ailleurs, la mutation de ces gènes induit une diminution des quantités d'arabinose associé au RG-I. Au final, cette interconversion semble extrêmement importante puisque les plantes mutantes présentent un phénotype nain ainsi que de sévères retards de développement (Rautengarten *et al.*, 2011). De plus, des recherches *via* les bases de données transcriptomiques, sur le site http://bar.utoronto.ca, présentant les niveaux d'expression de transcrits à l'échelle tissulaires et cellulaires, montrent que ces RGP sont fortement exprimés lors de la maturation du grain de pollen. Cette expression perdure à plus faible intensité lors du développement du tube pollinique (Honys et Twell, 2004 ; Qin *et al.*, 2009). Ainsi, le pollen du double mutant *rgp1rgp2* n'est pas viable (Drakakaki *et al.*, 2006). Ces données sur les RGP confortent notre point de vue sur l'implication de ces protéines dans la voie de biosynthèse des chaines arabinanes du RG-I.

Cet article présente également, pour la première fois, une étude fine des XyG des tubes polliniques d'Arabidopsis. Nos résultats montrent une différence de structure nette et réelle entre les XyG des organes végétatifs et les XyG des tubes polliniques dont

les proportions de chaines latérales fucosylées et *O*-acétylées sont élevées. Ces deux caractéristiques pourraient, entre autre, permettre d'établir des connections avec les tissus femelles. Afin de déterminer si la fucosylation et l'*O*-acétylation des XyG sont importantes dans le développement des tubes polliniques, l'article 3 a été consacré au XyG des tubes polliniques chez le tabac et la tomate dont les organes végétatifs ne présentent pas des fuco-galacto-XyG mais des arabino-XyG.

➲ Complément de discussion de l'article 3

L'étude comparative de la paroi des tubes polliniques et des organes végétatifs de Solanaceae nous a permis d'établir une réelle différence dans la composition des XyG (Dardelle *et al.*, soumis). Ces résultats semblent converger vers l'hypothèse émise par Pauly *et al.* (2001) qui indiquaient que le métabolisme et/ou la biosynthèse du XyG est spécifique de chaque tissu. Nos résultats suggèrent que le pollen possède différentes familles de gènes codant des transférases impliquées dans l'ajout de résidus galactosyles et fucosyles. La présence de chaines galactofucosylées pose la question de la fonction d'une telle structure dans les tubes polliniques. Il a été suggéré dans un premier temps, suite à des modélisations, que le fucose faciliterait l'interaction du XyG avec la cellulose (Levy *et al.*, 1991). Néanmoins, des analyses de mutants déficients en XyG fucosylé montrent que l'absence du fucose n'affecte pas le développement de la plante, ni les propriétés mécaniques de la paroi. Ainsi, le fucose ne serait pas impliqué dans la consolidation de la structure pariétale (Vanzin *et al.*, 2002 ; Peña *et al.*, 2004 ; Cavalier *et al.*, 2008). Récemment, il a été montré chez deux variétés de vignes, l'une résistante et l'autre sensible à la maladie de Pierce, qu'elles possédent des XyG de structure différente (Sun *et al.*, 2011). La plante sensible possède un XyG fucosylé, contrairement à la plante résistante qui n'en contient pas. Ces données argumentent en faveur d'un rôle du XyG fucosylé dans des mécanismes de signalisation et/ou de reconnaissance. Ainsi la présence du XyG fucosylé dans les tubes polliniques pourrait permettre une reconnaissance par le tissu de transmission. Il n'est toutefois pas à exclure que les propriétés physico-chimiques conférées au XyG par ces chaines latérales pourraient permettre une intrusion plus efficace dans les tissus femelles.

L'*O*-acétylation est la seconde caractéristique des XyG des tubes polliniques. De récents travaux ont montré qu'une diminution des fonctions *O*-acétylées associées aux

HG confère une résistance accrue de la plante face au pathogène *Botrytis cinerea* qui serait due à une induction plus efficace des mécanismes de défense (Manabe *et al.*, 2011). Ainsi, l'*O*-acétylation de la paroi confère à la plante une certaine sensibilité vis-à-vis de certains pathogènes. Transposé aux tubes polliniques, nous émettons l'hypothèse que l'acétylation du XyG pourrait protéger l'intégrité du tube pollinique lors de sa croissance dans le tissu femelle partenaire. Finalement, l'*O*-acétylation et la fucosylation du XyG sont extrêmement liées, puisque l'ajout du résidu fucosyle sur le XyG serait facilité par la présence du groupement acétyle sur le galactose (Perrin *et al.*, 2003).

1.2. Le tissu de transmission

➲ Complément de discussion de l'article 2

Nos analyses par immunomarquages démontrent que le tissu de transmission se compose d'une paroi riche en XGA avant la pénétration des tubes polliniques. Ces données sont observables par immunofluorescence où le marquage est très intense pour les épitopes XGA, épitopes habituellement retrouvés dans les tissus dont l'adhésion cellulaire est diminuée (Willats *et al.*, 2004). La présence de tels épitopes suggère qu'il existe une modification des propriétés cohésives de la paroi des tissus de transmission, et ce, très probablement dans le but de faciliter la progression des tubes polliniques. Chez le maïs, ce relâchement serait accru au cours de la progression du gamétophyte mâle par l'action d'une β-expansine spécifique du pollen. L'application de la protéine purifiée a permis de solubiliser la paroi du stigmate et du style enrichie en glucuronoarabinoxylanes associés à des acides féruliques, ainsi qu'en HG (Tabuchi *et al.*, 2011). Ainsi, en fragilisant la lamelle moyenne, cette protéine permettrait au tube pollinique de progresser aisément à travers le tissu de transmission (Tabuchi *et al.*, 2011).

2. Adhésion des tubes polliniques et perturbation par une approche de génétique chimique

2.1. La matrice d'adhésion

Des matrices enrichies en polysaccharides pectiques permettent l'adhésion

L'un des objectifs des travaux de thèse était de déterminer les mécanismes impliqués dans l'adhésion des tubes polliniques. Pour cela, une approche de génétique chimique a été entreprise. Ce test nécessite l'élaboration et la reconstitution d'une matrice, « mimant » le tissu de transmission, sur laquelle les tubes polliniques peuvent adhérer. La caractérisation de ce tissu de transmission est donc d'un intérêt capital et nous a permis de mettre en évidence *via* les immunomarquages, la présence de chaines arabinanes. En se basant sur les travaux réalisés sur les tubes polliniques du lys (Mollet *et al.*, 2000), une première matrice a été élaborée en utilisant des pectines de fleurs extraites par l'imidazole. Cette matrice a permis d'induire l'adhésion de 40% des tubes polliniques. Néanmoins, la quantité de matériel nécessaire au criblage de la chimiothèque requiert un grand nombre de fleurs. Puisque les pectines permettent l'adhésion et que ces polymères sont ubiquistes de la plante, nous nous sommes orientés vers l'extraction de pectines provenant de feuilles d'Arabidopsis. Ainsi, les fractions pectiques extraites à l'imidazole, nous ont permis d'obtenir un taux d'adhésion de 33%, soit environ 7 % de différence. Ces résultats suggèrent que les pectines de feuilles peuvent substituer les pectines extraites de fleurs.

Les matrices adhésives sont riches en pectines HG et RG-I

Afin de déterminer plus précisément la nature des polymères pectiques impliqués dans l'adhésion des tubes, les extraits pectiques ont été analysées. Selon le produit utilisé pour l'extraction des pectines, deux populations distinctes sont détectées, le RG-I et les HG.

La chaine principale du RG-I est composée de rhamnose et d'acide galacturonique en concentration équimolaire. Plus le rapport entre ces deux monosaccharides tend vers 1, moins les résidus galacturonosyles seront impliqués dans la composition des autres

polymères pectiques (HG, XGA, RG-II). L'extraction par l'imidazole permet de solubiliser les pectines HG, RG-I et RG-II (Mort *et al.*, 1991 ; Ishii et Matsunaga, 2001). L'analyse des extraits imidazole montre un rapport Rha/GalA proche de 1. Ces résultats suggèrent la prédominance du RG-I par rapport aux HG. De plus, les proportions importantes en arabinose et galactose par rapport au rhamnose et à l'acide galacturonique indiquent que ces RG-I sont composés de courtes chaines principales mais avec de longues chaines latérales. Il est d'ailleurs observé sur les *dot blot*, un marquage significatif de la matrice pectique provenant de fleurs par l'anticorps LM13, spécifique des longues chaines arabinanes (Moller *et al.*, 2008). L'absence de marquage par le LM13 de la matrice pectique issue de feuilles pourrait indiquer que les chaines arabinanes du RG-I sont probablement plus courtes. Cette hypothèse pourrait être confirmée en utilisant l'anticorps LM6, spécifique des chaines courtes d'arabinanes (Willats *et al.*, 1998). Cette différence de degré de polymérisation des arabinanes expliquerait l'origine des différences d'adhésion observées.

La matrice obtenue par une extraction à l'oxalate d'ammonium possède une composition monosaccharidique différente. Cette caractéristique se traduit par une perte de l'adhésion de près de 60% des tubes comparativement à la fraction imidazole. En regardant plus précisément les différences dans la composition monosaccharidique, cette fraction possède un rapport Rha/GalA de 0,3 suggérant une faible teneur en RG-I. De plus, les quantités importantes en GalA, et moindres en arabinose et galactose, suggèrent que cette fraction est davantage enrichie en HG qu'en RG-I, expliquant peut-être le faible taux d'adhésion. A l'aide des deux anticorps JIM5 et JIM7, spécifiquement et respectivement dirigés contre les épitopes faiblement et fortement méthylestérifiés (Clausen *et al.*, 2003), les *dot blot* indiquent la présence des deux populations. Toutefois, il semble que les fractions extraites à l'imidazole soient plus riches en HG fortement méthylestérifiés que celle extraite à l'oxalate, et inversement pour les HG faiblement méthylestérifiés. Chez le lys, la fraction pectique purifiée et adhésive était composée majoritairement d'HG faiblement méthylestérifiés (Mollet *et al.*, 2000), cette différence observée avec la matrice d'Arabidopsis pourrait provenir de la nature du style, creux chez le lys et plein chez Arabidopsis. Pour le confirmer, le fractionnement et la caractérisation de la fraction pectique adhésive d'Arabidopsis sont nécessaires.

La présence du glucose en proportion importante dans les matrices issues de feuilles fait que celles-ci sont moins riches en pectines. Cela expliquerait que ces matrices n'induisent pas une adhésion aussi forte en comparaison avec les matrices issues de fleurs. Des traitements par des amylases pourraient éventuellement améliorer ce rendement.

Implication des motifs pectiques dans l'adhésion des tubes polliniques

Le croisement des données obtenues entre les taux d'adhésion et les compositions en polysaccharides des matrices suggère une implication probable des chaines latérales du RG-I dans l'adhésion des tubes polliniques. Une telle hypothèse semble probable lorsque l'on sait que de nombreux mutants affectés dans l'adhésion et/ou le relâchement pariétal présentent une réduction des teneurs en résidus arabinosyles ou galactosyles (Peña et Carpita, 2004 ; Leboeuf *et al.*, 2004 ; Devaux *et al.*, 2005).

La façon dont ces chaines latérales sont impliquées dans l'adhésion reste encore inconnue. Néanmoins, il a été montré que les arabinanes du RG-I avaient la capacité de se lier entre elles de façon covalente *via* des groupements d'acide férulique (Fry, 1982). Ainsi, ces liaisons transversales permettraient de renforcer l'adhésion intercellulaire (Waldron et Brett, 2007 ; Popper et Fry, 2008). Or, comme démontré dans les articles 1 et 2, les parois des tubes polliniques ainsi que des tissus femelles sont riches en arabinanes. La digestion de notre matrice avec des enzymes comme les arabinanases et/ou galactanases pourrait nous indiquer plus précisément quels motifs pectiques sont importants dans l'adhésion.

Les HG seraient également impliqués dans l'adhésion intercellulaire grâce à la lamelle moyenne *via* la formation de ponts calciques entre des chaines d'acides homogalacturoniques (Jarvis *et al.*, 2003). Pour permettre ce mécanisme, le polymère doit préalablement subir l'action de PME afin d'éliminer les groupements méthylesters (Micheli *et al.*, 2001). Il ne serait donc pas surprenant d'observer dans nos matrices adhésives des HG faiblement méthylestérifiés. Cependant, cette famille pectique est principalement retrouvée dans la fraction extraite à l'oxalate d'ammonium qui présente un faible taux d'adhésion. Le traitement avec l'enzyme *endo*-polygalacturonase indique

que les HG sont primordiaux pour l'adhésion des tubes polliniques. Cette enzyme a la particularité de cliver spécifiquement les HG à condition que ceux-ci soient déméthylés. Un tel traitement de la matrice engendre une perte quasi-complète de l'adhésion des tubes polliniques. Ces résultats montrent que les HG contribuent directement ou indirectement à l'adhésion des tubes polliniques sur la matrice, en établissant la conformation des pectines. Comme les différents motifs pectiques sont liés de manière covalente (Vincken *et al.*, 2003), il n'est pas surprenant que la déstructuration d'un des motifs pectiques puisse altérer l'organisation complète de ces polymères et perturber l'adhésion.

