



**HAL**  
open science

## Organisation du phloème et analyse fonctionnelle des protéines PP2

Thibaud Cayla

► **To cite this version:**

Thibaud Cayla. Organisation du phloème et analyse fonctionnelle des protéines PP2. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112401 . tel-00856147

**HAL Id: tel-00856147**

**<https://theses.hal.science/tel-00856147>**

Submitted on 30 Aug 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITE PARIS-SUD – UFR des Sciences**

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL**

## **Thèse**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD**

Discipline: Sciences du végétal

Par

**Thibaud CAYLA**

# Organisation du phloème et analyse fonctionnelle des protéines PP2

Soutenance prévue le **21 décembre 2012**, devant le jury d'examen:

Véronique BRAULT  
Jean François BRIAT  
Sylvie DINANT  
Michel DRON  
Rémi LEMOINE  
Philippe SIMIER

Directeur de recherche INRA, Colmar - Examinatrice  
Directeur de recherche CNRS, Montpellier - Rapporteur  
Chargée de recherche INRA, Versailles – directrice de thèse  
Professeur et directeur de l'IBP, Orsay - Examineur  
Directeur de recherche CNRS, Poitiers - Examineur  
Professeur et directeur du LBPV, Nantes - Rapporteur



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier : Jean François Briat, Philippe Simier, Véronique Brault, Michel Dron et Rémi Lemoine pour leur présence dans mon jury de thèse,

Samantha Vernhettes et Jean-Christophe Palauqui, pour avoir accepté d'être rapporteurs lors de mes exposés de début et de mi-thèse,

Béatrice Satiat-Jeunemaitre Denis Renard et Frédéric Revers pour leur participation lors de mes comités de thèse,

Mon encadrante, Sylvie Dinant, pour toute l'aide qu'elle a pu m'apporter lors de cette thèse,

Toute l'équipe PATS, actuelle et passée : Laurence Bill, pour son aide au quotidien et son phrasé inimitable, Françoise Vilaine, puits de science en biologie moléculaire, à qui je dois de nombreuses découvertes musicales, Rozenn Le Hir, pour son dynamisme et son énergie, Nelly Wolff, pour toute l'aide qu'elle a pu m'apporter en microscopie, Catherine Bellini, pour ses conseils avisés, Lara Spinner, pour sa bonne humeur, qu'elle a pu distiller au laboratoire pendant un an et demi, et Thomas Lemaitre, qui m'a encadré lors de mon stage de master 2.

Les serristes, sans qui aucune de nos plantes n'auraient pu voir le jour : Patrick Grillot, Bruno Letarnec et Hervé Ferry.

L'équipe ViVe à Colmar, pour son accueil lors des expériences de doubles hybride : Sylvaine Boissinot et Véronique Brault,

Denis Renard, Emilie Perrin et Véronique Sole, qui travaillent sur les protéines PP2 recombinantes à Nantes,

Lionel Gissot, et Olivier Grandjean, pour leur aide au microscope confocal.

Toutes les personnes qui m'ont soutenu lors de ma thèse.

## Sommaire

<b>Sommaire</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>9</b>
<b>Abréviation &amp; Acronymes</b> .....	<b>10</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>I. Anatomie du phloème</b> .....	<b>17</b>
I.1 Les cellules compagnes .....	17
I.2 Les cellules des tubes criblés.....	17
I.3 Le parenchyme phloémien .....	19
I.4 La mise en place du phloème.....	19
I.4 Méthodes d'observation du phloème.....	22
<b>II. La composition de la sève</b> .....	<b>23</b>
II.1 Sucres et autres métabolites .....	23
II.2 Hormones .....	25
II.3 Ions.....	25
II.4 Protéines.....	26
II.5 ARN .....	27
<b>III. Physiologie du phloème</b> .....	<b>28</b>
III.1 Transport des sucres .....	28
III.1.1. Chargement du phloème en sucre .....	28
III.1.2. Transport par flux de masse et modèle de Münch.....	30
III.1.3. Déchargement du phloème .....	30
III.2 Transport de macromolécules.....	31
III.2.1. Exemples de macromolécules agissant à longue distance .....	31
a) Protéine agissant à longue distance: Le cas du florigène (FT) .....	31
b) ARNm agissant à longue distance: Le cas de BEL5.....	33
III.2.2. Les étapes du transport de macromolécules dans le phloème.....	33
III.2.3 Modèles de transport de cellule-à-cellule.....	35
a) Transport par un mécanisme d'adressage .....	35
b) Transport par « shuttling » .....	35
III.2.4. Modèles de transport à longue distance .....	36
III.3 Analyse fonctionnelle du phloème.....	37
III.3.1 Mutants affectés dans la mise en place des tissus vasculaires et du phloème .....	37
III.3.2 Mutants affectés dans le transport de métabolites .....	39
III.3.3 Mutants affectés dans la signalisation.....	39
<b>IV. Les protéines spécifiques des tubes criblés</b> .....	<b>41</b>
IV.1 Les protéines P.....	41
IV.1.1 Les protéines P chez <i>Cucurbita maxima</i> .....	42
a) Les protéines PP1 chez <i>Cucurbita maxima</i> .....	42
b) Les protéines PP2 chez les Cucurbitacées.....	42
IV.1.2 Les protéines SEO et SEO-like.....	43
a) Les protéines SEO chez les Fabacées .....	45
b) Les protéines SEO chez les autres Dicotylédones .....	45
IV.1.3 Hypothèses sur le rôle des protéines P dans le phloème.....	46
IV.2 Les lectines PP2 .....	47
IV.2.1 La famille des PP2 chez les Angiospermes .....	47
IV.2.2 Les protéines PP2 d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	47
IV.2.3 La protéine PP2-A1.....	49
IV.2.4 La protéine PP2-A2.....	49
IV.3. Autres familles remarquables .....	51
IV.3.1 Les RTM .....	51
IV.3.2 RCI2A .....	51
IV.3.2 NHL26.....	52
<b>V. Objectifs de la thèse</b> .....	<b>52</b>

<b>Chapitre 1</b> .....	<b>55</b>
<b>I. Cytologie du phloème: vers une description détaillée de son organisation subcellulaire in vivo</b> .....	<b>57</b>
I.1 Le promoteur <i>SUC2</i> , un outil précieux pour l'observation du phloème.....	59
I.2 Quelques colorants pour l'observation du phloème .....	59
<b>II. Création de matériel biologique pour l'observation du phloème</b> .....	<b>61</b>
II.1 Objectifs.....	61
II.2 Plantes transgéniques utilisées et créées:.....	61
<b>III. Description des cellules du phloème au moyen de protéines étiquetées avec des marqueurs fluorescents</b> .....	<b>61</b>
III.1 Observation du phloème dans la racine .....	63
III.1.1. Méthodes d'observation.....	63
III.1.2. Localisation de différents marqueurs subcellulaires .....	63
a) Observation de la GFP soluble sous le contrôle d'un promoteur spécifique des CC .....	63
b) Observation de la protéine de fusion mCitrine-RCI2A .....	65
c) Observations de PP2-A1:GFP .....	67
d) Les protéines SEOR1 et SEOR2 dans la racine .....	67
III.2 Observation du phloème dans la feuille .....	69
III.2.1. Mise au point d'une technique pour l'observation de la feuille .....	69
a) Observation, sans peeling préalable, de phloème de feuille chez <i>Arabidopsis</i> .....	69
b) La préparation de feuilles d' <i>Arabidopsis</i> .....	71
III.2.1. Observation de protéines fluorescentes dans le phloème de feuille après peeling .....	73
a) Observation de GFP soluble dans le phloème.....	73
b) Observation de la protéine de fusion mCitrine-RCI2A.....	73
c) Observation de PP2-A1 et PP2-A2 dans le complexe cellules compagnes - cellules criblées .....	75
d) Les protéines SEOR dans les tubes criblés de feuilles .....	79
e) RTM1 et RTM2, des protéines localisées dans les tubes criblés .....	79
f) Observations des plasmodesmes dans le phloème .....	81
g) Observation de <i>NHL26</i> dans le phloème .....	83
<b>IV. Adaptation de colorants vitaux pour la visualisation du phloème</b> .....	<b>83</b>
IV.1.1 Caractéristiques des différents colorants utilisés .....	85
IV.1.2 Utilisation dans l'étude des cellules du phloème.....	85
a) Visualisation du chargement du phloème avec du 5,6 CFDA.....	85
b) Visualisation des plages de cribles des tubes criblés avec le Bleu d'aniline .....	86
c) Visualisation des membranes avec le FM4-64.....	86
d) Visualisation des systèmes endomembranaires avec le DiOC <sub>6</sub> .....	87
e) Visualisation d'organites dans les cellules criblées avec le MitoTracker Red .....	89
<b>V. Publication N°1</b> .....	<b>90</b>
<b>VI. Conclusions et discussion</b> .....	<b>128</b>
<b>Chapitre 2</b> .....	<b>135</b>
<b>Analyse de mutants dérégulés pour PP2-A1</b> .....	<b>137</b>
<b>I Introduction</b> .....	<b>137</b>
I.1 Les lignées dérégulées pour l'expression de <i>PP2-A1</i> et <i>PP2-A1</i> déjà disponibles .....	137
I.1.1. Mutants d'insertions .....	137
I.1.2. Lignées RNAi dérégulées pour <i>PP2-A1</i> .....	139
I.1.3. Lignées surexprimant <i>PP2-A1</i> et <i>PP2-A2</i> .....	140
I.2 Bilan de l'analyse de ces lignées.....	141
I.3 Nouvelles stratégies envisagées pour la dérégulation de <i>PP2-A1</i> et de <i>PP2-A2</i> .....	141
<b>II Résultats</b> .....	<b>141</b>
II.1 Analyse des lignées dérégulées par des microARN artificiels.....	141
II.1.1 Principe des techniques de RNAi et de microARN artificiel.....	143
II.1.2 Création de microARN artificiels .....	143
II.1.3 Clonage des microARN artificiels.....	145
II.1.4 Caractérisation phénotypique et moléculaire des lignées amiRNA.....	145
II.1.5 Conclusions.....	147
II.2 Analyse des lignées exprimant <i>PP2-A1:CFP</i> et <i>PP2-A2:YFP</i> .....	149