Enfin, il n'est pas à exclure que d'autres composés soient susceptibles de participer à cette adhésion, à commencer par d'autres familles pectiques comme le RG-II qui n'a pas été étudié lors de ce projet, en raison de sa faible abondance. Ce polymère complexe, ubiquiste, et de structure très conservée parmi les espèces joue un rôle majeur dans le développement des plantes (O'Neill *et al.*, 1996 ; Voxeur *et al.*, 2011). Deux groupements RG-II sont capables de se lier entre eux pour former un dimère via le bore (O'Neill *et al.*, 1996). La réduction de cette forme dimérisée peut entraîner, à l'image du mutant *nolac-H18* affecté dans une glucuronosyle transférase, un détachement cellulaire (Iwai *et al.*, 2002). Ainsi, dans les proportions aussi faibles qu'il soit, le RG-II pourrait être un élément indispensable pour l'adhésion des tubes polliniques. Néanmoins, la capacité de dimérisation des RG-II du tube pollinique avec les RG-II de la matrice (*in vitro*) ou du tissu de transmission (*in vivo*) reste à démontrer.

Autres partenaires ?

Chez le lys, outre la présence de polymères pectiques, l'adhésion des tubes polliniques nécessite la protéine SCA (STYLAR CYSTEINE-RICH ADHESIN), appartenant à la famille LTP (Park *et al.*, 2000 ; Lord *et al.*, 2000). Cette protéine, présente dans le style, n'est pas produite par le pollen (Park *et al.*, 2000 ; Park et Lord, 2003 ; Huang *et al.*, 2011). Il semble que chez *Arabidopsis thaliana*, les pectines soient à elles seules suffisantes pour générer l'adhésion des tubes polliniques. Toutefois, afin de s'assurer qu'aucune protéine coextraite avec la fraction pectique ne facilite cette adhésion, il serait judicieux de traiter au préalable les matrices avec des protéases. D'ailleurs, plusieurs LTP sont présentes dans les différents tissus femelles traversés par les tubes polliniques chez Arabidopsis

(Tung *et al.*, 2005 ; Chae *et al.*, 2010). Néanmoins, certains travaux semblent indiquer qu'elles seraient davantage impliquées dans le relâchement pariétal des cellules du tissu de transmission (Nieuwland *et al.*, 2005 ; Chae *et al.*, 2010) et pourraient intervenir dans les mécanismes de défense contre des pathogènes (Maldonado *et al.*, 2002). A la différence du lys, qui ne synthétise pas la protéine SCA, le pollen d'Arabidopsis peut synthétiser la LTP5, et le mutant *ltp5* présente des tubes polliniques très courts et gonflés suggérant que cette protéine est impliquée dans le contrôle de la croissance polarisée et l'élongation cellulaire (Chae *et al.*, 2009). Finalement, il n'est pas à exclure que ces LTP synthétisées par le pollen puissent se substituer aux LTP des tissus femelles. Dans ce cas, cela impliquerait que ces LTP synthétisées par les tubes polliniques soient secrétées pour pouvoir interagir avec les pectines de la matrice.

2.2. Adhésion et génétique chimique

En utilisant une approche de génétique chimique, nous avons cherché à isoler des molécules affectant l'adhésion des tubes polliniques. Bien que nous ayons identifié plusieurs molécules perturbant l'adhésion, de nombreuses molécules altéraient la germination du pollen et la croissance des tubes polliniques. Cette abondance de phénotypes non recherchés est très probablement due à l'utilisation de notre chimiothèque essentielle, majoritairement composée de molécules bioactives.

2.2.1. Actions non attendues de molécules

Nous avons observé dans de nombreux puits que les grains de pollen n'avaient pas ou peu germés. Bien que nous n'ayons pas déterminé les processus biologiques impliqués dans ce phénotype, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses sur les causes de cette absence de germination. Tout d'abord, nous utilisons des molécules chimiques pouvant porter des groupements toxicophores. La plupart des toxicophores identifiés à ce jour dérivent des recherches sur les médicaments et sont reconnus comme étant hépato-, cardiotoxiques ou mutagènes (Hakimelahi et Khodarahmi, 2005). Bien évidemment, seules les structures mutagènes peuvent être transposées au domaine végétal. Ainsi les cycles nitro-aromatiques ou les amines aromatiques interagissent et modifient l'ADN (Kazius *et al.*, 2005). De même, la communauté scientifique s'accorde

pour dénoncer la toxicité universelle des aldéhydes (S. Rault, Communications personnelles). Dans la chimiothèque, on comptabilise 3 molécules porteuses de cycles nitro-aromatiques, 5 de groupements amines aromatiques et 4 de groupements aldéhydes. Il faut donc envisager que l'absence de germination pourrait être en partie due à des molécules mutagènes.

La perturbation de nombreux processus physiologiques peut également être responsable de l'inhibition de la germination. Ainsi, de nombreuses publications abordent des problèmes de germination dès lors que le pollen possède un gène muté. A titre d'exemple, le double mutant pollen *agp6agp11* présente un défaut de germination et de croissance *in vitro* et *in vivo* (Coimbra *et al.*, 2010). Malgré tout, certains grains de pollen germent dans les anthères suggérant un mauvais contrôle de l'imbibition du pollen. De même, un mutant déficient en facteur d'initiation 3 montre une réduction considérable du pourcentage de germination (Xia *et al.*, 2010). Ces facteurs sont primordiaux pour initier la biosynthèse protéique et agissent sur de nombreux ARNm. Si notre molécule chimique affecte les protéines impliquées dans la transcription, alors ce sont de nombreuses protéines qui ne seront pas synthétisées. Il devient alors très difficile de déterminer précisément la ou les molécules directement impliquées dans le phénotype obtenu.

De la même manière, les problèmes d'élongation des tubes polliniques peuvent être dus à de nombreux facteurs. Parmi les 47 molécules dénombrées, certaines provoquent peut-être un simple retard de croissance. Toutefois, de tels phénotypes ont été observés chez certains mutants. Par exemple chez la tomate, le mutant *Slprlaf* affecté dans le facteur rapide d'alcalinisation montre une réduction de la longueur des tubes polliniques (Covey *et al.*, 2010). Ce peptide possède la faculté d'augmenter rapidement le pH intracellulaire. Or, il existe une corrélation entre le pH des tubes polliniques et l'extension des tubes polliniques (Lovy-Wheeler *et al.*, 2006). La paroi confère une certaine rigidité aux tubes polliniques et est biosynthétisée au rythme de la croissance cellulaire (Zonia et Munnik, 2009). On comprend donc aisément qu'une mauvaise mise en place de la matrice extracellulaire perturbe l'élongation des tubes. Ainsi, la mutation dans le gène codant une xylosyltransférase impliquée dans la biosynthèse du RG-II a pour conséquence de diminuer la longueur des tubes polliniques (Liu *et al.*, 2011). Le même phénotype est constaté chez le mutant *vanguard* dont le gène code une PME

affectant les HG (Jiang *et al.*, 2005). Ainsi, des protéines impliquées dans la biosynthèse et le remodelage de la paroi pourraient aussi être les cibles de certains produits. Au final, les possibilités et les modes d'actions de ces molécules sont multiples et leurs dissections seront un challenge à étudier.

Il n'aurait pas été surprenant d'identifier également des molécules améliorant les processus de germination et d'élongation. Ainsi, très récemment, une molécule provenant du pistil d'*Arabidopsis thaliana* a été isolée, caractérisée et identifiée comme un stimulateur de la germination du pollen de plusieurs espèces (Qin *et al.*, 2011). Cette molécule est de faible poids moléculaire de la famille des Azadecalines sulfinylées et s'apparente à certaines structures de notre chimiothèque.

Il a été établi à la suite d'un criblage primaire et secondaire que deux molécules perturbaient le morphotype des tubes polliniques. Ceux-ci sont difformes, non cylindriques et présentent un gonflement dans leurs zones apicales. La perturbation des AGP avec le Yariv phenylglucoside induit l'arrêt d'élongation des tubes polliniques. Après élimination du Yariv phenylglucoside, la croissance du tube pollinique reprend en formant une nouvelle zone apicale par dichotomie suggérant l'implication de ces protéoglycanes dans la polarité des tubes (Mollet *et al.*, 2002). Or de nombreuses dichotomies sont observées lorsque les tubes sont au contact de l'une des molécules. Les phénotypes obtenus pourraient donc provenir de la perturbation de la sécrétion des nouveaux polymères pariétaux. De même, certains produits induisent une déformation des tubes, lesquels n'ont plus une forme cylindrique. Des phénotypes semblables sont observés lorsque les tubes polliniques sont traités avec du sulfo-EGS (Ethylene glycol bis [sulfosuccinimidylsuccinate]) (Bou Daher, 2011) connu pour se fixer aux filaments d'actine (Lovy-Wheeler *et al.*, 2005). Dans ce cas, le cytosquelette pourrait être perturbé. Les filaments d'actine sont importants pour la croissance des tubes polliniques car en les déstabilisant, la livraison des vésicules de sécrétion est modifiée entraînant une réorientation des tubes (Bou Daher et Geitmann, 2011). C'est donc toute la voie de transport vésiculaire qui, affectée, peut aboutir à l'obtention de tels phénotypes. De même, la surexpression d'une protéine de dépolymérisation de l'actine (ADF1) aboutit à un gonflement de la zone apicale des tubes polliniques (Cheung et Wu, 2004). Ainsi, nos composés chimiques pourraient perturber de nombreux processus biologiques, comme

la mise en place de la paroi ou le fonctionnement du cytosquelette, ce dernier pouvant agir sur la voie de sécrétion, intense chez le gamétophyte mâle (Zonia et Munnik, 2008).

2.2.2. Molécules impliquées dans l'adhésion des tubes polliniques

Au terme des criblages primaire et secondaire, 5 molécules sur les 258 modifient l'adhésion des tubes polliniques, soit 2% des molécules de la chimiothèque. Suite au criblage primaire, trois molécules favorisaient l'adhésion et deux la perturbaient. A l'issue du criblage secondaire, il est apparu que les 5 molécules réduisaient l'adhésion. Celles-ci ont des conformations très différentes suggérant que chaque molécule aurait son propre substrat. Trois molécules sur les cinq présentent une fluorescence naturelle qui pourra servir à localiser sa cible sans avoir à les modifier chimiquement.

Nous ne savons pas si ces molécules agissent directement ou indirectement sur l'adhésion. En effet, les molécules pourraient interagir en tant qu'antagoniste sur une protéine ou un substrat directement impliqué dans le processus d'adhésion. Ainsi, nos molécules affectent peut-être des protéines de type transglutaminases. Ces protéines ont été impliquées chez la pomme comme actrices potentielles de l'adhésion *in vivo*, connectant les polyamines des tubes polliniques avec celles du tissu de transmission (Di Sandro *et al.*, 2010). A l'inverse, la molécule pourrait très bien agir en amont du processus d'adhésion et perturber une voie de biosynthèse, de signalisation ou des transporteurs dont les conséquences induisent une perte d'adhésion.

Enfin, il n'est pas à exclure que les molécules aient pour substrat des composés qui ne soient pas de type protéique. Les molécules pourraient très bien interagir avec des composés phénoliques ou des polysaccharides, à l'image de ces marqueurs cytochimiques comme le bleu d'aniline, l'orangé d'acridine ou l'iodure de propidium (Bradley et Wolf, 1959 ; Smith et McCully, 1978 ; Rounds *et al.*, 2011). D'ailleurs, cette dernière molécule, fluorescente, est habituellement utilisée comme marqueur de viabilité, venant s'hybrider avec les acides nucléiques lorsque les cellules ont des membranes plasmiques lésées (Deitch *et al.*, 1982). Une étude récente a montré que l'iodure de propidium à faible dose pouvait aussi se fixer sur les HG partiellement déméthylés dans la zone apicale et en arrière de cette zone du tube pollinique de tabac et entrer en compétition avec le calcium (Rounds *et al.*, 2011). En utilisant cette propriété de fluorescence et cette interaction avec les HG, il a ainsi été possible de suivre la distribution des HG au cours de la croissance scalariforme des tubes polliniques.

Conclusions et perspectives

La matrice extracellulaire des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana* cultivés *in vitro* se compose d'une double paroi. Les différentes familles polysaccharidiques associées à la paroi primaire y sont présentes : les pectines, les hémicelluloses, les β-glucanes ainsi que des protéoglycanes de type AGP.

Nous avons, pour la première fois, caractérisé le XyG de la paroi des tubes polliniques. Ce polymère est i) fortement *O*-acétylé et ii) riche en chaines galactofucosylées. Ces XyG sont retrouvés au sein des différentes familles de plantes, y compris parmi celles dont les organes végétatifs sont dépourvus de ces chaines latérales. Cette conservation structurale à travers l'évolution suggère l'importance de ces groupements au cours de la reproduction sexuée. Les tubes polliniques semblent donc des cellules originales pour étudier le rôle de ces chaines galactofucosylées. L'utilisation de mutants dépourvus en XyG ou en chaines latérales (*xxt1/2*, *mur2* et *mur3*) pourrait nous permettre de déterminer si ces groupements sont indispensables à la croissance des tubes polliniques. Le rôle de l'*O*-acétylation des XyG est tout aussi mystérieux. Nous émettons l'hypothèse que les XyG fortement fucosylés et *O*-acétylés pourraient participer à la signalisation ainsi qu'à l'intégration des tubes polliniques dans le tissu de transmission sans déclencher les mécanismes de défense. Pour la vérifier, nous pourrions établir des comparaisons avec la paroi de champignons pathogènes porteurs de groupement acétyles (Janbon *et al.*, 2001). *Monilinia vaccinii-corymbosi* servirait alors de modèle puisque ses hyphes « miment » à la perfection les tubes polliniques pour s'introduire à travers le tissu de transmission sans y être détectés (Ngugi et Scherm, 2004 ; Govers et Angenent, 2010).

Les parois de tubes polliniques sont extrêmement riches en chaines arabinanes du RG-I. La fonction précise de ces chaines latérales reste hypothétique. Deux chaines arabinanes peuvent s'associer entre elles par l'intermédiaire de composés phénolique de type acide férulique (Fry, 1982). De telles liaisons pourraient être établies afin de permettre la rigidification de la paroi et/ou de permettre une cohésion avec le tissu de transmission. Nous pourrions vérifier cette hypothèse en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre des épitopes d'acide férulique. Cette hypothèse de liaisons transversales entre les chaines arabinanes est confortée par les observations réalisées

sur le tissu de transmission qui semble être également riche en chaines arabinanes. Ce constat est basé sur l'intense fluorescence observée lors du marquage des épitopes arabinanes du RG-I. Toutefois, la méthode utilisée ici ne permet pas de quantifier ces arabinanes. L'accumulation de données biochimiques concernant la nature de la paroi des cellules du seul tissu de transmission est donc nécessaire. Cette caractérisation nous renseignerait sur les probables interactions pouvant être mises en place pour l'adhésion des tubes polliniques.

Les matrices adhésives que nous avons préparées sont riches en pectines et sont responsables de l'adhésion des tubes polliniques. La purification des pectines issues uniquement du tissu de transmission permettrait probablement l'amélioration des rendements d'adhésion. La digestion de ces matrices pectiques par une *endo*-polygalacturonase provoque la perte d'adhésion des tubes polliniques. Un réseau pectique est donc nécessaire à l'adhésion cellulaire. La configuration et la structuration des pectines sont donc des aspects essentiels pour l'adhésion des tubes polliniques. Des traitements enzymatiques, pouvant éliminer les chaines latérales des RG-I, pourraient nous renseigner sur l'importance des arabinanes et/ou des galactanes dans ce processus.

Suite au criblage primaire et secondaire (effet dose-réponse), nous avons isolé par une approche de génétique chimique, cinq molécules capables d'induire une nette réduction du rendement d'adhésion des tubes polliniques, sans réduire la longueur des tubes polliniques. Ces résultats encourageants doivent être complétés afin de s'assurer de la véritable action de ces molécules. L'étape suivante consistera à localiser et identifier les substrats ciblés par les molécules. Pour cela des modifications chimiques des molécules seront à prévoir afin de greffer des fluorophores ou tout autre groupement permettant la purification. Finalement, l'amélioration des interactions entre ces molécules avec le substrat pourrait être réalisée par le criblage de molécules semblables aux « chefs de familles », disponibles à la chimiothèque nationale. Des essais sur les tubes polliniques d'autres espèces pourraient finalement permettre de déterminer la spécificité d'action de certains composés.

Les molécules ont un pouvoir d'action très large, ne se limitant pas aux seules protéines. La découverte sérendipique de molécules d'intérêt ouvre à de nouvelles perspectives de recherches fondamentales et appliquées.

Références bibliographiques

A

Acosta-García, G. Vielle-Calzada, J (2004) A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in Arabidopsis. Plant Cell 16:2614-2628.

Agee, A. Carter, D (2009) Whole-organism screening: plants. Methods Mol Biol 486:77-95.

Ahn, Y. Chang, Y (2007) Tagged small molecule library approach for facilitated chemical genetics. Acc Chem Res 40:1025-1033.

Alaimo, P.J., Shogren-Knaak, M.A Shokat, K.M (2001) Chemical genetic approaches for the elucidation of signaling pathways. Curr Opin Chem Biol 5:360-367.

Allen, A.M. Hiscock, S.J (2008) Evolution and Phylogeny of Self-incompatibility Systems in Angiosperms. Dans V.E. Franklin-Tong, ed, Self-Incompatibility in Flowering Plants – Evolution, Diversity,and Mechanisms. Springer-Verlag, Berlin, pp 73-101.

Allen, A.M., Lexer, C Hiscock, S.J (2010) Comparative analysis of pistil transcriptomes reveals conserved and novel genes expressed in dry, wet, and semidry stigmas. Plant Physiol 154:1347-1360.

Amici, G.B. (1824) Du pollen. Dans Annales des sciences naturelles, Vol. 2. Béchet Jeune, Paris, pp 65-70.

Andème-Onzighi, C., Sivaguru, M, Judy-March, J, Baskin, T.I Driouich, A (2002) The reb1-1 mutation of Arabidopsis alters the morphology of trichoblasts, the expression of arabinogalactan-proteins and the organization of cortical microtubules. Planta 215:949-958.

Aouar, L., Chebli, Y Geitmann, A (2010) Morphogenesis of complex plant cell shapes: the mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes. Sex Plant Reprod 23:15-27.

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408:796-815.

Armstrong, J.I., Yuan, S, Dale, J.M, Tanner, V.N Theologis, A (2004) Identification of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 101:14978-14983.

Asami, T. Yoshida, S (1999) Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. Trends Plant Sci 4:348-353.

Asami, T., Min, Y.K, Nagata, N, Yamagishi, K, Takatsuto, S, Fujioka, S, Murofushi, N, Yamaguchi, I Yoshida, S (2000) Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. Plant Physiol 123:93-100.

Asami, T., Mizutani, M, Fujioka, S, Goda, H, Min, Y.K, Shimada, Y, Nakano, T, Takatsuto, S, Matsuyama, T, Nagata, N, Sakata, K Yoshida, S (2001) Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in planta. J Biol Chem 276:25687-25691.

Asami, T., Nakano, T, Nakashita, H, Sekimata, K, Shimada, Y Yoshida, S (2003) The Influence of Chemical Genetics on Plant Science: Shedding Light on Functions and Mechanism of Action of Brassinosteroids Using Biosynthesis Inhibitors. J Plant Growth Regul 22:336-349.

Atkinson, R.G., Schröder, R, Hallett, I.C, Cohen, D MacRae, E.A (2002)

Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. Plant Physiol 129:122-133.

B

Baumberger, N., Ringli, C Keller, B (2001) The chimeric leucine-rich repeat/extension cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in Arabidopsis thaliana. Genes Dev 15:1128-1139.

Baydoun, E.A.H, Abdel-Massih, R.M, Dani, D, Rizk, S.E Brett, C.T (2001) Galactosyl- and fucosyltransferases in etiolated pea epicotyls: product identification and sub-cellular localisation. J Plant Physiol 158:145–150.

Beattie, A.J., Barthlott, W, Elisabetsky, E, Farrel, R, Kheng, C.T, Prance, I (2005) New Products and Industries from Biodiversity. Dans R. Hassan, R. Scholes, N. Ash, ed, Island Press, Washington, pp 271-295.

Becker, J.D. Feijó, J.A (2007) How many genes are needed to make a pollen tube? Lessons from transcriptomics. Ann Bot 100:1117-1123.

Beghyn, T., Deprez-Poulain, R, Willand, N, Folleas, B Deprez, B (2008) Natural compounds: leads or ideas? Bioinspired molecules for drug discovery. Chem Biol Drug Des 72:3-15.

Bessueille, L. Bulone, V (2008) A survey of cellulose biosynthesis in higher plants. Plant Biotechnol 25:315-322.

Bewley, J.D., Hempel, F.D, McCormick, S Zambryski, P (2000) Reproductive development. Dans B. Buchanan, W. Guissem, R. Jones, ed, Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 988-1043.

Blackwell, H.E. Zhao, Y (2003) Chemical genetic approaches to plant biology. Plant Physiol 133:448-455.

Boavida, L.C., Becker, J.D Feijó, J.A (2005) The making of gametes in higher plants. Int J Dev Biol 49:595-614.

Boavida, L.C. McCormick, S (2007) Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in Arabidopsis thaliana. Plant J 52:570-582.

Bonin, C.P., Potter, I, Vanzin, G.F Reiter, W.D (1997) The MUR1 gene of Arabidopsis thaliana encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose. Proc Natl Acad Sci USA 94:2085-2090.

Bosch, M. Hepler, P.K (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. Plant Cell 17:3219-3226.

Bosch, M., Cheung, A.Y Hepler, P.K (2005) Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. Plant Physiol 138:1334-1346.

Bou Daher, F. (2011) Actin cytoskeleton regulates pollen tube growth and tropism. Mémoire de thèse. Université de Montréal, Canada, pp 1-229.

Bou Daher, F. Geitmann, A (2011) Actin is involved in pollen tube tropism through redefining the spatial targeting of secretory vesicles. Traffic Sous presse.

Bouton, S., Leboeuf, E, Mouille, G, Leydecker, M, Talbotec, J, Granier, F, Lahaye, M, Höfte, H Truong, H (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in Arabidopsis. Plant Cell 14:2577-2590.

Bown, L., Kusaba, S, Goubet, F, Codrai, L, Dale, A.G, Zhang, Z, Yu, X, Morris, K, Ishii, T, Evered, C, Dupree, P Jackson, S (2007) The ectopically parting cells 1-2 (epc1-2) mutant exhibits an exaggerated response to abscisic acid. J Exp Bot 58:1813-1823.

Bradley, D.F. Wolf, M.K (1959) Aggregation of dyes bound to polyanions. Proc Natl Acad Sci U S A 45:944-952.

Brett, C. Waldron, K (1996) Physiology and biochemistry of plant cell walls. Chapman & hall, London, pp 1-259.

Brett, C.T. (2000) Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. Int Rev Cytol 199:161-199.

Brewbacker, J.L. Kwack, B.H (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am J Bot 50:859-865.

Brown Jr, R.M. (2004) Cellulose Structure and Biosynthesis- What's in Store for the 21st Century? J Polym Sci Pol Chem 42:487-495.

Brownlee, C. (2002) Role of the extracellular matrix in cell-cell signalling: paracrine paradigms. Curr Opin Plant Biol 5:396-401.

Brummell, D.A., Camirand, A Maclachlan, G.A (1990) Differential distribution of xyloglucan glycosyl transferases in pea Golgi dictyosomes and secretory vesicles. J Cell Sci 96:705-710.

C

Cabrera, J.C., Boland, A, Messiaen, J, Cambier, P Van Cutsem, P (2008) Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. Glycobiol 18:473-482.

Caffall, K.H. Mohnen, D (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. Carbohydr Res 344:1879-1900.

Cai, G. Cresti, M (2009) Organelle motility in the pollen tube: a tale of 20 years. J Exp Bot 60:495-508.

Cai, G., Faleri, C, Del Casino, C, Emons A.M.C Cresti, M (2011) Distribution of callose synthase, cellulose synthase, and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules. Plant Physiol 155:1169-1190.

Camirand, A., Brummell, D Maclachlan, G (1987) Fucosylation of xyloglucan: localization of the transferase in dictyosomes of pea stem cells. Plant Physiol 84:753-756.

Cannon, M.C., Terneus, K, Hall, Q, Tan, L, Wang, Y, Wegenhart, B.L, Chen, L, Lamport, D.T.A, Chen, Y Kieliszewski, M.J (2008) Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. Proc Natl Acad Sci U S A 105:2226-2231.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M, Rancurel, C, Bernard, T, Lombard, V Henrissat, B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res 37:D233-8.

Capodicasa, C., Vairo, D, Zabotina, O, McCartney, L, Caprari, C, Mattei, B, Manfredini, C, Aracri, B, Benen, J, Knox, J.P, De Lorenzo, G Cervone, F (2004) Targeted modification of homogalacturonan by transgenic expression of a fungal polygalacturonase alters plant growth. Plant Physiol 135:1294-1304.

Carpita, N.C. 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.

Carpita, N.C. McCann, M.C (2000) The cell wall. Dans B. Buchanan, W. Guissem, R. Jones, ed, Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 52-108.

Carpita, N.C. McCann, M.C (2002) The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations. Plant Soil 247:71-80.

Cavalier, D.M., Lerouxel, O, Neumetzler, L, Yamauchi, K, Reinecke, A, Freshour, G,

Zabotina, O.A, Hahn, M.G, Burgert, I, Pauly, M, Raikhel, N.V Keegstra, K (2008) Disrupting two Arabidopsis thaliana xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. Plant Cell 20:1519-1537.

Chae, K., Zhang, K, Zhang, L, Morikis, D, Kim, S.T, Mollet, J, de la Rosa, N, Tan, K Lord, E.M (2007) Two SCA (stigma/style cysteine-rich adhesin) isoforms show structural differences that correlate with their levels of in vitro pollen tube adhesion activity. J Biol Chem 282:33845-33858.

Chae, K., Kieslich, C.A, Morikis, D, Kim, S Lord, E.M (2009) A gain-of-function mutation of Arabidopsis lipid transfer protein 5 disturbs pollen tube tip growth and fertilization. Plant Cell 21:3902-3914.

Chae, K., Gonong, B.J, Kim, S, Kieslich, C.A, Morikis, D, Balasubramanian, S Lord, E.M (2010) A multifaceted study of stigma/style cysteine-rich adhesin (SCA)-like Arabidopsis lipid transfer proteins (LTPs) suggests diversified roles for these LTPs in plant growth and reproduction. J Exp Bot 61:4277-4290.

Chae, K. Lord, E.M (2011) Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins. Ann Bot 108:627-636.

Chen, X. Kim, J (2009) Callose synthesis in higher plants. Plant Signal Behav 4:489-492.

Cheung, A.Y. (1995) Pollen-pistil interactions in compatible pollination. Proc Natl Acad Sci U S A 92:3077-3080.