II.2.1 Origine des croisements .....	149
II.2.2 Phénotype des plantes des lignées <i>pSUC2A1:CFP</i> et <i>pSUC2A2:YFP</i> .....	151
II.2.3 Analyse du phénotype du croisement <i>PP2-A1:CFP</i> x <i>PP2-A2:YFP</i> .....	151
II.2.3.1 Description générale .....	151
II.2.3.2 Effet sur la biomasse .....	153
II.2.3.3 Effet sur la dimension des cellules dans différents organes .....	157
II.2.3.4: Dimensions des graines .....	159
II.2.4 Analyse d'autres croisements .....	159
II.2.5 Conclusions .....	160
<b>III Discussion .....</b>	<b>161</b>
<b>Chapitre 3 .....</b>	<b>167</b>
<b><i>Résultats complémentaires: recherche de partenaires de PP2-A1 et PP2-A2 et production de protéines recombinantes</i> .....</b>	<b>169</b>
<b>I Objectifs .....</b>	<b>169</b>
<b>II Recherche de partenaires protéiques de PP2-A1 et PP2-A2 .....</b>	<b>171</b>
II.1 Clonage de PP2-A1 et PP2-A2 dans les vecteurs de levures .....	171
II.2 Réalisation du criblage double hybride .....	173
II.3 Réalisation des tests d'auto-association de PP2-A1 et PP2-A2 .....	178
II.4 Conclusion .....	179
<b>III Production de protéines PP2-A1 et PP2-A2 tronquées recombinantes .....</b>	<b>181</b>
III.1 Clonage des formes tronquées de PP2-A1 et PP2-A2 .....	183
III.2 Production de protéines recombinantes .....	187
III.3 Conclusion .....	187
<b>IV Discussion .....</b>	<b>189</b>
<b>Discussion générale .....</b>	<b>191</b>
<b>Compléments de Matériels et méthodes .....</b>	<b>197</b>
<b>I Clonage des microARN artificiels .....</b>	<b>199</b>
<b>II. Q RT PCR .....</b>	<b>201</b>
<b>III. Protocoles usuels pour réaliser les clonages .....</b>	<b>203</b>
III.1 Digestion par des enzymes de restriction .....	203
III.2 Déphosphorylation des plasmides .....	203
III.3 Ligation entre un insert et un plasmide .....	203
<b>IV. Conditions de culture des plantes .....</b>	<b>204</b>
<b>V. Matériels .....</b>	<b>204</b>
V.1 Matériel végétal .....	204
V.2 Souches de bactéries et de levures .....	205
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>207</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>221</b>
<b>Cartes des vecteurs utilisés lors de la thèse .....</b>	<b>222</b>

## Liste des figures.

Figure 1: Premières illustrations de tissus vasculaires réalisées par Hartig, en 1837 .....	12
Figure 2: Allocation des photoassimilats par le phloème au cours du cycle d'une plante.....	14
Figure 3: Représentation schématique de l'organisation des tissus vasculaires dans la tige .....	14
Figure 4: Vue transversale du phloème dans une nervure chez <i>Arabidopsis</i> .....	16
Figure 5: Vue longitudinale de phloème dans une veine chez <i>Arabidopsis</i> .....	16
Figure 6: Image d'une plage de crible dans un tube criblé de <i>Cucurbita maxima</i> .....	18
Figure 7: Image en vue transversale d'un tube criblé chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
Figure 8: Représentation schématique des étapes de différenciation des tubes criblés .....	20
Figure 9: Différents modèles de transport de macromolécules de cellule à cellule .....	32
Figure 10: Modèle représentant le mécanisme de « shuttling » nucléocytoplasmique d'une protéine glycosylée.....	34
Figure 11: Structure des forisomes, corps cristalloïdes des tubes criblés, chez <i>Vicia faba</i> .....	40
Figure 12: Structure en filaments des protéines P chez <i>Cucurbita maxima</i> .....	40
Figure 13: Dilatation et contraction du forisome en réponse à la blessure .....	44
Figure 14: Morphologie des protéines P chez <i>Arabidopsis</i> .....	44
Figure 15: Modèle de la structure tridimensionnelle de PP2-A1 .....	48
Figure 16: Modèle de structure tridimensionnelle de PP2-A2 .....	48
Figure 17: Observation en microscopie électronique à transmission d'une coupe longitudinale d'un élément criblé différencié.....	56
Figure 18: Profil d'expression du gène SUC2 dans les feuilles d' <i>Arabidopsis</i> .....	56
Figure 19: Marquage du phloème avec un traceur symplasmique le 5,6 CFDA.....	58
Figure 20: Observation de la diffusion de la GFP dans la pointe racinaire de lignées pSUC2:GFP ..	62
Figure 21: Comparaison de la fluorescence et de la diffusion de la GFP dans la racine de différentes lignées pSUC2:GFP .....	64
Figure 22: Observation du phloème dans la racine d'une lignée pSUC2:mCitrine:RCI2A .....	64
Figure 23: Observation du phloème dans la racine d'une lignée pSUC2:PP2-A1:GFP .....	66
Figure 24: Observation du phloème dans la racine d'une lignée pSEOR2:SEOR2:GFP.....	66
Figure 25: Observation du phloème dans la feuille d'une lignée pSUC2:PP2-A1:GFP sans peeling ..	68
Figure 26: Coupe transversale de feuille d' <i>Arabidopsis</i> illustrant la profondeur du tissu phloémien. 70	
Figure 27: Feuille d' <i>Arabidopsis</i> d'une plante âgée de 6 semaines avant préparation pour l'observation en microscopie confocale. ....	70
Figure 28: Observation d'une feuille d' <i>Arabidopsis</i> mature après préparation pour observation du phloème .....	70
Figure 29: Observation de la diffusion de la GFP dans le phloème dans la feuille de deux lignées pSUC2:GFP .....	72
Figure 30: Observation du phloème dans la feuille d'une lignée pSUC2:mcitrine-RCI2A.....	74
Figure 31: Expression relative de PP2-A1 et de SUC2 au cours du développement de la plante .....	74
Figure 32: Observation de PP2-A1:GFP dans les cellules compagnes et dans les tubes criblés. ....	76
Figure 33: Observation de PP2-A2 YFP dans les cellules compagnes de feuille.....	76
Figure 34: Observation du phloème dans la feuille d'une lignée pSEOR2:SEOR2:GFP .....	78
Figure 35: Observation des filaments de SEOR2:GFP dans les tubes criblés matures .....	78
Figure 36: Observation des tubes criblés dans la feuille de lignées GFP:RTM1 et RTM2:GFP.....	80
Figure 37: Observation de la répartition des plasmodesmes dans le phloème de feuille d'une lignée exprimant p35S:PDLP:GFP .....	80
Figure 38: Observations de NHL26:GFP dans le phloème de feuille .....	82
Figure 39: Détails de la localisation de NHL26:GFP .....	82
Figure 40: Identification de tubes criblés par une coloration de la callose des plages de cribles.....	84
Figure 41: Observation des membranes dans les cellules de phloème avec le FM4-64 .....	84
Figure 42: Coloration des systèmes endomembranaires des cellules de phloème avec le DiOC <sub>6</sub> .....	88
Figure 43: Observation de mitochondries dans les cellules du phloème.....	88

Figure 44: Schéma récapitulatif de l'organisation des 3 types cellulaires du phloème chez <i>Arabidopsis</i> .	131
Figure 45: Observation d'un élément criblé en cours de différenciation	134
Figure 46: Représentation schématique des sites d'insertion des mutants disponibles pour PP2-A1 et PP2-A2	136
Figure 47: Analyse phénotypique des plantes exprimant un RNAi ciblant PP2-A1 au stade <i>in vitro</i> 4 jours après semis et cultivés en serre à 4 semaines	138
Figure 48: Représentation schématique de la localisation des séquences ciblées par les microARN artificiels sur PP2-A1 et PP2-A2	142
Figure 49: Niveau d'expression de PP2-A1 et de PP2-A2 dans des plantes des lignées exprimant des microARN artificiels spécifiques de PP2-A1 ou de PP2-A2	144
Figure 50: Niveaux d'expression relatifs de PP2-A1, PP2-A2 et de SUC2 au cours du développement de la plante	148
Figure 51: Colocalisation de PP2-A1:CFP et de PP2-A2:YFP dans les cellules compagnes dans des feuilles d' <i>Arabidopsis</i>	148
Figure 52: Phénotype des plantes des lignées pSUC2:PP2-A2:YFP et pSUC2:PP2-A1:CFP et de leur croisement, à 6 semaines cultivées en jours longs	150
Figure 53: Comparaison de plantes de type sauvage et du croisement SUR12 de 27 jours, cultivées en jours longs	150
Figure 54: Comparaison de la taille de plantes de type sauvage et du croisement SUR12, à 8 semaines cultivées en jours longs	152
Figure 55: Analyse de la taille et de la forme des feuilles de Col-0 et du croisement SUR12 de plantes cultivées en conditions de jours longs	152
Figure 56: Comparaison de la taille des plantes de type sauvage (WT) et du croisement SUR12, cultivées en condition de jours courts	154
Figure 57: Mesures de biomasse réalisées sur des plantes de type sauvage et SUR12 en jours courts	154
Figure 58: Nombre de feuilles de rosette chez les plantes du croisement SUR12 et de type sauvage au cours de leur développement	155
Figure 59: Observation à la loupe binoculaire et en microscopie optique des coupes transversales de hampe florale de plantes sauvage et de plantes issues du croisement SUR12	155
Figure 60: Mesure de la taille des cellules de xylème et de parenchyme médullaire chez les plantes de type sauvage et du croisement SUR12 et mesure du nombre de cellule par mm <sup>2</sup> dans l'épiderme de feuille	156
Figure 61: Ratio de la surface xylème / phloème	156
Figure 62: Observation de graines de type sauvage et du croisement SUR12 en microscopie électronique à balayage et mesure de la taille de leurs graines	158
Figure 63: Schéma présentant un scénario pour le mode d'action de la voie de signalisation ARGOS/ANT/CYCD3	162
Figure 64: Recherche des partenaires de PP2-A1 par Far Western Blot	168
Figure 65: Principe du système double hybride chez la levure	170
Figure 66: Résultats des tests d'auto-association de PP2-A1 et PP2-A2	176
Figure 67: Prédiction de structure de la séquence primaire de PP2-A1	182
Figure 68: Prédiction de structure de la séquence primaire de PP2-A2	182
Figure 69: Schéma récapitulatif présentant les différentes protéines recombinantes réalisées	186
Figure 70: Résultats de production des formes tronquées de PP2-A1 et PP2-A2 avec un tag histidine	186
Figure 71: Production en système hétérologue de PP2-A1 tronquée fusionnée à la GST	188
Figure 72: Position des amorces utilisées pour cloner les microARN artificiels	198
Figure 73: Carte de pGADT7	222
Figure 74: Carte de pGBKT7	223
Figure 75: Carte du pRS300	224
Figure 76: pH2GW7	224
Figure 77: pH2GW7	225
Figure 78: Carte du pET9 modifié-PP2-A1-HIS	225

<i>Figure 79 : Carte du pGEX 3X (GE Healthcare)</i> .....	226
<i>Figure 80 : Carte du pMDC140 modifié</i> .....	226
<i>Figure 81 : Carte de pGKGWG</i> .....	227
<i>Figure 82 : Carte du pMDC107</i> .....	227
<i>Figure 83 : Carte de pCR II TOPO</i> .....	228
<i>Figure 84 : Carte schématique des vecteurs pGWB et dérivés</i> .....	229