Cheung, A.Y., Wang, H Wu, H.M (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. Cell 82:383-393.

Cheung, A.Y. Wu, H.M (1999) Arabinogalactan proteins in plant sexual reproduction. Protoplasma 208:87-98.

Cheung, A.Y. Wu, H (2004) Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. Plant Cell 16:257-269.

Chevalier, L., Bernard, S, Ramdani, Y, Lamour, R, Bardor, M, Lerouge, P, Follet-Gueye, M Driouich, A (2010) Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. Plant J 64:977-989.

Ciuacanu I. Kerek, F (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbo Res 131:209–217.

Clarke, A., Gleeson, P, Harrison, S Knox, R.B (1979) Pollen-stigma interactions: Identification and characterization of surface components with recognition potential. Proc Natl Acad Sci U S A 76:3358-3362.

Clausen, M.H., Willats, W.G.T Knox, J.P (2003) Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. Carbohydr Res 338:1797-1800.

Cocuron, J., Lerouxel, O, Drakakaki, G, Alonso, A.P, Liepman, A.H, Keegstra, K, Raikhel, N Wilkerson, C.G (2007) A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 104:8550-8555.

Coimbra, S., Almeida, J, Junqueira, V, Costa, M.L Pereira, L.G (2007) Arabinogalactan proteins as molecular markers in Arabidopsis thaliana sexual reproduction. J Exp Bot 58:4027-4035.

Coimbra, S., Jones, B Pereira, L.G (2008) Arabinogalactan proteins (AGPs) related to pollen tube guidance into the embryo sac in Arabidopsis. Plant Signal Behav 3:455-456.

Coimbra, S., Costa, M, Jones, B, Mendes M.A Pereira, L.G (2009) Pollen grain development is compromised in Arabidopsis agp6 agp11 null mutants. J Exp Bot 60:3133-3142.

Coimbra, S., Costa, M, Mendes, M.A, Pereira, A.M, Pinto, J Pereira, L.G (2010) Early germination of Arabidopsis pollen in a double null mutant for the arabinogalactan protein genes AGP6 and AGP11. Sex Plant Reprod 23:199-205.

Cosgrove, D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. Nat Rev Mol Cell Biol 6:850-861.

Covey, P.A., Subbaiah, C.C, Parsons, R.L, Pearce, G, Lay, F.T, Anderson, M.A, Ryan, C.A Bedinger, P.A (2010) A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. Plant Physiol 153:703-715.

Crawford, B.C.W., Ditta, G Yanofsky, M.F (2007) The NTT gene is required for transmitting-tract development in carpels of Arabidopsis thaliana. Curr Biol 17:1101-1108.

Crawford, B.C.W. Yanofsky, M.F (2008) The formation and function of the female reproductive tract in flowering plants. Curr Biol 18:R972-8.

D

Dai, X., Hayashi, K, Nozaki, H, Cheng, Y Zhao, Y (2005) Genetic and chemical analyses of the action mechanisms of sirtinol in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 102:3129-3134.

Dardelle, F., Lehner, A, Ramdani, Y, Bardor, M, Lerouge, P, Driouich, A Mollet, J (2010) Biochemical and immunocytological characterizations of Arabidopsis pollen tube cell wall. Plant Physiol 153:1563-1576.

Davis, K.R., Darvill, A.G, Albersheim, P Dell, A (1986) Host-Pathogen Interactions : XXIX. Oligogalacturonides Released from Sodium Polypectate by Endopolygalacturonic Acid Lyase Are Elicitors of Phytoalexins in Soybean. Plant Physiol 80:568-577.

De Graaf, B.H.J., Derksen, J.W.M Mariani, C (2001) Pollen and pistil in the progamic phase. Sex Plant Reprod 14:41–5.

Deitch, A.D., Law, H deVere White, R (1982) A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. J Histochem Cytochem 30:967-972.

Delmas, F., Séveno, M, Northey, J.G.B, Hernould, M, Lerouge, P, McCourt, P Chevalier, C (2008) The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. J Exp Bot 59:2639-2647.

Derksen, J., Knuiman, B, Hoedemaekers, K, Guyon, A, Bonhomme, S Pierson, E.S (2002) Growth and cellular organization of Arabidopsis pollen tubes in vitro. Sex Plant Reprod 15:133-139.

Devaux, M.F., Barakat, A, Robert, P, Bouchet, B, Guillon, F, Navez, B Lahaye, M (2005) Mechanical breakdown and cell wall structure of mealy tomato pericarp tissue. Postharvest Biol Tec 37:209-221.

Di Sandro, A., Del Duca, S, Verderio, E, Hargreaves, A.J, Scarpellini, A, Cai, G, Cresti, M, Faleri, C, Iorio, R.A, Hirose, S, Furutani, Y, Coutts, I.G.C, Griffin, M, Bonner, P.L.R Serafini-Fracassini, D (2010) An extracellular transglutaminase is required for apple pollen tube growth. Biochem J 429:261-271.

Dong, X., Hong, Z, Sivaramakrishnan, M, Mahfouz, M Verma, D.P.S (2005) Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in Arabidopsis. Plant J 42:315-328.

Drakakaki, G., Zabotina, O, Delgado, I, Robert, S, Keegstra, K Raikhel, N (2006) Arabidopsis reversibly glycosylated polypeptides 1 and 2 are essential for pollen development. Plant Physiol 142:1480-1492.

Driouich, A., Faye, L Staehelin, L.A (1993) The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. Trends Biochem Sci 18:210-214.

Driouich, A., Durand, C Vicré-Gibouin, M (2007) Formation and separation of root border cells. Trends Plant Sci 12:14-19.

Dumas, C. (2001) Reproduction et développement des plantes à fleurs. Dans Compte-rendu de l'Académie des sciences de Paris, Sciences de la vie / Life Sciences, Vol. 324. Elsevier-Masson, Issy-les-Moulineaux, pp 517-521.

Dunand, C., Gautier, C, Chambat, G Liénart, Y (2000) Characterization of the binding of alpha-L-Fuc (1-->2)-beta-D-Gal (1-->), a xyloglucan signal, in blackberry protoplasts. Plant Sci 151:183-192.

Durand, C., Vicré-Gibouin, M, Follet-Gueye, M.L, Duponchel, L, Moreau, M, Lerouge, P Driouich, A (2009) The organization pattern of root border-like cells of Arabidopsis is dependent on cell wall homogalacturonan. Plant Physiol 150:1411-1421.

E

Eckardt, N.A. (2008) Role of xyloglucan in primary cell walls. Plant Cell 20:1421-1422.

Edlund, A.F., Swanson R Preuss, D (2004) Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. Plant Cell 16 Suppl:S84-97.

Elkins, T., Hortsch, M, Bieber, A.J, Snow, P.M Goodman, C.S (1990) Drosophila fasciclin I is a novel homophilic adhesion molecule that along with fasciclin III can mediate cell sorting. J Cell Biol 110:1825-1832.

Ellis, M., Egelund, J, Schultz, C.J Bacic, A (2010) Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface?. Plant Physiol 153:403-419.

Escobar-Restrepo, J., Huck, N, Kessler, S, Gagliardini, V, Gheyselinck, J, Yang, W Grossniklaus, U (2007) The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. Science 317:656-660.

Esquerré-Tugayé, M.T. (1979) Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions: I. A Structural Investigation of Cell Wall Hydroxyproline-rich Glycoproteins Which Accumulate in Fungus-infected Plants. Plant Physiol 64:314-319.

F

Faik, A., Price, N.J, Raikhel, N.V Keegstra, K (2002) An Arabidopsis gene encoding an alpha-xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 99:7797-7802.

Fan, L.M., Wang, Y.F, Wang, H Wu, W.H (2001) In vitro Arabidopsis pollen germination and characterization of the inward potassium currents in Arabidopsis pollen grain protoplasts. J Exp Bot 52:1603-1614.

Ferguson, C., Teeri, T.T, Siika-aho, M, Read, S.M Bacic, A (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of Nicotiana tabacum. Planta 206:452-460.

Francis, K.E., Lam, S.Y Copenhaver, G.P (2006) Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. Plant Physiol 142:1004-1013.

Frank, M., Guivarc'h, A, Krupková, E, Lorenz-Meyer, I, Chriqui, D Schmülling, T (2002) Tumorous shoot development (TSD) genes are required for co-ordinated plant shoot development. Plant J 29:73-85.

Freitas, R.A., Busato, A.P, Mitchell, D.A Silveira, J.L.M (2011) Degalatosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC–MALLS and viscosimetry. Carbo Polym 83:1636-1642.

Freshour, G., Bonin, C.P, Reiter, W, Albersheim, P, Darvill, A.G Hahn, M.G (2003) Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the mur1 mutant of Arabidopsis. Plant Physiol 131:1602-1612.

Fry, S.C. (1982) Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. Biochem J 203:493-504.

Fry, S.C., Aldington, S, Hetherington, P.R Aitken, J (1993) Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. Plant Physiol 103:1-5.

Fry, S.C. (2011) Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. Annu Plant Rev 41:1–36.

G

Gao, M. Showalter, A.M (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. Plant J 19:321-331.

García-Olmedo, F., Molina, A, Segura, A Moreno, M (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. Trends Microbiol 3:72-74.

Gaspar, Y., Johnson, K.L, McKenna, J.A, Bacic, A Schultz, C.J (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. Plant Mol Biol 47:161-176.

Gaspar, Y.M., Nam, J, Schultz, C.J, Lee, L, Gilson, P.R, Gelvin, S.B Bacic, A (2004) Characterization of the Arabidopsis lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation. Plant Physiol 135:2162-2171.

Gasteiger, J. (2006) Chemoinformatics: a new field with a long tradition. Anal Bioanal Chem 384:57-64.

Geitmann, A. (2010) How to shape a cylinder: pollen tube as a model system for the generation of complex cellular geometry. Sex Plant Reprod 23:63-71.

Geitmann, A. Steer, M (2006) The Architecture and Properties of the Pollen Tube Cell Wall. Plant Cell Monographs, Vol 3. Springer-Verlag, Berlin, pp 177-200.

Gibeaut, D.M. Carpita, N.C (1994) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. FASEB J 8:904-915.

Gille, S., Hänsel, U, Ziemann, M Pauly, M (2009) Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases. Proc Natl Acad Sci U S A 106:14699-14704.

Girke, T., Cheng, L Raikhel, N (2005) ChemMine. A compound mining database for chemical genomics. Plant Physiol 138:573-577.

Goldman, M.H., Goldberg, R.B Mariani, C (1994) Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. EMBO J 13:2976-2984.

Govers, F. Angenent, G.C (2010) Plant science. Fertility goddesses as Trojan horses. Science 330:922-923.

Graham, N.A., Pope, M.D, Rimchala, T, Huang, B.K Asthagiri, A.R (2007) A microtiter assay for quantifying protein-protein interactions associated with cell-cell adhesion. J Biomol Screen 12:683-693.

Grove, M.D., Gayland F. Spencer, G.F, William K. Rohwedder, W.K, Mandava, N, Worley, J, Warthen, J.D, Steffens, G.L, Flippen-Anderson, J.L Cook Jr, J.C (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. Nature 281:216-217.

Guillemot, J.C. (2010) Congrès : Les enjeux du criblage en 2010, Marseille, 8-10 septembre 2010.

Guillon, F., Bouchet, B, Jamme, F, Robert, P, Quéméner, B, Barron, C, Larré, C, Dumas, P

Saulnier, L (2011) Brachypodium distachyon grain: characterization of endosperm cell walls. J Exp Bot 62:1001-1015.

H

Hahn, M.G., Darvill, A.G Albersheim, P (1981) Host-Pathogen Interactions : XIX. the endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiol 68:1161-1169.

Hakimelahi, G.H Khodarahmi, G.A (2005) The identification of toxicophores for the prediction of mutagenicity, hepatotoxicity and cardiotoxicity. J Ira Chem Soc 2:244-267.

Harholt, J., Suttangkakul, A Vibe Scheller, H (2010) Biosynthesis of pectin. Plant Physiol 153:384-395.

Harris, D., Bulone, V, Ding, S DeBolt, S (2010) Tools for cellulose analysis in plant cell walls. Plant Physiol 153:420-426.

Hart, D.A. Kindel, P.K (1970) Isolation and partial characterization of apiogalacturonans from the cell wall of Lemna minor. Biochem J 116:569-579.

Harwood, A. Coates, J.C (2004) A prehistory of cell adhesion. Curr Opin Cell Biol 16:470-476.

Hasegawa, Y., Nakamura, S, Uheda, E Nakamura, N (2000) Immunolocalization and possible roles of pectins during pollen growth and callose plug formation in angiosperms; Grana 39:46-55.

Haworth, W.N. (1932) Molecular structure of cellulose and of amylase. Nature 129:365-365.

Hayashi, T., Marsden, M.P Delmer, D.P (1987) Pea Xyloglucan and Cellulose: VI. Xyloglucan-Cellulose Interactions in Vitro and in Vivo. Plant Physiol 83:384-389.

Hayashi, T., Takeda, T, Ogawa, K Mitsuishi, Y (1994) Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. Plant Cell Physiol 35:893-899.

He, J., Gendron, J.M, Sun, Y, Gampala, S.S.L, Gendron, N, Sun, C.Q Wang, Z (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. Science 307:1634-1638.

Heizmann, P., Luu, D.T Dumas, C (2000) Pollen -stigma adhesion in the Brassicaceae. Ann Bot 85:23-27.

Hepler, P.K. (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. Plant Cell 17:2142-2155.

Heslop-Harrison, Y. Shivanna, K.R (1977) The receptive surface of the Angiosperm stigma. Ann Bot 41:1233-1258.

Hesse, M., Halbritter, H, Zetter, R, Weber, M, Buchner, R, Frosch-Radivo, A Ulrich, S (2009) Pollen Terminology - An illustrated handbook. Dans M. Hesse, ed, Springer-Verlag, Vienne, pp 5-261.

Hicks, G.R. Raikhel, N.V (2009) Opportunities and challenges in plant chemical biology. Nat Chem Biol 5:268-272.

Higashiyama, T., Kuroiwa, H, Kawano, S Kuroiwa, T (1998) Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of torenia fournieri . Plant Cell 10:2019-2032.

Higashiyama, T., Yabe, S, Sasaki, N, Nishimura, Y, Miyagishima S, Kuroiwa, H Kuroiwa, T (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. Science 293:1480-1483.

Hird, D.L., Worrall, D, Hodge, R, Smartt, S, Paul, W Scott, R (1993) The anther-specific protein encoded by the Brassica napus and Arabidopsis thaliana A6 gene displays similarity to beta-1,3-glucanases. Plant J 4:1023-1033.

Hoffman, M., Jia, Z, Peña, M.J, Cash, M, Harper, A, Blackburn, A.R.2, Darvill, A York, W.S (2005) Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. Carbohydr Res 340:1826-1840.

Hong, Z., Delauney, A.J Verma, D.P (2001) A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. Plant Cell 13:755-768.

Honys, D. Twell, D (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. Genome Biol 5:R85.

Huang, J.C., Chang, L.C, Wang, M.L, Guo, C.L, Chung, M.C Jauh G.Y (2011) Identification and Exploration of Pollen Tube Small Proteins Encoded by Pollination-induced Transcripts. Plant Phys sous presse.

Huber, O. Sumper, M (1994) Algal-CAMs: isoforms of a cell adhesion molecule in embryos of the alga Volvox with homology to Drosophila fasciclin I. EMBO J 13:4212-4222.

I

Ishii, T. Matsunaga, T (2001) Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. Phytochemistry 57:969-974.

Iwai, H., Ishii, T Satoh, S (2001) Absence of arabinan in the side chains of the pectic polysaccharides strongly associated with cell walls of Nicotiana plumbaginifolia non-organogenic callus with loosely attached constituent cells. Planta 213:907-915.

Iwai, H., Masaoka, N, Ishii, T Satoh, S (2002) A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. Proc Natl Acad Sci U S A 99:16319-16324.

J

Jacobs, A.K., Lipka, V, Burton, R.A, Panstruga, R, Strizhov, N, Schulze-Lefert, P Fincher, G.B (2003) An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. Plant Cell 15:2503-2513.

Janbon, G., Himmelreich, U, Moyrand, F, Improvisi, L Dromer, F (2001) Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide. Mol Microbiol 42:453-467.

Jarvis, M.C., Briggs, S.P.H. Knox J.P. (2003) Intercellular adhesion and cell separation in plants. Plant Cell Environ 26:977-989.

Jauh, J.Y. Lord, E.M (1996) Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily *(Lilium longittorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. Planta 199:251-261.

Jauh, G.Y., Eckard, K.J, Nothnagel, E.A Lord, E.M (1997) Adhesion of lily pollen tubes on an artificial matrix. Sex Plant Reprod 10:173-180.

Jia, Z., Qin, Q, Darvill, A.G York, W.S (2003) Structure of the xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. Carbohydr Res 338:1197-1208.

Jia, X., He, L, Jing, R Li, R (2009) Calreticulin: conserved protein and diverse functions in plants. Physiol Plant 136:127-138.

Jiang, L., Yang, S, Xie, L, Puah, C.S, Zhang, X, Yang, W, Sundaresan, V Ye, D (2005) VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. Plant Cell 17:584-596.

Johnson, K.L., Jones, B.J, Bacic, A Schultz, C.J (2003) The fasciclin-like arabinogalactan proteins of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. Plant Physiol 133:1911-1925.

Johnson, M.A. Lord, E.M (2006) Extracellular guidance cues and intracellular signaling pathways that

direct pollen tube growth. Dans R. Malho, ed, The Pollen Tube. Plant Cell Monographs, Vol 3. Springer-Verlag, Berlin, pp 223–242.

Johnson-Brousseau, S.A. McCormick, S (2004) A compendium of methods useful for characterizing Arabidopsis pollen mutants and gametophytically-expressed genes. Plant J 39:761-775.

Jones, L., Seymour, G.B Knox, J.P (1997) Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1[->]4)-[beta]-D-Galactan. Plant Physiol 113:1405-1412.

Jones, L., Milne, J.L, Ashford, D McQueen-Mason, S.J (2003) Cell wall arabinan is essential for guard cell function. Proc Natl Acad Sci U S A 100:11783-11788.

K

Kader, J.C. (1997) Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. Trends Plant Sci 2:1380-1385.

Kandasamy, M.K., Nasrallah, J.B. Nasrallah, M.E (1994) Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in Arabidopsis. Development 120:3405-3418.

Kaschani, F. van der Hoorn, R (2007) Small molecule approaches in plants. Curr Opin Chem Biol 11:88-98.

Kato, Y., Yamanouchi, H, Hinata, K, Ohsumi, C Hayashi, T (1994) Involvement of Phenolic Esters in Cell Aggregation of Suspension-Cultured Rice Cells. Plant Physiol 104:147-152.

Kazius, J., McGuire, R Bursi, R (2005) Derivation and validation of toxicophores for mutagenicity prediction. J Med Chem 48:312-320.

Keegstra, K., Talmadge, K.W, Bauer, W.D Albersheim, P (1973) The structure of plant cell walls: iii. a model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. Plant Physiol 51:188-197.

Keseru, G.M. Makara, G.M (2006) Hit discovery and hit-to-lead approaches. Drug Discov Today 11:741-748.

Khersonsky, S.M., Jung, D, Kang, T, Walsh, D.P, Moon, H, Jo, H, Jacobson, E.M, Shetty, V, Neubert, T.A Chang, Y (2003) Facilitated forward chemical genetics using a tagged triazine library and zebrafish embryo screening. J Am Chem Soc 125:11804-11805.

Kieliszewski, M.J. Lamport, D.T (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. Plant J 5:157-172.

Kieliszewski, M.J. Shpak, E (2001) Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. Cell Mol Life Sci 58:1386-1398.

Kieliszewski, M.J., Lamport, D.T.A, Tan, L Cannon, M.C (2011) Hydroxyproline-rich glycoproteins: forms and function. Annu Plant Rev 41:321–336.

Kim, S., Mollet, J, Dong, J, Zhang, K, Park, S Lord, E.M (2003) Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. Proc Natl Acad Sci U S A 100:16125-16130.

Knox, J.P. (1992) Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. Plant J 2:137:141.

Kobayashi, M., Matoh, T Azuma, J (1996) Two Chains of Rhamnogalacturonan II Are Cross-Linked by Borate-Diol Ester Bonds in Higher Plant Cell Walls. Plant Physiol 110:1017-1020.

Kobayashi, M., Kouzu, N, Inami, A, Toyooka, K, Konishi, Y, Matsuoka, K Matoh, T (2011) Characterization of Arabidopsis CTP:3-deoxy-D-manno-2-octulosonate cytidylyl-transferase (CMP-KDO synthetase), the enzyme that activates KDO during

rhamnogalacturonan II biosynthesis. Plant Cell Physiol Sous presse

Kolb, H.C. Sharpless, K.B (2003) The growing impact of click chemistry on drug discovery. Drug Discov Today 8:1128-1137.

Krupková, E., Immerzeel, P, Pauly, M Schmülling, T (2007) The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of Arabidopsis encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. Plant J 50:735-750.

Kudlicka, K. Brown Jr, R.M (1997) Cellulose and Callose Biosynthesis in Higher Plants I. Solubilization and Separation of (1->3)- and (1->4)-[beta]-Glucan Synthase Activities from Mung Bean). Plant Physiol 115:643-656.

L

Lalanne, E., Honys, D, Johnson, A, Borner, G.H.H, Lilley, K.S, Dupree, P, Grossniklaus, U Twell, D (2004) SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in Arabidopsis. Plant Cell 16:229-240.

Lamport, D.T.A., Kieliszewski, M.J, Chen, Y Cannon, M.C (2011) Role of the extension superfamily in primary cell wall architecture. Plant Physiol 156:11-19.

Lancelle, S.A. Hepler, P.K (1992) Ultrastructure of freeze-substituted pollen tubes of *Lilium longitlorum.* Protoplasma 167:215-230.

Lausser, A., Kliwer, I, Srilunchang, K Dresselhaus, T (2010) Sporophytic control of pollen tube growth and guidance in maize. J Exp Bot 61:673-682.

Leboeuf, E., Thoiron, S Lahaye, M (2004) Physico-chemical characteristics of cell walls from Arabidopsis thaliana microcalli showing different adhesion strengths. J Exp Bot 55:2087-2097.

Leboeuf, E., Guillon, F, Thoiron, S Lahaye, M (2005) Biochemical and immuno-histochemical analysis of pectic polysaccharides in the cell walls of Arabidopsis mutant QUASIMODO 1 suspension-cultured cells: implications for cell adhesion. J Exp Bot 56:3171-3182.

Lee, K.J.D., Sakata, Y, Mau, S, Pettolino, F, Bacic, A, Quatrano, R.S, Knight, C.D Knox, J.P (2005) Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss Physcomitrella patens. Plant Cell 17:3051-3065.

Lehner, A., Dardelle, F, Soret-Morvan, O, Lerouge, P, Driouich, A Mollet, J (2010) Pectins in the cell wall of Arabidopsis thaliana pollen tube and pistil. Plant Signal Behav 5:1282-1285.

Lenartowska, M., Lenartowski, R, Smolinski, D.J, Wróbel, B, Niedojadło, J, Jaworski, K Bednarska, E (2009) Calreticulin expression and localization in plant cells during pollen-pistil interactions. Planta 231:67-77.

Lenartowska, M., Krzesłowska, M Bednarska, E (2010) Pectin dynamic and distribution of exchangeable Ca(2+) in Haemanthus albiflos hollow style during pollen-pistil interactions. Protoplasma Sous presse.

Lennon, K.A., Roy, S, Hepler, P.K Lord, E.M (1998) The structure of the transmitting tissue of Arabidopsis thaliana (L.) and the path of pollen tube growth. Sex Plant Reprod 11:49–59.

Lennon, K.A. Lord, E.M (2000) In vivo pollen tube cell of Arabidopsis thaliana I. Tube cell cytoplasm and wall. Protoplasma 214:45-56.

Lerouxel, O., Choo, T.S, Séveno, M, Usadel, B, Faye, L, Lerouge, P Pauly, M (2002) Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide

fingerprinting. Plant Physiol 130:1754-1763.

Lerouxel, O., Cavalier, D.M, Liepman, A.H Keegstra, K (2006) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. Curr Opin Plant Biol 9:621-630.

Levy, S., York, W.S, Stuike-Prill, R, Meyer, B Staehelin, L.A (1991) Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. Plant J 1:195-215.

Levy, S., Maclachlan, G Staehelin, L.A (1997) Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. Plant J 11:373-386.

Li, Q., Cheng, T, Wang, Y Bryant, S.H (2010) PubChem as a public resource for drug discovery. Drug Discov Today 15:1052-1057.

Li, Y.Q., Chen, F, Linskens, H.F Cresti, M (1994) Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. Sex Plant Reprod 7:145-152.

Li, Y.Q., Faleri, C, Geitmann, A, Zhang, H.Q Cresti, M (1995) Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of Nicotiana tabacum (L). Protoplasma 189:26-36.

Liepman, A.H., Wightman, R, Geshi, N, Turner, S.R Scheller, H.V (2010) Arabidopsis - a powerful model system for plant cell wall research. Plant J 61:1107-1121.

Liu, X., Liu, L, Niu, Q, Xia, C, Yang, K, Li, R, Chen, L, Zhang, X, Zhou, Y Ye, D (2011) Male gametophyte defective 4 encodes a rhamnogalacturonan II xylosyltransferase and is important for growth of pollen tubes and roots in Arabidopsis. Plant J 65:647-660.

Liu, Z.T., Fan, X, Wua, J, Zhang, L, Song, L, Gao, Z, Dong, W, Xiong, H, Peng, Y Tang, S (2007) A green route to prepare cellulose acetate particle from ramie fiber. React Funct Polym 67:104–112.

Lord, E. (2000) Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. Trends Plant Sci 5:368-373.

Lord, E.M. (2001) Adhesion molecules in lily pollination. Sex Plant Reprod 14:57-62.

Lord, E.M. Russell, S.D (2002) The mechanisms of pollination and fertilization in plants. Annu Rev Cell Dev Biol 18:81-105.

Lord, E.M. (2003) Adhesion and guidance in compatible pollination. J Exp Bot 54:47-54.

Lovy-Wheeler, A., Wilsen,K.N, Baskin, T.I Hepler, P.K (2005) Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. Planta 221:95-104.

Lovy-Wheeler, A., Kunkel, J.G, Allwood, E.G, Hussey, P.J Hepler, P.K (2006) Oscillatory increases in alkalinity anticipate growth and may regulate actin dynamics in pollen tubes of lily. Plant Cell 18:2182-2193.

Luu, D.T., Heizmann, P Dumas, C (1997) Pollen-Stigma Adhesion in Kale Is Not Dependent on the Self-(In)Compatibility Genotype. Plant Physiol 115:1221-1230.