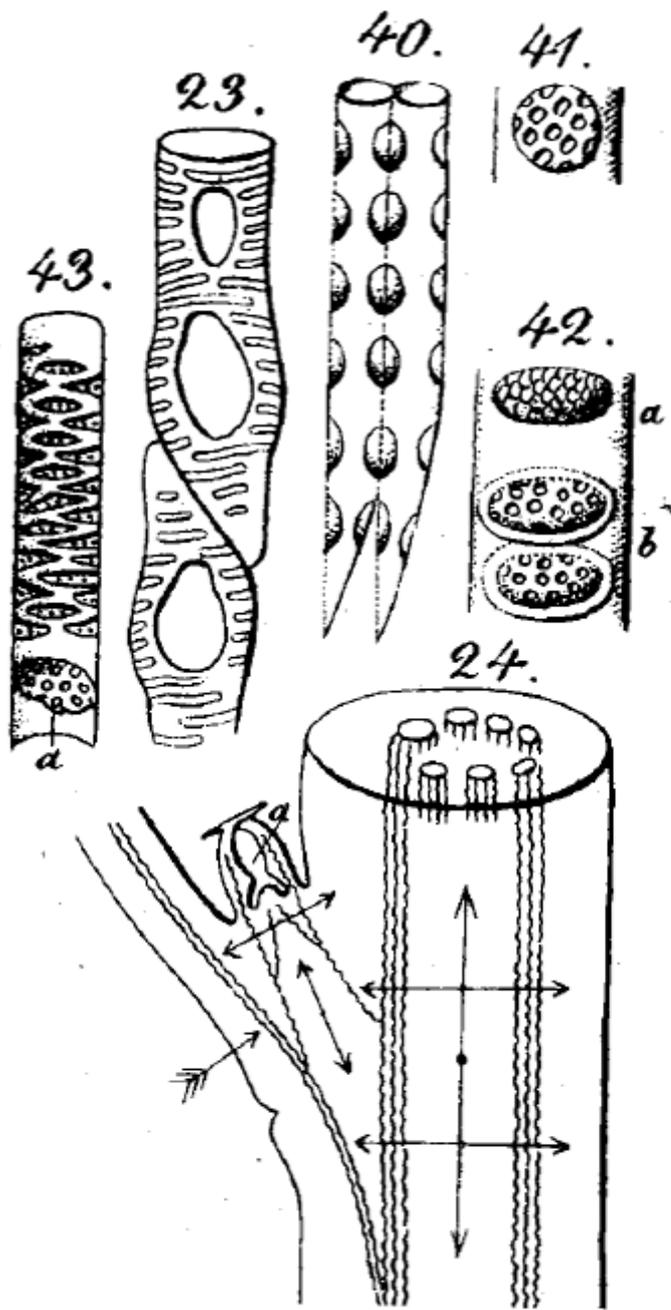
## **Liste des tableaux**

<i>Tableau 1: Meta-analyse de la composition en acides aminés de la sève phloémienne</i> .....	24
<i>Tableau 2: Lignées d'Arabidopsis utilisées exprimant des marqueurs subcellulaires fluorescents</i> .....	60
<i>Tableau 3: Caractéristiques spectrales des protéines fluorescentes utilisées</i> .....	60
<i>Tableau 4: Lignées transgéniques générées dans le cadre de cette étude</i> .....	60
<i>Tableau 5: Récapitulatif des croisements réalisés dans le cadre de cette étude et des caractéristiques phénotypiques des plantes obtenues</i> .....	62
<i>Tableau 6: Caractéristiques des différents colorants utilisés</i> .....	85
<i>Tableau 7: Récapitulatif des lignées d'Arabidopsis existantes, dérégulées pour PP2-A1 ou PP2-A2</i> .....	136
<i>Tableau 8: Séquences spécifiques de PP2-A1 et PP2-A2 ciblés par les microARN artificiels</i> .....	142
<i>Tableau 9: Récapitulatif des lignées microARN artificiel créées</i> .....	146
<i>Tableau 10: Bilan des croisements réalisés entre des lignées surexprimant PP2-A1 et PP2-A2</i> .....	158
<i>Tableau 11: Marqueurs de sélection utilisés dans le système Gold 'Yeast Two-Hybrid' de Clontech</i> .....	170
<i>Tableau 12: Bilan des tests double hybride pour rechercher des partenaires de PP2-A1 et PP2-A2</i> .....	174
<i>Tableau 13: Description des amorces utilisées pour réaliser les clonages de protéines tronquées</i> .....	184
<i>Tableau 14: Plasmides disponibles pour la production de protéines recombinantes PP2-A1 et PP2-A2 chez E. coli</i> .....	184
<i>Tableau 15: Oligonucléotides utilisés pour le clonage des microARN artificiels</i> .....	198
<i>Tableau 16: Vecteurs d'expression utilisés pour réaliser les microARN artificiels</i> .....	200
<i>Tableau 17: Oligonucléotides utilisés en qPCR</i> .....	200
<i>Tableau 18: Caractéristiques des vecteurs utilisés lors de la thèse</i> .....	202
<i>Tableau 19: Caractéristiques des souches de levure et de bactérie utilisées</i> .....	205
<i>Tableau 20 : Récapitulatif des 31 PP2 d'Arabidopsis, avec leur numéro AGI</i> .....	229

## ***Abréviation & Acronymes***

35S: promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque de chou fleur (CaMV)  
3D-SIM: Microscopie à illumination structurée en 3 dimensions.  
*AAP2: amino acid permease 2.*  
ADN: Acide DésoxyriboNucléique  
ADNc: ADN complémentaire  
AGI: *Arabidopsis* Genome Initiative  
*AGO1: Argonaute 1*  
*ANT: Aintegumenta*  
*APL: altered phloem development*  
*ARGOS: Auxin regulated gene controlling organ size*  
ARN: Acide RiboNucléique  
ARNm: ARN messenger  
ARNt: ARN de transfert  
BiFC: Complémentation de fluorescence bimoléculaire  
CC: cellule compagne  
CFDA: Carboxyfluorescéine-diacétate  
CFP: Protéine de fluorescence cyan  
Col-0: accession Columbia d'*Arabidopsis thaliana*  
CoYMV: Commelina Yellow Mottle Virus  
*COX 4: cytochrome c oxidase IV*  
DiOC<sub>6</sub>: 3,3' -dihexyloxacarbo-cyanine iodide  
EDTA: Acide Ethylene Diamine Ttétraacétique  
FABD2: F actin binding domain 2.  
FM4-64: N-(3-triéthylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diéthylamino) phényl) hexatriényl) pyridinium dibromide  
*FT: Flowering locus T*  
GAL4: β-galactosidase 4  
GFP Protéine de fluorescence vert  
GlcNAc: N-AcétyleGlucosamine  
GPI: Glycosylphosphatidylinositol  
GST: Gene Specific Tag  
GST: glutathion S transférase  
H<sub>2</sub>DCFDA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate  
He-Ne: Hélium Néon  
HPTS: Acide 8-hydroxypyrrène 1,3,6 trisulfonique  
HSP: Protéine de choc thermique  
IPTG: Isopropyl β-D thiogalactopyranoside  
*ISII: Impaired sucrose induction 1*  
*LTI6B: Low temperature Induced B ( aussi connu comme RCI2B)*  
MATH: Meprin and TRAF homology  
MBD: Microtubule Binding Domain  
MEB: Microscopie Electronique à Balayage  
MET: Microscopie Electronique à Transmission  
MiRNA: Micro ARN  
MP: protéine de mouvement  
NCAP: Non Cell Autonomous Protein  
*NCAPP1: Non Cell Autonomous Pathway Protein 1*  
*NHL: NDR/HIN 1 Like*

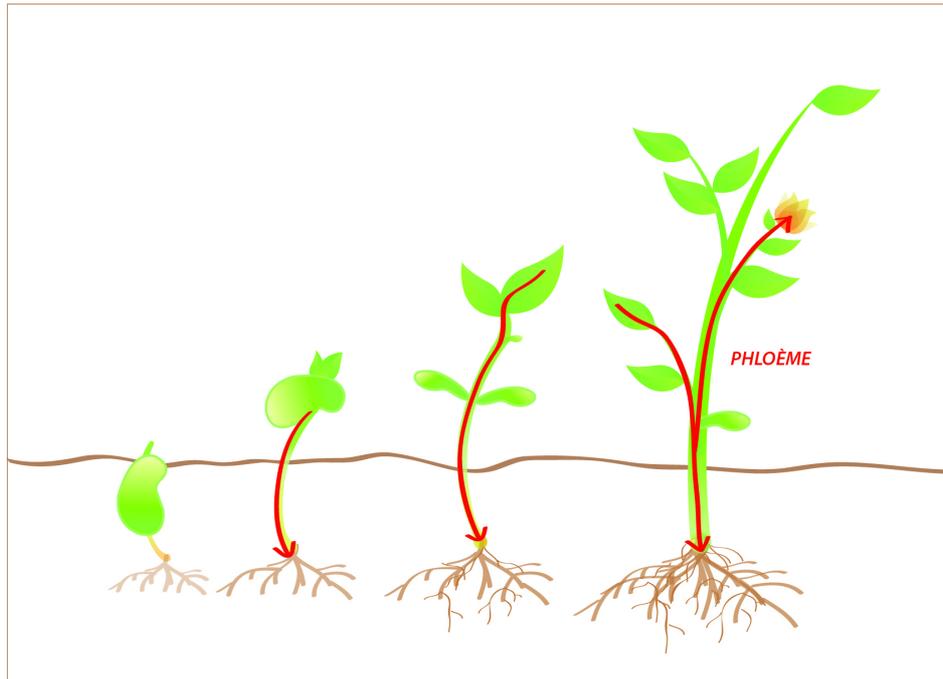
OGA: N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase  
OGT: O-linked N-Acetyl-glucosaminyltransferase  
PCMBs: Acide para-chloromercuribenzosulphonique  
PCR: réaction en chaîne de polymérase  
PD: plasmodesme  
*PDCB1: Plasmodesmata Callose Binding 1*  
*PDL1: Plasmodesmata Located Protein 1*  
pH: potentiel Hydrogène  
PM: membrane plasmique  
*PP1: Phloem Protein 1*  
*PP2: Phloem Protein 2*  
qPCR: RT-PCR quantitative  
*PSRP1: Plastid-specific ribosomal protein 1*  
*RC12A: Rare Cold Inducible 2A*  
RE: Réticulum Endoplasmique  
RIP ChIP: RNA Binding Protein Immunoprecipitation Chromatin Immunoprecipitation  
RFP: protéine de fluorescence rouge  
RNAi: ARN interférent  
RNP: Complexe Ribonucléoprotéique  
RTM: Restricted TEV Movement  
RuBisCO: ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase  
SAXS: Diffusion des rayons X aux petits angles  
SD: Milieu "Selective Dropout"  
*SEC: Secret agent*  
SEO: Sieve Element Occlusion  
SEOR: Sieve Element Occlusion Related  
SER: Sieve element reticulum  
SiRNA: petits ARN interférants  
*SPY: Spindly*  
*SUC2: sucrose transporter 2*  
*SULTR 1.3: sulphate transporter 1.3*  
TC: tube criblé  
TEV: Tobacco Etch Virus  
TIP: Protéine intrinsèque du tonoplaste  
UTR: Untranslated Region  
WMD3: Web MicroRNA Designer 3  
YFP: protéine de fluorescence jaune



**Figure 1: Premières illustrations de tissus vasculaires réalisées par Hartig, en 1837**

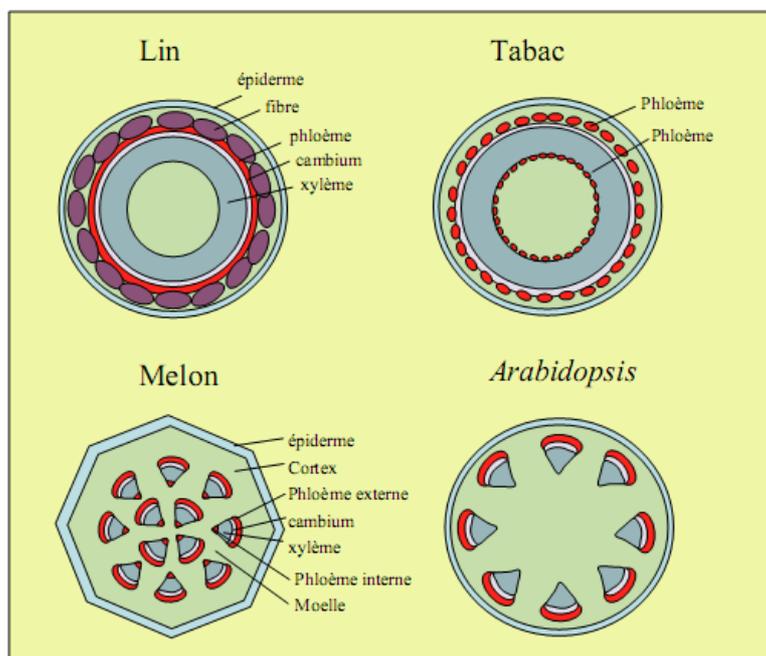
Les premières illustrations de phloème réalisées par Hartig. En 23: Illustration de xylème ; 24: Organisation des tissus vasculaires, 41, 42: Plages de cribles dans des tubes criblés. (Evert, 1990)

# **Introduction**



**Figure 2: Allocation des photoassimilats par le phloème au cours du cycle d'une plante**

Le phloème joue un rôle primordial dans l'apport de photoassimilats des feuilles sources matures, vers les organes puits, les racines et les fleurs. Les besoins de la plante évoluent dans le temps, ce qui implique une régulation fine des échanges de molécules au sein du phloème.