Luu, D.T., Marty-Mazars, D, Trick, M, Dumas, C Heizmann, P (1999) Pollen-stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. Plant Cell 11:251-262.

M

Madson, M., Dunand, C, Li, X, Verma, R, Vanzin, G.F, Caplan, J, Shoue, D.A, Carpita, N.C Reiter, W (2003) The MUR3 gene of Arabidopsis encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. Plant Cell 15:1662-1670.

Maldonado, A.M., Doerner, P, Dixon, R.A, Lamb, C.J Cameron, R.K (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. Nature 419:399-403.

Malho, R. (2006) The Pollen Tube: A Model Systemfor Cell andMolecular Biology Studies. Dans R. Malho, ed, The Pollen Tube. Plant Cell Monographs, Vol 3. Springer-Verlag, Berlin, pp 1-13.

Manabe, Y., Nafisi, M, Verhertbruggen, Y, Orfila, C, Gille, S, Rautengarten, C, Cherk, C, Marcus, S.E, Somerville, S, Pauly, M, Knox, J.P, Sakuragi, Y Scheller, H.V (2011) Loss-of-function mutation of REDUCED WALL ACETYLATION2 in Arabidopsis leads to reduced cell wall acetylation and increased resistance to Botrytis cinerea. Plant Physiol 155:1068-1078.

Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y, Hervé, C, Ordaz-Ortiz, J.J, Farkas, V, Pedersen, H.L, Willats, W.G.T Knox, J.P (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. BMC Plant Biol 8:60.

Márton, M.L., Cordts, S, Broadhvest, J Dresselhaus, T (2005) Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize. Science 307:573-576.

Matoh, T., Takasaki, M, Takabe, K Kobayashi, M (1998) Immunocyto-chemistry of Rhamnogalacturonan II in Cell Walls of Higher Plants. Plant Cell Physiol 39:483-491.

McCann, M.C. Carpita, N.C (2008) Designing the deconstruction of plant cell walls. Curr Opin Plant Biol 11:314-320.

McCann, M.C. Roberts, K (1991) Architecture of the primary cell wall. Dans C.W. Lloyd, ed, The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Academic Press, London, pp 109-129.

McCartney, L., Ormerod, A.P, Gidley, M.J Knox, J.P (2000) Temporal and spatial regulation of pectic (1-->4)-beta-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. Plant J 22:105-113.

McCourt, P. Desveaux, D (2010) Plant chemical genetics. New Phytol 185:15-26.

McInnes, C. (2007) Virtual screening strategies in drug discovery. Curr Opin Chem Biol 11:494-502.

Meikle, P.J., Bonig, I, Hoogenraad, N.J, Clarke, A.E Stone, B.A (1991)The location of (1→3)-beta-glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana alata* using a (1→3)-beta-glucan-specific monoclonal antibody. Planta 185:1-8.

Meinke, D. Koornneef, M (1997) Community standards for Arabidopsis genetics. Plant J 12:247-253.

Micheli, F. (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. Trends Plant Sci 6:414-419.

Mitchell, R.A.C., Dupree, P Shewry, P.R (2007) A novel bioinformatics approach identifies candidate genes for the synthesis and feruloylation of arabinoxylan. Plant Physiol 144:43-53.

Mitchison, T.J. (1994) Towards a pharmacological genetics. Chem Biol 1:3-6.

Mohnen, D. (2008) Pectin structure and biosynthesis. Curr Opin Plant Biol 11:266-277.

Moller, I., Marcus, S.E, Haeger, A, Verhertbruggen, Y, Verhoef, R, Schols, H, Ulvskov, P, Mikkelsen, J.D, Knox, J.P Willats, W (2008) High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. Glycoconj J 25:37-48.

Mollet, J.C., Park, S.Y, Nothnagel, E.A Lord, E.M (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. Plant Cell 12:1737-1750.

Mollet, J., Kim, S, Jauh, G Lord, E.M (2002) Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. Protoplasma 219:89-98.

Mollet, J.C., Faugeron, C Morvan, H (2007) Cell adhesion, separation and guidance in compatible plant reproduction. Annu Plant Rev 25:69–90.

Mort, A.J., Moerschbacher, B.M, Pierce, M.L Maness, N.O (1991) Problems encountered during the extraction, purification, and chromatography of pectic fragments, and some solutions to them. Carbo Res 215:219-221.

Mueller, S.C. Brown, R.M.J (1980) Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. J Cell Biol 84:315-326.

N

Nakamura, N. Suzuki, H (1981) Sugar composition of pollen grain and pollen tube cell walls. Phytochemistry 20:981-984.

Nakayama, K., Maeda, Y Jigami, Y (2003) Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3,5-epimerase-4-reductase with GDP-mannose-4,6-dehydratase stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose. Glycobiology 13:673-680.

Nguema-Ona, E., Andème-Onzighi, C, Aboughe-Angone, S, Bardor, M, Ishii, T, Lerouge, P Driouich, A (2006) The reb1-1 mutation of Arabidopsis. Effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. Plant Physiol 140:1406-1417.

Nguema-Ona, E., Bannigan, A, Chevalier, L, Baskin, T.I Driouich, A (2007) Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of Arabidopsis thaliana. Plant J 52:240-251.

Ngugi, H.K., Scherm, H (2004) Pollen mimicry during infection of blueberry flowers by conidia of Monilinia vaccinii-corymbosi. Physiol Molecular Plant P 64:113–123.

Nieuwland, J., Feron, R, Huisman, B.A.H, Fasolino, A, Hilbers, C.W, Derksen, J Mariani, C (2005) Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. Plant Cell 17:2009-2019.

Nishikawa, S., Zinkl, G.M, Swanson, R.J, Maruyama, D Preuss, D (2005) Callose (beta-1,3 glucan) is essential for Arabidopsis pollen wall patterning, but not tube growth. BMC Plant Biol 5:22.

Nishimura, M.T., Stein, M, Hou, B, Vogel, J.P, Edwards, H Somerville, S.C (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. Science 301:969-972.

O

Obel, N., Erben, V, Schwarz, T, Kühnel, S, Fodor, A Pauly, M (2009) Microanalysis of plant cell wall polysaccharides. Mol Plant 2:922-932.

Okuda, S., Tsutsui, H, Shiina, K, Sprunck, S, Takeuchi, H, Yui, R, Kasahara, R.D, Hamamura, Y, Mizukami, A, Susaki, D, Kawano, N, Sakakibara, T, Namiki, S, Itoh, K, Otsuka, K, Matsuzaki, M, Nozaki, H, Kuroiwa, T, Nakano, A, Kanaoka, M.M, Dresselhaus, T, Sasaki, N Higashiyama, T (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. Nature 458:357-361.

Okuda, S. Higashiyama, T (2010) Pollen tube guidance by attractant molecules: LUREs. Cell Struct Funct 35:45-52.

O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D, Kates, K, Pellerin, P, Doco, T, Darvill, A.G Albersheim, P (1996) Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. J Biol Chem 271:22923-22930.

O'Neill, M.A., Eberhard, S, Albersheim, P Darvill, A.G (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. Science 294:846-849.

Orfila, C., Seymour, G.B, Willats, W.G, Huxham, I.M, Jarvis, M.C, Dover, C.J, Thompson, A.J Knox, J.P (2001) Altered middle lamella homogalacturonan and disrupted deposition of (1-->5)-alpha-L-arabinan in the pericarp of Cnr, a ripening mutant of tomato. Plant Physiol 126:210-221.

Orfila, C., Sørensen, S.O, Harholt, J, Geshi, N, Crombie, H, Truong, H, Reid, J.S.G, Knox, J.P Scheller, H.V (2005) QUASIMODO1 is expressed in vascular tissue of Arabidopsis thaliana inflorescence stems, and affects homogalacturonan and xylan biosynthesis. Planta 222:613-622.

Oxley, D. Bacic, A (1999) Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from Pyrus communis suspension-cultured cells. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14246-14251.

P

Palanivelu, R. Preuss, D (2000) Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. Trends Cell Biol 10:517-524.

Palanivelu, R., Brass, L, Edlund, A.F Preuss, D (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. Cell 114:47-59.

Palanivelu, R. Preuss, D (2006) Distinct short-range ovule signals attract or repel Arabidopsis thaliana pollen tubes in vitro. BMC Plant Biol 6:7.

Park, S.Y., Jauh, G.Y, Mollet, J.C, Eckard, K.J, Nothnagel, E.A, Walling, L.L Lord, E.M (2000) A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. Plant Cell 12:151-164.

Park, S. Lord, E.M (2003) Expression studies of SCA in lily and confirmation of its role in pollen tube adhesion. Plant Mol Biol 51:183-189.

Parre, E. Geitmann, A (2005a) More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. Plant Physiol 137:274-286.

Parre, E. Geitmann, A (2005b) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of Solanum chacoense. Planta 220:582-592.

Pauly, M. Scheller, H.V (2000) O-Acetylation of plant cell wall polysaccharides: identification and partial characterization of a rhamnogalacturonane O-acetyl-transferase from potato suspension-cultured cells. Planta 210:659-667.

Pauly, M., Qin, Q, Greene, H, Albersheim, P, Darvill, A York, W.S (2001) Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. Planta 212:842-850.

Pelloux, J., Rustérucci, C Mellerowicz, E.J (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends Plant Sci 12:267-277.

Peña, M.J. Carpita, N.C (2004) Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. Plant Physiol 135:1305-1313.

Peña, M.J., Ryden, P, Madson, M, Smith, A.C Carpita, N.C (2004) The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in Arabidopsis during growth. Plant Physiol 134:443-451.

Pereira, L.G., Coimbra, S, Oliveira, H, Monteiro, L Sottomayor, M (2006) Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of Arabidopsis thaliana. Planta 223:374-380.

Perrin, R.M., Jia, Z, Wagner, T.A, O'Neill, M.A, Sarria, R, York, W.S, Raikhel, N.V Keegstra,

K (2003) Analysis of xyloglucan fucosylation in Arabidopsis. Plant Physiol 132:768-778.

Piffanelli, P., Ross, J.H.E Murphy, D.J (1998) Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. Sex Plant Reprod 11:65-80.

Popper, Z.A. Fry, S.C (2005) Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. Ann Bot 96:91-99.

Popper, Z.A. Fry, S.C (2008) Xyloglucan-pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. Planta 227:781-794.

Prado, A.M., Porterfield, D.M Feijó, J.A (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. Development 131:2707-2714.

Puhlmann, J., Bucheli, E, Swain, M.J, Dunning, N, Albersheim, P, Darvill, A.G Hahn, M.G (1994) Generation of monoclonal antibodies against plant cell-wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal alpha-(1-->2)-linked fucosyl-containing epitope. Plant Physiol 104:699-710.

Q

Qin, Y., Leydon, A.R, Manziello, A, Pandey, R, Mount, D, Denic, S, Vasic, B, Johnson, M.A Palanivelu, R (2009) Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. PLoS Genet 5:e1000621.

Qin, Y., Wysocki, R.J.J, Somogyi, A, Feinstein, Y, Franco, J.Y, Tsukamoto, T, Dunatunga, D, Levy, C, Smith, S, Simpson, R, Gang, D, Johnson, M.A Palanivelu, R (2011) Sulfinylated Azadecalins act as functional mimics of a pollen germination stimulant in Arabidopsis pistils. Plant J Sous presse.

Quiapim, A.C., Brito, M.S, Bernardes, L.A.S, Dasilva, I, Malavazi, I, DePaoli, H.C, Molfetta-Machado, J.B, Giuliatti, S, Goldman, G.H Goldman, M.H.S (2009) Analysis of the Nicotiana tabacum stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. Plant Physiol 149:1211-1230.

R

Rae, A.L., Harris, P.J, Bacic, A Clarke, A.E (1985) Composition of the cell walls of Nicotiana Mata Link et Otto pollen tubes. Planta 166:128-133.

Raikhel, N. Pirrung, M (2005) Adding precision tools to the plant biologists' toolbox with chemical genomics. Plant Physiol 138:563-564.

Rault, S. (2010) Congrès : Les enjeux du criblage en 2010, Marseille, 8-10 septembre 2010.

Rautengarten, C., Ebert, B, Herter, T, Petzold, C.J, Ishii, T, Mukhopadhyay, A, Usadel, B Scheller, H.V (2011) The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in Arabidopsis. Plant Cell 23:1373-1390.

Ravindran, S., Kim, S, Martin, R, Lord, EM Ozkan, CS (2005) Quantum dots as bio-labels for the localization of a small plant adhesion protein. Nanotechnology 16:1-4.

Ray, P.M., Green, P.B Cleland, R (1972) Role of turgor in plant-cell growth. Nature 239:163-164.

Rhee, S.Y., Osborne, E, Poindexter, P.D Somerville, C.R (2003) Microspore separation in the quartet 3 mutants of Arabidopsis is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation. Plant Physiol 133:1170-1180.

Ridley, B.L., O'Neill, M.A Mohnen, D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry 57:929-967.

Roberts, J.A. Hooley, R (1988) Plant growth regulators. Dans Plant growth regulators, Kluwer Academic Publishers, Norwell, pp 1-200.

Roberts, K. (2001) How the cell wall acquired a cellular context. Plant Physiol 125:127-130.

Roquemore, E.P., Murphy, S, Capper, S.J, Hancock, S.M, Adie, E, Prince-Jone, M, Game, S Swinburne, S (2003) Is Z' factor the best assessment for the quality of cellular assays of delivering higher content ? Congrès : High-content analysis, San Francisco, 29-30 janvier 2004.