**Figure 3: Représentation schématique de l'organisation des tissus vasculaires dans la tige**

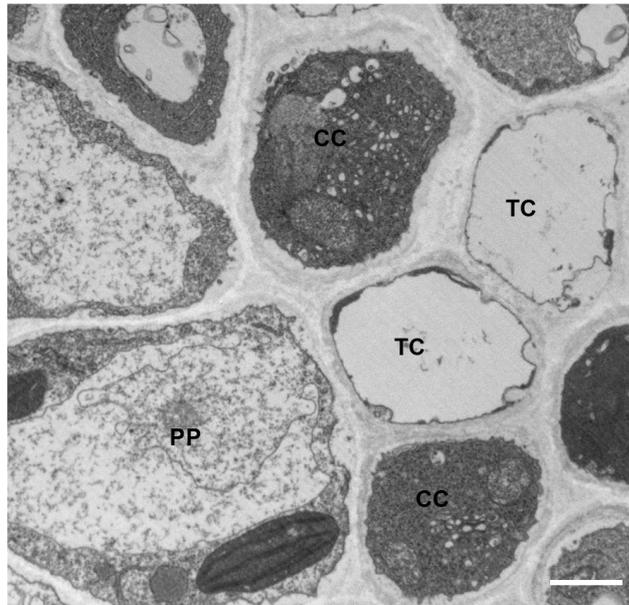
Le système vasculaire de la tige est organisé en faisceaux cribrovasculaires qui sont composés du phloème (en rouge), du cambium (en blanc) et du xylème (en gris bleuté). Chez *Arabidopsis*, le phloème est en position externe. Chez le tabac et le melon, il existe de plus du phloème interne. Chez certaines espèces telles que le lin, les fibres cellulosiques, qui font partie du phloème, sont situées en position externe.

Les plantes sont des organismes multicellulaires fixes et autotrophes qui ont développé différentes stratégies de nutrition et d'adaptation à leur environnement. Au cours de leur évolution, les plantes terrestres ont mis en place des tissus conducteurs afin de permettre le transport des produits issus de la photosynthèse, des éléments assimilés par les racines, et des signaux pour coordonner les différents organes. Ces tissus conducteurs se composent du xylème et du phloème (Figures 2 & 3).

Le xylème permet le transport de la sève brute, composée principalement d'eau et de sels minéraux, des racines vers les parties aériennes. Les cellules du xylème sont lignifiées, ce qui permet à ce tissu d'assurer aussi un rôle mécanique de soutien de la plante. La sève xylémienne circule dans des cellules mortes et lignifiées, les trachéides.

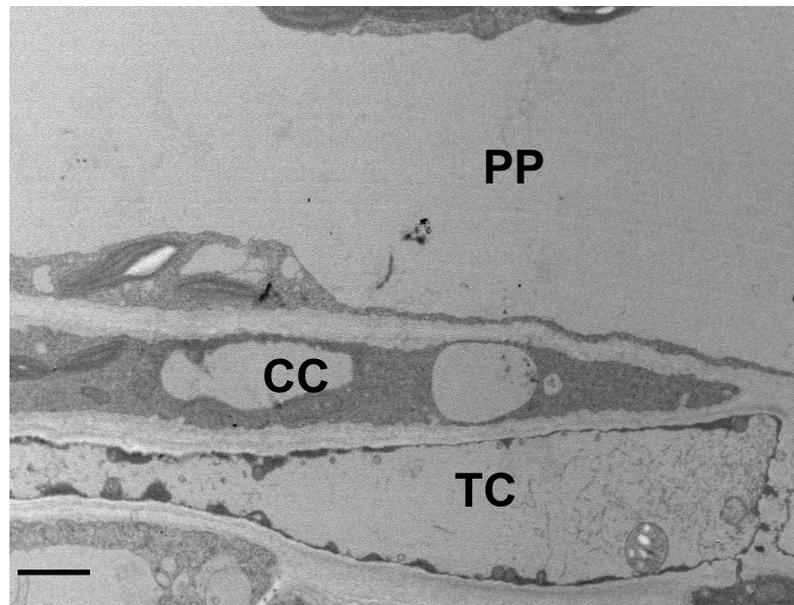
Le phloème permet quant à lui le transport de la sève élaborée, composée de sucres, d'acides aminés et de molécules jouant un rôle de signal. La sève élaborée circule dans des cellules vivantes, les cellules criblées qui, sont non lignifiées. Le flux de sève phloémienne se fait des organes photosynthétiques (i.e. sources) vers les autres organes (i.e. puits). Au cours du développement de la plante, les besoins des organes en nutriments changent, ce qui implique l'existence de mécanismes permettant un ajustement fin de la composition de la sève phloémienne au cours du temps. D'autres classes de molécules (ARN, hormones, protéines) circulent de façon systémique dans le phloème, leur trafic au sein du phloème étant également régulé. Ce tissu constitue une voie de transport privilégiée pour certains agents pathogènes, tels que les virus, et une cible pour la nutrition de certains ravageurs piqueurs-suceurs, tels que les pucerons.

Le phloème, de par son rôle dans la distribution des ressources (nutriments, sucres) et dans l'échange d'informations au sein même de la plante, est un élément indispensable au développement de la plante, à sa croissance et à la coordination entre organes en réponse à des changements de l'environnement. Il exerce un rôle central et intégrateur et c'est pourquoi nous avons voulu nous y intéresser durant cette thèse.



**Figure 4: Vue transversale du phloème dans une nervure chez Arabidopsis**

Observation en microscopie électronique à transmission réalisée sur une veine de feuille d'*Arabidopsis thaliana*, chez une plante âgée de 4 semaines. Vue transversale. Grossissement X10000 (Image ; Brigitte Batailler, INRA, Bordeaux). Les tubes criblés et les cellules compagnes sont les plus petites cellules (quelques microns), alors que les cellules du parenchyme phloémien sont de taille plus importante (une dizaine de microns). TC: tube criblé. PP: parenchyme phloémien et CC: cellule compagne. Echelle: 1 $\mu$ m



**Figure 5: Vue longitudinale de phloème dans une veine chez Arabidopsis**

Observation en microscopie électronique à transmission. Grossissement X3400 (Image ; Brigitte Batailler, INRA, Bordeaux). On constate que la cellule compagne (CC) possède plusieurs vacuoles, et que son cytosol est dense. Dans la cellule criblée (TC), on observe une plage de cribles, avec une accumulation de filaments de protéines P. Le réticulum endoplasmique est collé à la paroi et plusieurs organites y sont ancrés: les mitochondries et les plastides. Echelle: 1 $\mu$ m

## ***I. Anatomie du phloème***

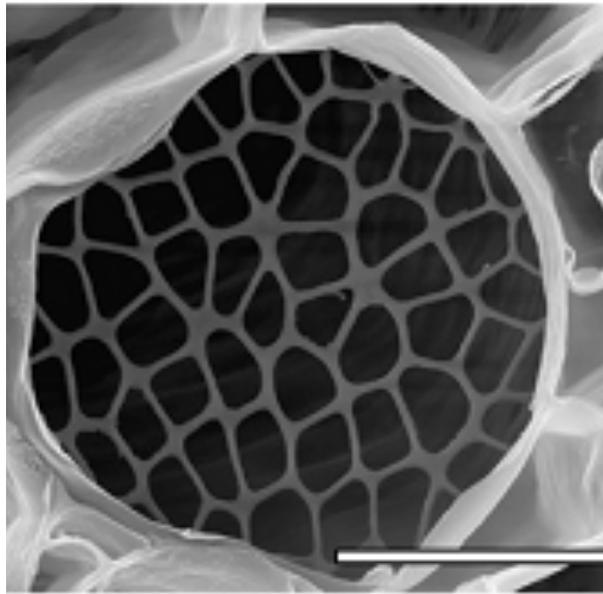
Le phloème est un tissu complexe, composé de trois types principaux de cellules: les cellules compagnes (CC), les cellules criblées et les cellules du parenchyme phloémien (PP) (Figure 4). Certaines espèces possèdent d'autres types cellulaires, pouvant contenir des fibres ou des canaux. Le phloème est situé en profondeur, et se caractérise par des cellules de petite taille. Il représente une très faible part du volume total de la plante (0,4%) (Sjölund, 1997). Le phloème a une organisation le plus souvent collatérale avec le xylème, le phloème étant en position abaxiale et le xylème en position adaxiale. Plusieurs espèces comme le tabac présentent également un faisceau surnuméraire de phloème, en position interne. Certaines espèces présentent une organisation du phloème un peu différente, avec chez *Cucurbita maxima* par exemple, un phloème fasciculaire et un phloème extrafasciculaire, ou encore chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) un phloème qui possède des canaux laticifères (Figure 3).

### **I.1 Les cellules compagnes**

Les cellules compagnes (CC) sont des cellules allongées et de petite taille, de quelques  $\mu\text{m}$  de large chez *Arabidopsis thaliana* à plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$  chez *Cucurbita Maxima* (Dannenhoffer *et al.*, 1997). Ce sont des cellules présentant une forte activité métabolique, elles possèdent de nombreux ribosomes et de nombreuses mitochondries (Figure 5). Leur rôle principal est de charger les tubes criblés en solutés tels que les sucres, qui vont ensuite circuler dans la sève. Les tubes criblés et les cellules compagnes sont le plus souvent reliés entre eux par des plasmodesmes modifiés, appelés plasmodesmes branchus. Les cellules de transfert, qui sont des cellules compagnes qui possèdent de nombreuses invaginations, ne possèdent pas ou peu de plasmodesmes. Un autre rôle des cellules compagnes est d'apporter les éléments indispensables à la survie du tube criblé i.e. énergie, pouvoir réducteur, renouvellement des constituants de la cellule, notamment des protéines. En effet, les CC vont produire de nombreuses protéines qui seront transportées *via* les plasmodesmes branchus vers les cellules criblées (Sjölund 1997).

### **I.2 Les cellules des tubes criblés**

Les cellules criblées sont les cellules dans lesquelles circule la sève. Ce sont des cellules très fortement modifiées. Les files de cellules criblées forment des tubes criblés (TC).



**Figure 6: Image d'une plage de crible dans un tube criblé de Cucurbita maxima**

Observation en microscopie électronique à balayage d'une plage de cribles d'un tube criblé de *C. maxima*. Cette vue en volume permet de mieux appréhender les tubes criblés en tant qu'éléments conducteurs du phloème. Echelle: 20 $\mu$ m. (d'après Mullendore et al., 2010).



**Figure 7: Image en vue transversale d'un tube criblé chez Arabidopsis thaliana**

Observation en microscopie électronique à transmission. On peut apercevoir, autour de la mitochondrie (m), les citernes du réticulum (SER). Dans la lumière du tube criblé, les protéines P (P) On voit la paroi bien épaissie du tube criblé. Grossissement X34000 (Image ; Brigitte Batailler, INRA, Bordeaux)

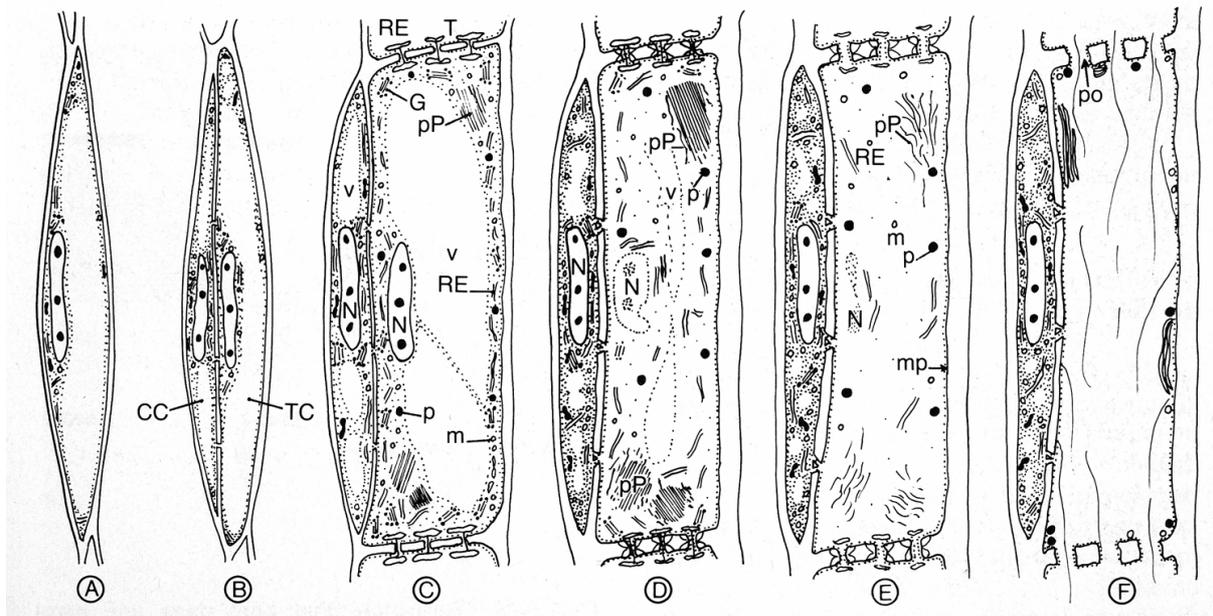
Les cellules criblées sont dépourvues de noyau, de vacuoles, de vésicules golgiennes, de ribosomes et de réticulum endoplasmique rugueux (Evert 1990) (Figure 5). Leur métabolisme dépend de celui des cellules compagnes. La disparition des organites au cours de la différenciation des tubes criblés libère l'espace intracellulaire, ce qui permet, lorsque la différenciation des cellules criblées est terminée, le passage du flux de la sève phloémienne dans la lumière du tube criblé. A la différence des éléments conducteurs du xylème, les tubes criblés forment un syncytium de cellules vivantes, quoique anucléées. Les cellules qui forment un élément conducteur fonctionnel sont séparées entre elles par des plages de cribles, qui sont issues de la modification de plasmodesmes dont les pores se sont élargis, probablement suite à des dépôts importants de callose (Xie *et al.*, 2011) (Figure 6). Ces dépôts de callose seraient concomitants à l'ouverture des pores et au bon fonctionnement du phloème. Chez les dicotylédones, il existe également dans ces cellules des protéines P (pour « Phloem-Protein »), protéines qui forment des agrégats caractéristiques des tubes criblés. Les éléments de réticulum présents dans les cellules criblées, très modifiés, sont plaqués aux membranes, et existent sous différentes formes (Ehlers *et al.*, 2000). Les cellules criblées possèdent également une paroi plus épaisse, souvent décrite comme associée à des épaissements appelés « dépôts nacrés », qui pourraient leur conférer une plus grande résistance physique pour maintenir leur intégrité (Figure 7).

### **I.3 Le parenchyme phloémien**

Le parenchyme phloémien est composé de cellules de plus grande taille (10-15 $\mu$ m chez *Arabidopsis thaliana* que les cellules compagnes ou les tubes criblés. Il serait largement impliqué dans le chargement en sucres des cellules compagnes, ou directement des tubes criblés (Hafke *et al.*, 2005). Ces cellules apparaissent comme étant moins modifiées que les cellules compagnes ou que les tubes criblés. Elles constituent un lieu de stockage, et font l'interface entre les cellules du mésophylle et les complexes CC/TC.

### **I.4 La mise en place du phloème**

Selon le stade de développement de la plante, il existe plusieurs types de phloème, le phloème primaire, issu de la différenciation du procambium et le phloème secondaire, issu de la différenciation du cambium. Le protophloème et le métaphloème se mettent en place dès le



**Figure 8: Représentation schématique des étapes de différenciation des tubes criblés**

*A partir d'une même cellule initiale qui va se diviser, la cellule compagne et l'élément criblé, cellule qui va donner le tube criblé vont ensuite se différencier de façon différente. La cellule criblée va progressivement perdre tous ces organites, puis les plasmodesmes situés dans l'axe longitudinal vont s'élargir pour former des pores, qui finiront par s'ouvrir pour laisser passer le flux de sève. CC: cellule compagne. TC: tube criblé. RE: réticulum endoplasmique. N: noyau. p: plastides. m: mitochondrie. pP: protéines P. v: vacuole. Po: pore. Mp: membrane plasmique. (D'après Atlas de biologie Végétale, Roland et al.2008)*

début de la vie de la plante, alors que le phloème secondaire se met en place plus tardivement. Lors de l'embryogénèse vont être mises en place les files de procambium. Ces cellules de procambium se divisent de façon latérale après germination, au cours des premières heures de développement. Selon la position des cellules issues de ces divisions, à savoir leur distance par rapport au méristème et leur moment d'apparition pendant l'embryogénèse, les cellules seront des initiales du protophloème ou du métaphloème. L'acquisition de l'identité cellulaire de ces cellules implique des hormones comme l'auxine et les cytokinines, relayées par des facteurs de transcription (*MONOPTEROS (MP)*, *CLAVATA-ENDOSPERM 1(CLE1)* ou *PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (PXY)* (Caño-Delgado *et al.*, 2010). D'autres facteurs de transcription (*ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT (APL)* et *VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN (VND)*) sont aussi impliqués dans la différenciation des cellules issues du procambium en cellules de xylème ou de phloème. Plus tardivement durant le développement de la plante, les initiales du protophloème vont donner des cellules de protophloème, que l'on retrouve dans les cotylédons et au niveau de la pointe racinaire. Le protophloème est dépourvu de cellules compagnes mais il est constitué de tubes criblés fonctionnels. Les initiales du métaphloème issues du procambium vont quant à elles donner au niveau des faisceaux cribrovasculaires, après des divisions successives, les cellules du métaphloème: les cellules compagnes et les cellules criblées. Ces deux types cellulaires sont issus d'une même cellule, ayant subi une division asymétrique (Figure 8). La cellule criblée va ensuite se différencier par un mécanisme de mort cellulaire semi-programmée. Le noyau, l'appareil de golgi, et les ribosomes disparaissent. Le réticulum subit aussi de profondes modifications: il y a apparition de nombreuses citernes empilées à proximité de la membrane plasmique des tubes criblés, et le réticulum forme ainsi un réseau pariétal dans le tube criblé mature (Evert, 1990). Les mitochondries et les plastes sont ancrés au RE par des structures qui restent à caractériser (Froelich *et al.*, 2011). Les plastes présents dans les tubes criblés matures sont très modifiés. Chez les dicotylédones, on retrouve deux types de plastes, des plastes de type S, qui ne contiennent que de l'amidon, et des plastes de type P, qui contiennent des protéines et de l'amidon. Il n'y pas de cytosquelette organisé dans une cellule criblée différencié, même si des analyses de protéome de sève phloémienne ont montré qu'il pouvait y avoir de l'actine (Lin *et al.*, 2009). Les vacuoles sont lysées pendant la différenciation. D'autre part, les plasmodesmes présents dans l'axe longitudinal du TC s'agrandissent progressivement pour former des pores. Il a été montré que la callose pouvait avoir un rôle dans l'agrandissement de ces pores (Xie *et al.*, 2011). Les plasmodesmes connectant les CC et les TC sont également fortement modifiés, et acquièrent une structure plus complexe, les

plasmodesmes branchus. Les tubes criblés présents dans le métaphloème ont des durées de vie différentes selon les espèces, chez certains palmiers, elle peut aller jusqu'à plusieurs décennies (Parthasarathy, 1974).

#### **I.4 Méthodes d'observation du phloème**

Les premières observations de phloème ont été réalisées par le botaniste allemand Theodor Hartig au XIX<sup>ème</sup> siècle, avec l'avènement de la microscopie optique (Figure 1). Ses observations, réalisées sur le phloème des arbres, lui ont permis de décrire deux types de tissus: les fibres et les tubes criblés. En 1854, Hartig continua ses études sur le phloème de Cucurbitacées et réalisa les premières observations de tubes criblés, de plages de cribles et d'accumulation de protéines P (appelées « slime bodies »). Quelques années plus tard, en 1858, c'est le botaniste suisse Nägeli qui sera le premier à introduire les termes de xylème et de phloème. Quant aux premières observations de cellules compagnes, elles seront réalisées en 1880 par Wilhelm. Afin de visualiser le phloème, plusieurs colorations ont été utilisées, les premières observations de la callose au niveau des plages de cribles ont été faites grâce au bleu d'aniline en 1881 par Russow. Dans les années 60, Katherine Esau et James Cronshaw réalisèrent de très nombreuses observations de phloème en microscopie électronique à transmission (MET), permettant ainsi de révéler les structures fines comme les plastes, les mitochondries, les plages de cribles et leur amas de callose, les protéines P du phloème, que l'on retrouve sous différentes formes selon les espèces. L'une des premières utilisations de la microscopie confocale à balayage laser pour observer des cellules de phloème date de 1998, chez *Vicia faba* (Knoblauch & van Bel, 1998) et l'utilisation de cette technique reste surtout limitée à quelques espèces comme *Vicia faba* ou les Cucurbitacées. Une autre technique d'imagerie, également très délicate, mais qui permet d'avoir des données fonctionnelles sur les vitesses de flux dans le phloème, est l'imagerie à résonance magnétique (Windt *et al.*, 2006). Elle ne s'applique pour l'instant qu'à certaines espèces présentant des diamètres de tissus vasculaires importants (espèces ligneuses, tomate, haricot ou maïs par exemple). Récemment, l'équipe de Michael Knoblauch a mis au point une méthode d'observation des tubes criblés en microscopie à balayage (MEB) permettant d'observer les structures en volume (Mullendore *et al.*, 2010). Toujours en 2010, l'équipe de Karl Oparka a réalisé des observations par microscopie à illumination, structurée en 3 dimensions (3D-SIM) de phloème, permettant de visualiser les plages de cribles en fluorescence avec une précision

jamais égalée en microscopie optique (Fitzgibbon *et al.*, 2010). Le problème principal de la microscopie électronique résulte des possibilités d'artefacts lors de la préparation des échantillons observés. Le phloème étant un tissu profond, il est difficile à fixer sans occasionner de réponse de blessure. En 2011, Froelich et collaborateurs ont mis au point des techniques de fixation des tissus phloémiens permettant de réduire ces artefacts (Froelich *et al.*, 2011). Ces techniques permettent de voir des petites structures et sont donc adaptées à l'observation fine du phloème. A l'inverse, la microscopie confocale ne permet pas de voir l'organisation subcellulaire de petites cellules, mais cette technique peut être appliquée à des tissus vivants, nécessitant beaucoup moins de préparation. C'est pourquoi pour l'observation du phloème, jusqu'à présent, les principales espèces observées en microscopie optique et confocale sont des espèces ayant des tissus phloémiens présentant un diamètre important.