Rosania, G.R., Lee, J.W, Ding, L, Yoon, H Chang, Y (2003) Combinatorial approach to organelle-targeted fluorescent library based on the styryl scaffold. J Am Chem Soc 125:1130-1131.

Rounds, C.M., Lubeck, E, Hepler, P.K Winship, L.J (2011) Propidium iodide competes with Ca2+ to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs. Plant Physiol 157:175-187.

Roy, S., Eckard, K.J, Lancelle, S, Hepler, P.K Lord E.M (1997) High-pressure freezing improves the ultrastructural preservation of in vivo grown lily pollen tubes. Protoplasma 200:87-98.

Rubinstein, A.L., Prata, R.T.N Bedinger, P.A (1995a) Developmental accumulation of hydroxyproline and hydroxyproline-containing proteins in Zea mays pollen. Sex Plant Reprod 8:27-32.

Rubinstein, A.L., Broadwater, A.H, Lowrey, K.B Bedinger, P.A (1995b) Pex1, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. Proc Natl Acad Sci U S A 92:3086-3090.

Rubinstein, A.L., Marquez, J, Suarez-Cervera, M Bedinger, P.A (1995c) Extensin-like Glycoproteins in the Maize Pollen Tube Wall. Plant Cell 7:2211-2225.

S

Samuels, A.L., Giddings, T.H.J Staehelin, L.A (1995) Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. J Cell Biol 130:1345-1357.

Sanders, L.C. Lord, E.M (1989) Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species of flowering plants. Science 243:1606-1608.

Sardar, H.S., Yang, J Showalter, A.M (2006) Molecular interactions of arabinogalactan proteins with cortical microtubules and F-actin in Bright Yellow-2 tobacco cultured cells. Plant Physiol 142:1469-1479.

Scheller, H.V., Jensen, J.L, Sørensen, S.O, Harholt, J Geshi, N (2007) Biosynthesis of pectin. Physiol Plant 129:283–295.

Scheller, H.V. Ulvskov, P (2010) Hemicelluloses. Annu Rev Plant Biol 61:263-289.

Schlupmann, H., Bacic, A Read, S.M (1994) Uridine Diphosphate Glucose Metabolism and Callose Synthesis in Cultured Pollen Tubes of Nicotiana alata Link et Otto. Plant Physiol 105:659-670.

Schols, H.A., Vierhuis, E, Bakx, E.J Voragen, A.G (1995) Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. Carbohydr Res 275:343-360.

Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E Nasrallah, J.B (1999) The male determinant of self-incompatibility in Brassica. Science 286:1697-1700.

Schreiber, S.L. (1998) Chemical Genetics Resulting from a Passion for Synthetic Organic Chemistry. Bioorgan Med Chem 6:1127-1152.

Schultz, C., Gilson, P, Oxley, D, Youl, J Bacic, A (1998) GPI-anchors on arabino-

galactanproteins: implications for signalling in plants. Trends Plant Sci 3:426-431.

Schultz, C.J., Rumsewicz, M.P, Johnson, K.L, Jones, B.J, Gaspar, Y.M Bacic, A (2002) Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. Plant Physiol 129:1448-1463.

Seifert, G.J. Roberts, K (2007) The biology of arabinogalactan proteins. Annu Rev Plant Biol 58:137-161.

Sherman-Broyles, S., Boggs, N, Farkas, A, Liu, P, Vrebalov, J, Nasrallah, M.E Nasrallah, J.B (2007) S locus genes and the evolution of self-fertility in Arabidopsis thaliana. Plant Cell 19:94-106.

Shevell, D.E., Kunkel, T Chua, N.H (2000) Cell wall alterations in the Arabidopsis emb30 mutant. Plant Cell 12:2047-2060.

Shi, H., Kim, Y, Guo, Y, Stevenson, B Zhu, J (2003) The Arabidopsis SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. Plant Cell 15:19-32.

Shibuya, N. Minami, E (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. Physiol Mol Plant Pathol 59:223-233.

Shogren-Knaak, M.A, Alaimo, P.J Shokat, K.M (2001) Recent advances in chemical approaches to the study of biological systems. Annu Rev Cell Dev Biol 17:405–33.

Showalter, A.M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. Plant Cell 5:9-23.

Silipo, A., Erbs, G, Shinya, T, Dow, J.M, Parrilli, M, Lanzetta, R, Shibuya, N, Newman, M Molinaro, A (2010) Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. Glycobiology 20:406-419.

Sims, R.E.H., Mabee, W, Saddler, J.N Taylor, M (2010) An overview of second generation biofuel technologies. Bioresour Technol 101:1570-1580.

Singh, S.K., Eland, C, Harholt, J, Scheller, H.V Marchant, A (2005) Cell adhesion in Arabidopsis thaliana is mediated by ECTOPICALLY PARTING CELLS 1—a glycosyltransferase (GT64) related to the animal exostosins. Plant J 43:384-397.

Sivaguru, M., Fujiwara, T, Samaj, J, Baluska, F, Yang, Z, Osawa, H, Maeda, T, Mori, T, Volkmann, D Matsumoto, H (2000) Aluminum-induced 1-->3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. Plant Physiol 124:991-1006.

Smallwood, M., Martin, H Knox, J.P (1995) An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. Planta 196:510-522.

Smith, M.M. McCully, M.E (1978) Enhancing aniline blue fluorescent staining of cell wall structures. Stain Technol 53:79-85.

Smith, K.D., Davies, M.J Hounsell, E.F (1994) Structural profiling of oligosaccharides of glycoproteins. Met Mol Biol 32-143-155.

Somerville, C. (2006) Cellulose synthesis in higher plants. Annu Rev Cell Dev Biol 22:53-78.

Sommer-Knudsen, J., Clarke, A.E Bacic, A (1997) Proline- and hydroxyproline-rich gene products in the sexual tissues of flowers. Sex Plant Reprod 10:253-260

Sørensen, I., Pettolino, F.A, Wilson, S.M, Doblin, M.S, Johansen, B, Bacic, A Willats, W.G.T (2008) Mixed-linkage (1-->3),(1-->4)-beta-D-glucan is not unique to the Poales and is an abundant component of Equisetum arvense cell walls. Plant J 54:510-521.

Southern, E.M. (2001) DNA microarrays. History and overview. Methods Mol Biol 170:1-15.

Speers, A.E. Cravatt, B.F (2004) Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods. Chem Biol 11:535-546.

Staehelin, L.A. Newcomb, E.H. (2000) Membrane structure and membranes organelles. Dans B. Buchanan, W. Guissem, R. Jones, ed, Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 2-51.

Staehelin, A.L. Moore, I (1995) The plant golgi apparatus: Structure, Functional Organization and Trafficking Mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio. 46:261-288.

Staehelin, L.A. Hepler, P.K (1996) Cytokinesis in higher plants. Cell 84:821-824.

Stockwell, B.R. (2000) Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function. Nat Rev Genet 1:116-125.

Stockwell, B.R. (2004) Exploring biology with small organic molecules. Nature 432:846-854.

Sun, Q., Greve, L.C Labavitch, J.M (2011) Polysaccharide compositions of intervessel pit membranes contribute to Pierce's disease resistance of grapevines. Plant Physiol155:1976-1987.

Sun, W., Zhao, Z.D, Hare, M.C, Kieliszewski, M.J Showalter, A.M (2004) Tomato LeAGP-1 is a plasma membrane-bound, glycosylphosphatidylinositol-anchored arabinogalactan-protein. Physiol Plant 120:319-327.

Surpin, M. Raikhel, N (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 5:100-109.

Svetek, J., Yadav, M.P Nothnagel, E.A (1999) Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins. J Biol Chem 274:14724-14733.

Swanson, R., Edlund, A.F Preuss, D (2004) Species specificity in pollen-pistil interactions. Annu Rev Genet 38:793-818.

T

Tabuchi, A., Li, L Cosgrove, D.J (2011) Matrix solubilization and cell wall weakening by \-expansin (group-1 allergen) from maize pollen. Plant J Sous presse.

Takasaki, T., Hatakeyama, K, Suzuki, G, Watanabe, M, Isogai, A Hinata, K (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigma. Nature 403:913-916.

Taylor, L.P. Hepler, P.K (1997) Pollen germination and tube growth. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 48:461–91.

Thompson, J.E. Fry, S.C (2000) Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. Planta 211:275-286.

Tóth, R. van der Hoorn, R.A.L (2010) Emerging principles in plant chemical genetics. Trends Plant Sci 15:81-88.

Tryfona, T., Liang, H, Kotake, T, Kaneko, S, Marsh, J, Ichinose, H, Lovegrove, A, Tsumuraya, Y, Shewry, P.R, Stephens, E Dupree, P (2010) Carbohydrate structural analysis of wheat flour arabinogalactan protein. Carbohydr Res 345:2648-2656.

Tsuchimatsu, T., Suwabe, K, Shimizu-Inatsugi, R, Isokawa, S, Pavlidis, P, Städler, T, Suzuki, G, Takayama, S, Watanabe, M Shimizu, K.K (2010) Evolution of self-compatibility in Arabidopsis by a mutation in the male specificity gene. Nature 464:1342-1346.

Tung, C., Dwyer, K.G, Nasrallah, M.E Nasrallah, J.B (2005) Genome-wide identification of genes expressed in Arabidopsis pistils specifically along the path of pollen tube growth. Plant Physiol 138:977-989.

Twell, D. (2006) A blossoming romance: gamete interactions in flowering plants. Nat Cell Biol 8:14-16.

Twell, D. (2011) Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. Sex Plant Reprod 24:149-160.

U

Ueki, S. Citovsky, V (2002) The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein. Nat Cell Biol 4:478-486.

V

Vanzin, G.F., Madson, M, Carpita, N.C, Raikhel, N.V, Keegstra, K Reiter, W (2002) The mur2 mutant of Arabidopsis thaliana lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. Proc Natl Acad Sci U S A 99:3340-3345.

Velasquez, S.M., Ricardi, M.M, Dorosz, J.G, Fernandez, P.V, Nadra, A.D, Pol-Fachin, L, Egelund, J, Gille, S, Harholt, J, Ciancia, M, Verli, H, Pauly, M, Bacic, A, Olsen, C.E, Ulvskov, P, Petersen, B.L, Somerville, C, Iusem, N.D Estevez, J.M (2011) O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. Science 332:1401-1403.

Verma, D.P. Hong, Z (2001) Plant callose synthase complexes. Plant Mol Biol 47:693-701.

Vicré, M., Santaella, C, Blanchet, S, Gateau, A Driouich, A (2005) Root border-like cells of Arabidopsis. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. Plant Physiol 138:998-1008.

Vincken, J., Schols, H.A, Oomen, R.J.F.J, McCann, M.C, Ulvskov, P, Voragen, A.G.J Visser, R.G.F (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonane I. Implications for cell wall architecture. Plant Physiol 132:1781-1789.

Vorwerk, S., Somerville, S Somerville, C (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. Trends Plant Sci 9:203-209.

Voxeur, A., Gilbert, L, Rihouey, C, Driouich, A, Rothan, C, Baldet, P Lerouge, P (2011) Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato. J Biol Chem 286:8014-8020.

W

Waldron, K., Brett, C (2007) The role of polymer cross-linking in intercellular adhesion. Annu Plant Rev 25:183–204.

Walsh, D.P. Chang, Y (2006) Chemical genetics. Chem Rev 106:2476-2530.

Wang, H., Wu, H.M Cheung, A.Y (1996) Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. Plant J 9:715-727.

Wang, H.J., Huang, J.C Jauh, G.Y (2010) Pollen germination and tube growth. Adv Bot Res 54:1-52.

Wang, W., Wang, L, Chen, C, Xiong, G, Tan, X, Yang, K, Wang, Z, Zhou, Y, Ye, D Chen, L (2011) Arabidopsis CSLD1 and CSLD4 are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes. J Exp Bot Sous Presse.

Wei, G. Shirsat, AH (2006) Extensin over-expression in Arabidopsis limits pathogen invasinveness. Mol Plant Pathol 7:579-592.

Wemmer, T., Kaufmann, H, Kirch, H.H, Schneider, K, Lottspeich, F Thompson, R.D (1994) The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (Solanum tuberosum L.) is an endochitinase. Planta 194:264-273.

Wheeler, M.J., de Graaf, B.H.J, Hadjiosif, N, Perry, R.M, Poulter, N.S, Osman, K, Vatovec, S, Harper, A, Franklin, F.C.H Franklin-Tong, V.E (2009) Identification of the pollen self-

incompatibility determinant in Papaver rhoeas. Nature 459:992-995.

White, A.R., Xin, Y Pezeshk, V (1993) Xyloglucan glucosyltransferase in Golgi membranes from Pisum sativum (pea). Biochem J 294:231-238.

Whitney, S., Gothard, M, Mitchell, J Gidley, M (1999) Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. Plant Physiol 121:657-664.

Whitney, S.E.C., Wilson, E, Webster, J, Bacic, A, Reid, J.S.G Gidley, M.J (2006) Effects of structural variation in xyloglucan polymers on interactions with bacterial cellulose. Am J Bot 93:1402-1414.

Willats, W.G. Knox, J.P (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of Arabidopsis thaliana. Plant J 9:919-925.

Willats, W.G., Marcus, S.E Knox, J.P (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1-->5)-alpha-L-arabinan. Carbohydr Res 308:149-152.

Willats, W., Steele-King, C, Marcus, S Knox, J (1999) Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. Plant J 20:619-628.