## ***II. La composition de la sève***

Les principaux rôles du phloème sont le transport des sucres, des macromolécules (ARN, protéines), des acides aminés, des hormones et des molécules jouant un rôle de signal depuis les organes sources, notamment les feuilles photosynthétiques, vers les organes puits: les organes en formation, les racines, les fleurs et les fruits.

### **II.1 Sucres et autres métabolites**

La sève du phloème est aussi appelée « sève élaborée », ce nom est dû au fait que c'est elle qui contient les sucres résultant de la photosynthèse. Le principal sucre transporté dans le phloème est le saccharose, que l'on retrouve à des concentrations différentes selon les espèces, pouvant aller de 0,5 à 1 M (Dinant, 2008). C'est un composé que l'on retrouve dans le phloème de toutes les espèces (Lalonde *et al.*, 2003). Pourtant chez certaines espèces, on retrouve aussi des sucres-alcool, comme le mannitol et le sorbitol. Chez d'autres on retrouve des sucres plus complexes comme le raffinose et le stachyose (Turgeon & Wolf, 2009). Notons également l'absence de sucres réducteurs tels que le glucose et le fructose (Liu *et al.*, 2012).

La plupart des acides aminés sont également transportés dans la sève phloémienne, ce qui constitue un mode de transport des composés azotés. La concentration totale des acides aminés serait comprise entre 100 et 200 mM selon les espèces (Lalonde *et al.*, 2004). Les acides

**Tableau 1: Meta-analyse de la composition en acides aminés de la sève phloémienne.**

	% composition			Conc. (mM) <sup>c</sup>
	Exsudat	sève	moyenne	
Alanine	6.37 ± 2.95 <sup>d</sup>	4.76 ± 3.95	5.59 ± 3.52	8.39
Arginine	1.58 ± 1.48	2.54 ± 0.73	1.99 ± 1.30	2.98
Asparagine	16.67 ± 19.23	6.07 ± 6.35	11.68 ± 15.47	17.52
Aspartic acid	9.96 ± 4.47	9.07 ± 6.77	9.54 ± 5.74	14.32
Cysteine	1.45 ± 0.95	0.71 ± 0.61	0.92 ± 0.75	1.37
Glutamic acid	16.27 ± 7.28	21.58 ± 14.77	18.82 ± 11.70	28.24
Glutamine	20.52 ± 17.08	15.42 ± 16.69	18.12 ± 16.92	27.18
Glycine	1.95 ± 1.22	3.06 ± 4.40	2.47 ± 3.19	3.71
Histidine	0.87 ± 0.66	1.60 ± 0.93	1.11 ± 0.79	1.67
Isoleucine	1.56 ± 0.83	2.85 ± 1.44	2.18 ± 1.33	3.27
Leucine	1.89 ± 1.01	2.86 ± 1.44	2.34 ± 1.32	3.52
Lysine	1.87 ± 0.85	2.88 ± 1.51	2.35 ± 1.30	3.52
Methionine	0.63 ± 0.33	0.61 ± 0.44	0.62 ± 0.37	0.93
Phenylalanine	1.23 ± 0.64	2.26 ± 1.22	1.74 ± 1.10	2.61
Proline	2.32 ± 0.70	3.54 ± 5.21	3.19 ± 4.38	4.78
Serine	7.72 ± 2.91	9.82 ± 4.74	8.73 ± 4.00	13.10
Threonine	3.03 ± 1.45	4.58 ± 1.63	3.76 ± 1.71	5.64
Tryptophan	1.41 ± 1.07	0.99 ± 0.52	1.28 ± 0.94	1.91
Tyrosine	1.23 ± 0.48	1.63 ± 0.97	1.44 ± 0.79	2.16
Valine	2.77 ± 1.15	4.48 ± 2.18	3.56 ± 1.89	5.33

Les données ont été compilées à partir de publications dans lesquelles des prélèvements de sèves ont été analysés. Exsudat: les échantillons de sèves ont été obtenus par la méthode d'exsudation à l'EDTA et donc dilués dans une solution contenant de l'EDTA. Sève: Cela correspond à des échantillons de sève pure. Ici les données proviennent de plusieurs espèces confondues. Ce tableau permet de voir que certains acides aminés sont plus présents dans la sève que d'autres. C'est le cas de l'asparagine, de la glutamine, des acides aspartique et glutamique (D'après Harris et al., 2012)

aspartique et glutamique sont souvent les acides aminés prédominants (Lalonde *et al.*, 2003, Harris *et al.*, 2012) (Tableau 1). Lors de la sénescence des feuilles, il y a remobilisation de l'azote et le phloème contribue largement à cette mobilisation. En effet, de nombreuses protéines comme NRT 1.7 intervenant dans la remobilisation sont exprimées dans le phloème (Fan *et al.*, 2009).

De très nombreux métabolites secondaires sont également présents dans le phloème. Certains de ces métabolites interviennent dans des mécanismes de défense de la plante, c'est le cas des glucosinolates, que l'on retrouve chez les crucifères, comme *Arabidopsis* (Turgeon & Wolf, 2009). Des études menées au laboratoire chez *Arabidopsis* montrent que l'on retrouve dans les exsudats phloémiens de très nombreux intermédiaires métaboliques et énergétiques, par exemple des acides organiques comme le malate, le succinate et le citrate.

## **II.2 Hormones**

La sève phloémienne contient de nombreuses hormones: des auxines, des cytokinines, de l'acide abscissique et des gibbérélines (Hoad, 1995). Toutes ces hormones sont transportées à longue distance dans le phloème. Il a aussi été montré que leurs concentrations variaient en réponse aux changements de l'environnement (Hoad, 1995). Nous retrouvons bien ici le rôle fondamental du phloème dans la signalisation à l'échelle de la plante entière. On détecte aussi des molécules à fonction de signal impliquées dans les mécanismes de défense contre des pathogènes, comme le jasmonate et l'acide salicylique, qui sont transportées à longue distance dans le phloème (Hoad, 1995).

## **II.3 Ions**

La sève phloémienne transporte aussi des éléments minéraux, et notamment du potassium et du calcium. La concentration en potassium est stable tout au long de la vie de la feuille chez le ricin (Jongebloed *et al.*, 2004). Le potassium a un rôle très important dans le phloème dans la régulation de la turgescence (propriété d'osmolyte) mais aussi pour créer localement les gradients énergétiques membranaires (Gajdanowicz *et al.*, 2011). D'autres ions métalliques sont présents dans la sève, comme le  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  et  $Fe^{3+}$ . Ces ions sont le plus souvent chélatés à un ligand. Les ions ferreux et ferriques sont presque complètement

liés à la nicotianamine (Harris *et al.*, 2012). Le calcium joue un rôle important de signalisation dans le phloème, en particulier dans les tubes criblés, notamment dans les réponses à des stress de la plante. Il intervient dans la régulation de la contraction des protéines P chez les fabacées pour bloquer de façon transitoire le flux de sève (Knoblauch *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2006). Le calcium est aussi impliqué dans la signalisation en réponse à la propagation d'ondes électriques dans les tubes criblés (Furch *et al.*, 2009).

## II.4 Protéines

Des études de protéomes réalisées chez différentes espèces ont montré qu'il y avait de très nombreuses protéines dans la sève phloémienne. Chez les Cucurbitacées, l'équipe de William Lucas a montré en 2009 qu'il y avait plus de 1000 protéines dans la sève (Ham *et al.*, 2009). On trouve des protéines impliquées dans de très nombreux processus cellulaires, comme des protéines liées au stress, au contrôle du potentiel redox, des protéines de liaison à l'ARN, des protéines impliquées dans le métabolisme, mais également de façon plus étonnante et uniquement chez les cucurbitacées des protéines impliquées dans la synthèse de protéines (Lin *et al.*, 2009). Ces éléments sont des preuves du rôle intégrateur que joue le phloème au sein de la plante, et notamment de son rôle central dans le contrôle de la signalisation. Des analyses de protéome réalisées au laboratoire sur *Arabidopsis* ont également permis d'identifier plus de 200 protéines dans des exsudats phloémiens (Batailler *et al.*, 2012). Là encore, il s'agit de protéines impliquées dans le métabolisme et dans la réponse aux stress. Certaines protéines dont la localisation dans les tubes criblés a été bien établie, comme c'est le cas des protéines PP2, SEOR, ou des protéines comme les métallothionéines (des chélateurs de certains métaux), ne sont pas retrouvées dans les exsudats, il est possible que ces protéines soient circulantes, mais qu'en réponse à la blessure occasionnée pour le prélèvement, un mécanisme non encore élucidé provoque un ancrage de ces protéines à la membrane, rendant impossible la récupération de ces protéines. D'autre part, certaines protéines ne sont certainement pas mobiles, c'est le cas des enzymes intervenant localement dans les activités métaboliques des tubes criblés et des protéines impliquées dans le transport de cellule à cellule, qui sont certainement ancrées au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des plasmodesmes.

## II.5 ARN

La présence d'ARN dans la sève de cucurbitacées a été établie depuis des années, mais pendant longtemps ces ARN ont été considérés comme des contaminations provenant des tissus adjacents. En 1998, l'équipe de Fujiwara a montré qu'il y avait des ARNm dans la sève de phloème de riz (Sasaki *et al.*, 1998). Depuis, différents types d'ARN ont été identifiés dans la sève: des ARNm (Yoo *et al.*, 2004), des ARN de virus, des ARN non codants, des petits ARN, miRNA et siRNA (Yoo *et al.*, 2004), et des ARNt modifiés (Zhang *et al.*, 2009). Comme les tubes criblés ne possèdent pas de noyau, ces ARN ne peuvent pas être synthétisés localement. Ils sont probablement produits dans les cellules compagnes. Ceci implique un transport de cellule à cellule de ces ARN vers les tubes criblés. Des expériences de greffe chez *Cucurbita maxima* et chez *Arabidopsis* ont ainsi démontré que certains de ces ARN pouvaient effectivement se déplacer de façon spécifique à longue distance dans le phloème (Kehr *et al.*, 2008).

Le mécanisme de transport des ARN de cellule à cellule a fait l'objet de nombreuses études. La plupart des virus possèdent des protéines de mouvement (MP) ayant la capacité d'augmenter la taille d'exclusion limite des plasmodesmes, permettant ainsi le passage des virus de cellule à cellule, notamment dans les cellules de mésophylle. Pour de nombreux virus dont le génome est porté par des molécules d'ARN, un tel processus permettrait aussi le transport de l'ARN viral dans le phloème, notamment entre tube criblé et cellules compagnes, même si les protéines virales permettant ce transport sont mal connues (Vuorinen *et al.*, 2011). De plus il a été montré que plusieurs classes de protéines phloémiennes, telles que la famille des PP2 et des PP1, pouvaient interagir avec l'ARN de ces virus et donc être impliquées dans le transport de virus et de viroïdes (Gomez & Pallás, 2004 ; Requena *et al.*, 2006). De très nombreux ARNm ont été retrouvés dans la sève phloémienne de différentes espèces. Comme ces ARNm ne peuvent être traduits dans les tubes criblés, il a été proposé que ces ARNm jouent un rôle de messenger à longue distance, et agissent potentiellement après traduction sur l'expression de gènes, modifiant ainsi le développement de la plante. Le mécanisme de transport de cellule à cellule des cellules compagnes vers les tubes criblés de ces ARN reste inconnu à ce jour.

Concernant les ARN non codant, de nombreux micro ARN (miRNA) ont été identifiés dans les exsudats de sève phloémienne, mais seulement deux ont été montrés comme étant

circulants: miRNA 395 et miRNA 399 (Marin-Gonzalez & Suarez Lopez, 2012). Il s'agit de miRNA intervenant dans l'assimilation et l'allocation du sulfate et dans l'homéostasie du phosphate. Des expériences de greffe menées sur la courge dans l'équipe de William Lucas ont permis de montrer qu'il existait aussi des siRNA pouvant agir à longue distance (Yoo *et al.*, 2004). Ces ARN sont transportés dans des complexes ribonucléoprotéiques, avec des protéines de liaison à l'ARN, comme RBP50 (Ham *et al.*, 2009) ou PSRP1 (Yoo *et al.*, 2004). Finalement comme il n'y a pas d'activité RNase dans le phloème, (Sasaki *et al.*, 1998), ceci augmenterait la stabilité des ARN dans les tubes criblés, facilitant ainsi leur action à longue distance.

### ***III. Physiologie du phloème***

#### **III.1 Transport des sucres**

Le phloème peut être divisé en trois domaines selon leur position dans la plante:

- 1) Le phloème de chargement, qui, comme son nom l'indique va permettre le chargement de la sève au niveau des tubes criblés. Ce phloème de chargement se retrouve principalement au niveau des veines mineures des feuilles sources.
- 2) Le phloème de transport correspond au phloème que l'on retrouve dans les veines d'ordre plus grand et les veines principales, les pétioles, et les tissus vasculaires des tiges, des hypocotyles et des racines.
- 3) le phloème de déchargement que l'on retrouve au niveau des organes puits, comme aux extrémités des racines ou dans les organes en formation.

##### **III.1.1. Chargement du phloème en sucre**

Il existe 2 grandes voies de chargement du phloème: la voie symplasmique et la voie apoplasmique ; avec des modes de diffusion variés: diffusion passive, diffusion énergisée par des transporteurs ou diffusion couplée à un mécanisme de polymère-trapping. Le passage par la voie symplasmique signifie que les sucres circulent dans le cytoplasme et diffusent de cellule à cellule par les plasmodesmes, alors qu'un passage par la voie apoplasmique signifie

que les sucres sont déchargés dans l'apoplasme (efflux) avant de rentrer dans le cytoplasme d'autres cellules (influx), les échanges entre cytoplasme et apoplasme nécessitant l'activité de transporteurs membranaires. Des disparités existent quant au mode de chargement du phloème selon les espèces. Dans la littérature, il est généralement admis que le chargement des sucres du mésophylle jusqu'aux tissus vasculaires se fait par la voie symplasmique. En revanche suivant les espèces le chargement au niveau des tissus vasculaires peut être soit apoplasmique, soit symplasmique. Chez les espèces ligneuses, il est le plus souvent symplasmique, contrairement aux espèces herbacées chez lesquelles plusieurs modes de chargement ont été observés (Lalonde *et al.*, 2003).

Chez les espèces apoplasmiques, telles qu'*Arabidopsis*, plusieurs transporteurs de sucres ont été identifiés, appartenant à la famille des SUT/SUC, qui sont des symporteurs saccharose/protons (Sauer & Stolz., 1994). L'activité de ces transporteurs est couplée à celle de pompes à protons H<sup>+</sup> ATPases, qui génèrent une force motrice pour le transport des sucres et des acides aminés. Pour le transport d'autres métabolites, on peut citer comme transporteur d'acides aminés dans le phloème le transporteur AAP2 (Lalonde *et al.*, 2003).

Chez les espèces symplasmiques, les sucres passent par les plasmodesmes du mésophylle vers les tubes criblés, sans faire appel à des transporteurs spécifiques. Chez certaines espèces comme les Cucurbitacées, le saccharose est converti dans des cellules de transfert en sucres de plus haut poids moléculaire comme le stachyose et le raffinose. Ces sucres ne peuvent ensuite plus sortir des cellules vers les cellules de parenchyme avoisinantes, ils sont chargés dans les tubes criblés puis transportés vers les organes puits.

Un critère très utilisé pour classer les espèces en espèce apoplasmique ou symplasmique est la fréquence des plasmodesmes dans le complexe CC/TC au niveau des zones de chargement. Chez les espèces apoplasmiques, la fréquence de plasmodesmes est plus faible, ce qui signifie que le complexe CC/TC est largement isolé des cellules alentour. Néanmoins, ce critère n'est pas suffisant pour déterminer si une espèce est apoplasmique ou pas. Une autre façon est d'utiliser un composant comme le PCMBMS (Acide para-chloromercuribenzosulphonique), qui bloque les transporteurs membranaires, et de regarder par la suite les conséquences sur les exports de sucre (Lalonde *et al* 2003).

### III.1.2. Transport par flux de masse et modèle de Münch

Le transport à longue distance s'effectue dans les veines d'ordre I, II, III dans les pétioles et dans les tiges. Le modèle actuellement accepté pour décrire les flux de sève dans le phloème est le modèle de Münch, décrit en 1930 (Münch, 1930). Ce modèle se base sur le fait que le phloème est constitué de files de TC semi-perméables. Dans les organes sources, le chargement du phloème en sucre génère une concentration en solutés élevée, ce qui provoque un flux osmotique d'eau dans les tubes criblés et crée un gradient de pression osmotique. Au niveau des puits, la concentration en sucre est moins élevée, le déchargement des sucres crée une pression hydrostatique plus faible. Il en résulte une différence de pression hydrostatique entre les organes sources et les organes puits qui génère un flux de masse au sein des tubes criblés. Ce modèle de transport est actuellement largement accepté. L'équipe de Knoblauch a publié en 2010 un article majeur dans lequel ont été mesurés chez la courge, le haricot, la tomate, le ricin et une poacée, *Phyllostachys nuda*, le diamètre et la surface des cribles au niveau d'une plage de cribles, ces paramètres étant des paramètres essentiels de la conductivité des tubes criblés. Des analyses de vitesse de flux ont également été réalisées par IRM (Imagerie à Résonance Magnétique) permettant d'avoir une mesure effective de la vitesse de la sève au sein du phloème (Mullendore *et al.*, 2010). Chez le haricot, la vitesse du flux est de  $327\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , soit  $1,17\text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ , et chez la courge  $199\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , soit  $0,7\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ . Des expériences similaires avaient déjà été réalisées chez le peuplier et le tabac en 2006, établissant des vitesses de flux du même ordre (Windt *et al.*, 2006).

### III.1.3. Déchargement du phloème

Le déchargement du phloème se fait au niveau des puits. Dans un très grand nombre d'espèces, le déchargement se ferait principalement de façon symplasmique, les molécules étant assez petites pour passer passivement dans les plasmodesmes. Dans certains cas, il peut y avoir une étape apoplasmique, par exemple dans le cas d'une interaction hôte/parasite (Lalonde *et al.*, 2003).

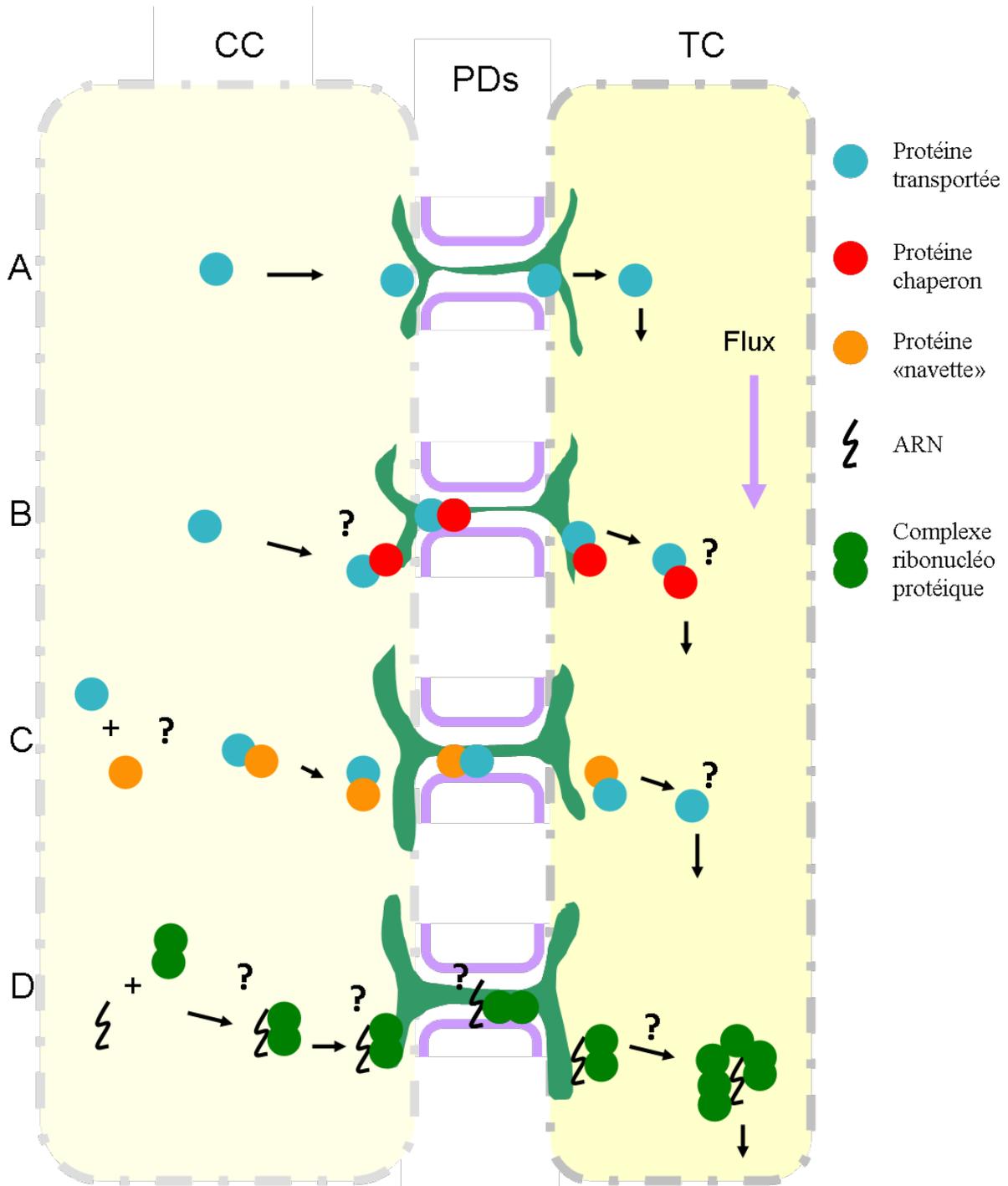
## III.2 Transport de macromolécules

Comme nous l'avons vu, le phloème est également impliqué dans le transport à longue distance de macromolécules, ce qui lui a valu le nom de « long distance information superhighway » (Jorgensen *et al.*, 1998). De nombreuses questions se posent quant à la translocation des macromolécules. Quels sont les mécanismes de transport? Existe-t-il des partenaires spécifiques ou des protéines chaperons qui facilitent ce transport? Des pistes existent, notamment grâce à l'identification de protéines de liaison à l'ARN dans les tubes criblés. Nous allons ici évoquer plusieurs exemples de processus de signalisation à longue distance impliquant des macromolécules, nécessaires au développement de la plante et pour lesquels le rôle du phloème a été établi. Quelques informations sur les mécanismes de transport seront également apportées.