Willats, W.G.T, Steele-King, C.G, McCartney, L, Orfila, C, Marcus, S.E Knox, J.P (2000) Making and using antibody probes to study plant cell walls. Plant Physiol Biochem 38:27-36.

Willats, W.G.T., McCartney, L, Steele-King, C.G, Marcus, S.E, Mort, A, Huisman, M, van Alebeek, G, Schols, H.A, Voragen, A.G.J, Le Goff, A, Bonnin, E, Thibault, J Knox, J.P (2004) A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. Planta 218:673-681.

Williams, M.N., Freshour, G, Darvill, A.G, Albersheim, P Hahn, M.G (1996) An antibody Fab selected from a recombinant phage display library detects deesterified pectic polysaccharide rhamno-galacturonan II in plant cells. Plant Cell 8:673-685.

Wolf, S., Mouille, G Pelloux, J (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. Mol Plant 2:851-860.

Wu, H.M., Wang, H Cheung, A.Y (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. Cell 82:395-403.

Wu, H.M., Wong, E, Ogdahl, J Cheung, A.Y (2000) A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from nicotiana alata is similar to the tobacco TTS protein. Plant J 22:165-176.

X

Xia, C., Wang, Y, Li, W, Chen, Y, Deng, Y, Zhang, X, Chen, L Ye, D (2010) The Arabidopsis eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F (AteIF3f), is required for pollen germination and embryogenesis. Plant J 63:189-202.

Xie, B., Wang, X, Zhu, M, Zhang, Z Hong, Z (2011) CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. Plant J 65:1-14.

Y

Yadegari, R. Drews, G.N (2004) Female gametophyte development. Plant Cell 16 Suppl:S133-41.

Yates, E.A., Valdor, J.F, Haslam, S.M, Morris, H.R, Dell, A, Mackie, W Knox, J.P (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. Glycobiology 6:131-139.

Yeats, T.H. Rose, J.K.C (2008) The biochemistry and biology of extracellular

plant lipid-transfer proteins (LTPs). Protein Sci 17:191-198.

Yin, Y., Mohnen, D, Gelineo-Albersheim, I, Xu, Y Hahn, G.M (2011) Glycosyltransferase of the GT8 family. Annu Plant Rev 41:321–336.

Yokota, M., Nagamine, N, Sugawara, Y, Popendorf, K, Uchida, M, Kitahashi, T, Komori, T Sakakibara, Y (2009) COPICAT: A software system for predicting interactions between chemical compounds and proteins by using two-layer support vector machine. Congrès : 20th International Conference on Genome Informatics, Poster and Software demonstrations, Kyoto, 31 mai – 3 juin 2004.

Yoneda, A., Higaki, T, Kutsuna, N, Kondo, Y, Osada, H, Hasezawa, S Matsui, M (2007) Chemical genetic screening identifies a novel inhibitor of parallel alignment of cortical microtubules and cellulose microfibrils. Plant Cell Physiol 48:1393-1403.

York, W.S., Kumar Kolli, V.S, Orlando, R, Albersheim, P Darvill, A.G (1996) The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. Carbohydr Res 285:99-128.

Yuasa, K., Toyooka, K, Fukuda, H Matsuoka, K (2005) Membrane-anchored prolyl hydroxylase with an export signal from the endoplasmic reticulum. Plant J 41:81-94.

Z

Zablackis, E., Huang, J, Müller, B, Darvill, A.G Albersheim, P (1995) Characterization of the cell-wall polysaccharides of Arabidopsis thaliana leaves. Plant Physiol 107:1129-1138.

Zablackis, E., York, W.S, Pauly, M, Hantus, S, Reiter, W.D, Chapple, C.C, Albersheim, P Darvill, A (1996) Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of Arabidopsis mur1. Science 272:1808-1810.

Zabotina, O.A., van de Ven, W.T.G, Freshour, G, Drakakaki, G, Cavalier, D, Mouille, G, Hahn, M.G, Keegstra, K Raikhel, N.V (2008) Arabidopsis XXT5 gene encodes a putative alpha-1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. Plant J 56:101-115.

Zandleven, J., Sørensen, S.O, Harholt, J, Beldman, G, Schols, H.A, Scheller, H.V Voragen, A.J (2007) Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of Arabidopsis thaliana. Phytochemistry 68:1219-1226.

Zavaliev, R., Ueki, S, Epel, B.L Citovsky, V (2011) Biology of callose (β-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. Protoplasma 248:117-130.

Zhang, J., Chung, T Oldenburg, K (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. J Biomol Screen 4:67-73.

Zhao, J., Yang, H.Y Lord, E.M (2004a) Calcium levels increase in the lily stylar transmitting tract after pollination. Sex Plant Reprod 16:259–263.

Zhao, J., Mollet, J.C Lord, E.M (2004b) Lily (Lilium longiflorum L.) pollen protoplast adhesion is increased in the presence of the peptide SCA. Sex Plant Reprod 16:227–233.

Zhao, Y., Dai, X, Blackwell, H.E, Schreiber, S.L Chory, J (2003) SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. Science 301:1107-1110.

Zhu, J.K., Damsz, B, Kononowicz, A.K, Bressan, R.A Hasegawa, P.M (1994) A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 alpha. Plant Cell 6:393-404.

Zinkl, G.M., Wilhelmi, L.K Preuss, D (1998) Sticking together: Cell Adhesion interactions in Arabidopsis reproduction. J Plant Res 111:299-305.

Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I, Grier, D.G Preuss, D (1999) Pollen-stigma adhesion in Arabidopsis: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. Development 126:5431-5440.

Zonia, L. Munnik, T (2008) Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. J Exp Bot 59:861-873.

Zonia, L. Munnik, T (2009) Uncovering hidden treasures in pollen tube growth mechanics. Trends Plant Sci 14:318-327.

Zuo, J., Niu, Q.W, Nishizawa, N, Wu, Y, Kost, B Chua, N.H (2000) KORRIGAN, an Arabidopsis endo-1,4-beta-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. Plant Cell 12:1137-1152.

Annexes

Flavien DARDELLE
16, Rue Saint André
76000 Rouen
Tél. : 0671712669
Tél. : 0953510018
Courriel : flavien.dardelle@gmail.com

Curriculum Vitae

Cursus universitaire

2008-aujourd'hui	Préparation au diplôme de doctorat - Biologie végétale	Université de Rouen
2007-2008	Master 2 Biologie-Santé-Environnement	
2006-2007	Master 1 Biologie végétale	
2003-2006	Licence de Biologie Parcours Biochimie	
2003	Baccalauréat Scientifique	Rouen

Expérience professionnelle scientifique

Actuellement	Contrat post-doctoral (laboratoire Glyco-MEV EA4358)
2008-2011	Doctorat (laboratoire Glyco-MEV EA4358)
Août 2008	Ingénieur contractuel (laboratoire Glyco-MEV EA4358)
Juillet 2007	Technicien contractuel (laboratoire Glyco-MEV EA4358)

Compétences particulières

- Techniques de microscopie : fixation chimique classique / enrésinement en résines / ultra-microtomie (coupes semi-fines) / cryomicrotomie / immunomarquage.

- Techniques de biochimie : Extraction et fractionnement pariétale / préparation d'échantillon pour chromatographie en phase gazeuse / préparation d'échantillon pour spectrométrie de masse (MALDI-TOF ou ESI) / Dot Blot.

- Logiciels d'analyse utilisés: Image J, Leica LCS lite, Prism, Data Explorer.

- Anglais écrit et oral courant

- Permis B

Communications

Publications dans des journaux internationaux à comité de lecture

2011 **F Dardelle** *et al.* : Solanaceae pollen tube and vegetative organs have structurally divergent xyloglucan.
En preparation.

2010 A Lehner, **F Dardelle** *et al.* : Pectins in the cell wall of Arabidopsis thaliana pollen tube and pistil.
Plant Signaling & Behavior 5:1282-1285.

2010 **F Dardelle** *et al.* : Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis thaliana* pollen tube cell wall.
Plant Physiology 153:1563-1576.

Chapitre de livre

2010 A Driouich, M-A Cannesan, **F Dardelle**, C Durand, B Plancot, S Bernard, M-L Follet-Gueye, M Vicré-gibouin. Unity is strength**:** the power of border cells and border-like cells in relation with plant defence. Sous presse.

Publications dans des actes de congrès

2011 C Durand**,** M-L Follet-Gueye, M-A Cannesan, B plancot, **F Dardelle**, S Bernard, M Vicré-Gibouin, A Driouich. Les cellules bordantes de la racine chez *Arabidopsis thaliana* : Formation, caractérisation et rôle dans la santé de la plante. AFPP-4ème conférence internationale sur les métodes alternatives en protetion des culture, **8-10 Mars 2011**, Lille, France.

Communications orales

2011 **F Dardelle,** A Lehner, C Rihouey, M Bardor, P Lerouge, A Driouich, JC Mollet. Structural characterization of pollen tube xyloglucan in *Nicotiana tabacum*. RFP – Réseau Français des Parois, **6-7 juin 2011**, Lille, France.

2010 **F Dardelle,** A Lehner, Y Ramdani, O Soret-Morvan, M Bardor, P Lerouge, A Driouich, JC Mollet. Sexual reproduction in plants: role of the cell wall in adhesion. 2ème journée du Grand réseau de recherche VATA, **le 15 Octobre 2010**, Mont Saint Aignan, France.

2010 **F Dardelle,** A Lehner, Y Ramdani, M Bardor, P Lerouge, A Driouich, JC Mollet. The pollen tube cell wall: a microscopic and biochemical characterization. Plant biology, ASPB-CSPP, symposium Pollen biology, **31 juillet au 4 août 2010**, Montréal, Canada.

2010 **F Dardelle,** A Lehner, Y Ramdani, M Bardor, P Lerouge, A Driouich, JC Mollet. The pollen tube cell wall: a microscopic and biochemical characterization. 13ème journée de l'Ecole doctorale Normande, Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE), les **11 et 12 mai 2010**, Deauville, France.

2009 **F Dardelle,** A Lehner, M Bardor, ML Follet-Gueye, A Driouich, JC Mollet. La génétique chimique: Emergence d'une nouvelle technologie et application au contrôle de la reproduction des plantes. 1ère journée du Grand réseau de recherche VATA, **le 6 Novembre 2009**, Mont Saint Aignan, France.

2009 A Driouich, C Durand, M-A Cannesan, **F Dardelle**, G Percoco, T Boudjeko, M Vicré-Gibouin. Root of border cells and border-like cells in plant health and development. Culture et valorization des resources et applications biotechnologiques dans les regions arides et sahariennes. 14-18 décembre 2009, Djerba, Tunisie.

2009 **F Dardelle,** R Ngoula Finassi, A Lehner, M Bardor, ML Follet-Gueye, A Driouich, JC Mollet. Extracellular matrix characterization of *in vitro* grown *Arabidopsis thaliana* pollen tubes. 8ème colloque national de la Société Française de Biologie Végétale (SFBV), **8 – 10 juillet 2009**, Strasbourg, France.

2008 M Vicré-Gibouin, C Durand, **F Dardelle**, M-A Cannesan, E Nguema-Ona, C santaella, A Driouich. Arabinogalactan proteins in root cells. Workshop in plant biology – The extracellular matrix of plant cells: function and dynamics of arabinogalactan-proteins. 15-16 mai 2008, Rouen, France

Communications par affiches

2010 **F Dardelle,** A Lehner, Y Ramdani, M Bardor, P Lerouge, A Driouich, JC Mollet. The pollen tube cell wall: a microscopic and biochemical characterization. Cell wall meeting, **25-30 juillet** 2010, Porto, Portugal

2009 **F Dardelle,** R Ngoula Finassi, A Lehner, M Bardor, ML Follet-Gueye, A Driouich, JC Mollet. Extracellular matrix characterization of *in vitro* grown *Arabidopsis thaliana* pollen tubes. 15ème journée scientifique de l'IFRMP23, **le 5 juin 2009**, Mont Saint Aignan, France.

Encadrements

↳ 1 étudiant en 2ème année de BTS

↳ 3 étudiants de licence 3ème année

Formations

Appareils

MALDI-TOF : *voyager DE-Pro MALDI-TOF MS - Applied Biosystems*

Cryotome : *cryomicrocut 3050S - Leica*

Chromatographie en phase gazeuse : *GC 3800 - Varian*

Knife-Maker - *Leica*

Ultramicrotomie - *Ultracut EM-UC6*

Microscopie électronique à transmission : *Tecnai 12 Bio-Twin - Philips*

Microscopie classique (doirt ou inversé) - *Leica*

Séminaires

Mener sa thèse comme un projet

Carrière et management 1 & 2

Animer et conduire une réunion

Ecole thématique CNRS : *Les enjeux du criblage en 2010*

Participation à la vie des institutions

✓ Co-Fondateur et ancien Vice-président de l'Association étudiante ONCPA de la faculté des Sciences & Techniques de l'Université de Rouen.
✓ Vice-président puis Président de l'Association des Docteurs et Doctorants de Normandie (ADN) à l'Université de Rouen.
✓ Elu représentant des étudiants, doctorants et post-doctorants au sein du conseil du laboratoire EA4358 (2009-).
✓ Elu représentant doctorants au sein du conseil de l'école doctorale EdNBISE 497 (2010-2011).
✓ Elu représentant des étudiants de Master au sein du conseil du département de biologie (2007-2008) de l'Université de Rouen.
✓ Co-organisateur de 2 journées de l'école doctorale NBISE et de 2 journées du Réseau BIOTechno.