### III.2.1. Exemples de macromolécules agissant à longue distance

#### a) Protéine agissant à longue distance: Le cas du florigène (FT)

Chez les plantes, il existe un signal appelé « florigène » qui est responsable de l'induction de la floraison en réponse à la photopériode. Dans ce cas, la photopériode est perçue par les feuilles et se traduit à distance par l'induction du gène *APETALA*, gène d'identité du méristème d'inflorescence (Corbesier *et al.*, 2007). Il a été montré que le gène *FT* (Flowering locus T) était très important pour induire de façon systémique la floraison. Ce gène, codant pour un facteur de transcription, est exprimé au niveau du phloème, dans les feuilles, et le facteur de transcription ainsi produit exerce son action au niveau du méristème apical. Des études réalisées pour déterminer si c'était la protéine qui migrait ou l'ARNm ont finalement conclu, grâce à des expériences de greffes, que le transport de la protéine à longue distance était responsable de l'induction de la floraison (Corbesier *et al.*, 2007). La protéine FT est aussi présente dans les protéomes de sève (Batailler *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2009). Cependant, une publication récente (Li *et al.*, 2012) a montré que l'ARNm de *FT* pouvait également être transporté au niveau du méristème apical caulinaire. Il a été aussi montré en 2012 par l'équipe de Yu (Liu *et al.*, 2012) qu'une protéine appelée FTIP1, également exprimée dans les cellules compagnes était nécessaire pour l'export de FT. Ceci montre que le transport de FT pourrait être finement régulé dans le phloème, et que la signalisation systémique n'est pas simplement due au mouvement d'une protéine unique par flux de masse.



**Figure 9: Différents modèles de transport de macromolécules de cellule à cellule**

*A) Transport de cellule à cellule, non ciblé, de macromolécules par les plasmodesmes (exemple de la GFP soluble). B) Transport de macromolécules assisté par des protéines chaperons. Les mécanismes d'interaction protéine-protéine au niveau du RE sont encore inconnus. C): Transport de protéines par des protéines navette des CC vers les TC. Ici l'interaction protéine-protéine se fait au niveau du cytosol. D) Transport de complexes RNP de cellule compagne à élément criblé. De nombreuses questions se posent encore: comment se fait l'interaction dans la CC? Comment ce gros complexe passe-t-il les plasmodesmes? Ce complexe va-t-il rejoindre un autre complexe RNP dans les TC? CC: cellule compagne. TC: tube criblé. PD: plasmodesme.*

## b) ARNm agissant à longue distance: Le cas de BEL5

*StBEL5* est un facteur de transcription induit en conditions de jours courts et impliqué dans la formation des tubercules en induisant les gènes responsables de la croissance. Son ARNm est produit au niveau des feuilles, et est transporté via le phloème jusqu'au stolon, dans lequel il induit la tubérisation. En greffant des plantes surexprimant *BEL5* sur des plantes sauvages puis en analysant le contenu en ARNm du porte-greffe, l'équipe de Hannapel a montré que l'ARNm de *BEL5* est transporté du greffon vers le porte-greffe (Banerjee *et al.*, 2006). D'autre part, les régions 5'UTR et 3'UTR sont également importantes pour le transport de cet ARNm et pour son accumulation au niveau des stolons (Bannerjee *et al.*, 2009). *StBEL5* est régulé par miR172, un microARN qui est potentiellement transporté dans le phloème (Martin *et al.*, 2009). De nombreux travaux sur le mode d'action de *StBEL5* considèrent que la molécule jouant rôle de signal était son ARNm. Toutefois, il n'est pas totalement exclu que la protéine *StBEL5* soit également transportée à longue distance et constitue aussi une molécule signal alternative.

### III.2.2. Les étapes du transport de macromolécules dans le phloème

Le transport dans le phloème de macromolécules se fait en deux étapes. La première étape est le transport de la cellule compagne à l'élément criblé, et la seconde étape est le transport à longue distance du tube criblé vers l'organe puits (Figure 9). Il peut se produire ultérieurement un déchargement dans les cellules compagnes des organes puits, et dans des autres assises cellulaires par exemple dans les méristèmes. Pour le transport de la cellule compagne vers le tube criblé, plusieurs protéines ont été identifiées comme pouvant être impliquées dans ce transfert. Il existe des protéines appelées NCAP, pour « non cell autonomous proteins » qui se déplacent au travers les plasmodesmes. De nombreuses NCAP ont été identifiées, qui sont transportées des CC vers les TC puis mobiles avec la sève phloémienne. On distingue également les protéines non-adressées, qui sont plus petites que la taille d'exclusion limite des plasmodesmes, par exemple la GFP, et les protéines transportées de cellule à cellule après adressage sur le système endomembranaire ou sur le cytosquelette, jusqu'aux plasmodesmes (Crawford & Zambryski, 1999). De même, des ARN ont été retrouvés dans les tubes criblés. Le transport d'ARN de cellule à cellule met en jeu des complexes ribonucléoprotéiques permettant leur transport des CC vers les TC. Plusieurs



protéines ont été identifiées qui interviennent dans ces mécanismes, notamment CmPP16, NCAPP1 et PP2 (Lee *et al.*, 2003). Leur mode d'action exact et leur spécificité reste à établir.

### III.2.3 Modèles de transport de cellule-à-cellule

#### a) Transport par un mécanisme d'adressage

Les modèles de mécanismes de transport au travers des plasmodesmes, proposés notamment par William Lucas, s'inspirent des voies de transport et d'adressage intracellulaire déjà décrites. Un tel transport ferait appel à des protéines chaperons, qui interviendraient dans un mécanisme d'ancrage au RE, à des vésicules, au cytosquelette ou à la membrane plasmique (Lee, 2003). Cet ancrage à des membranes ou au cytosquelette permettrait d'acheminer ces protéines jusqu'aux plasmodesmes via lesquels les protéines seraient transportées dans les tubes criblés. Dans ce modèle, les protéines chaperons auraient aussi la capacité d'augmenter, directement ou indirectement, la taille limite d'exclusion des plasmodesmes.

#### b) Transport par « shuttling »

Une autre voie de transport, évoquée par Taoka en 2007, est une voie cytosolique, ne faisant pas intervenir de protéine chaperon ni d'ancrage à des membranes ou au cytosquelette mais un mécanisme de navette (encore appelé « shuttling ») au travers du plasmodesme. Le « shuttling » a été principalement décrit dans les cellules animales pour le transport au travers du pore nucléaire (Figure 10). Il s'agit d'un processus associé à la glycosylation des protéines par un résidu N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), aussi appelée la O-N-Acétyleglucosaminylation (Issad *et al.*, 2010). Cette glycosylation particulière fait intervenir des enzymes cytosoliques: une O-linked N-Acetyl-glucosaminyltransferase (OGT), pour la glycosylation, et une N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (O-GlcNAcase ou OGA), pour la déglycosylation (Hart *et al.*, 2007). Le passage par le pore nucléaire se fait par « shuttling » après fixation avec des partenaires protéiques et il est couplé à une déglycosylation suivie au même site d'une phosphorylation. Chez les plantes, ce processus de « shuttling » a également été identifié et présente de grandes similitudes si ce n'est une glycosylation par un oligomère de GlcNAc

(GlcNAc<sub>3-5</sub>). Chez *Arabidopsis*, 2 OGT ont été caractérisées: SEC et SPY (Olszewski *et al.*, 2010). Quelques cas d'O-GlcNAcylation ont été décrits chez les plantes, intervenant dans des processus variés, par exemple dans des mécanismes de signalisation en réponse à des signaux hormonaux ou environnementaux, dans le développement et le rythme circadien (Olszewski *et al.*, 2010). Dans le phloème, Taoka *et al.* 2007 (Taoka *et al.*, 2007) a constaté que dans la sève phloémienne se trouvaient des protéines portant des glycosylations de type O-linked GlcNAc et des phosphorylations. Par analogie avec le système de « shuttling » permettant la navette de protéines au travers du pore nucléaire, il a proposé que le transport des protéines retrouvées dans les TC, phosphorylées ou glycosylées, ferait intervenir un processus de shuttling similaire

#### III.2.4. Modèles de transport à longue distance

Quelque soit le mode transport des cellules compagnes vers les tubes criblés, les macromolécules, protéines ou ARNs, ne sont certainement pas transportées sous forme de sous-unités mais associées à des complexes. Ces complexes seraient transportés à longue distance vers leurs cibles dans les organes puits. Un certain nombre de constituants de cette voie de transport à longue distance a été identifié dans le cas du transport d'ARN. Il s'agit de complexes ribonucléoprotéiques, contenant notamment chez *C. maxima*, les protéines de fixation à l'ARN CmPP16, RBP50 et Eif5A, ainsi que des protéines Heat Shock HSC70 et HSP113 (Ham *et al.*, 2009). Ces complexes se fixeraient spécifiquement à certaines classes d'ARNm circulant dans le phloème, par exemple les ARNm de CmPP16-1, de GAIP ainsi que les ARNm des facteurs de transcription SCARECROWLIKE SCL14P, SHOOT MERISTEMLESS (STMP), ETHYLENE RESPONSE FACTOR ERFP.

Toutefois, de nombreuses questions restent en suspens. Existe t-il un trafic ciblé des ARN ? Est-ce que tous les ARN peuvent être transportés à longue distance ? Les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) associés à la protéine de fixation à l'ARN RBP50 recrutent de nombreuses protéines pour transporter des ARN, et sont donc relativement gros (Ham *et al.*, 2009). Comment des complexes aussi gros peuvent ils circuler dans les tubes criblés au travers des plages de cribles? Pour les protéines participant au fonctionnement de base des tubes criblés, comme certaines enzymes du métabolisme ou des protéines de structure, comment se comportent-elles et quelles sont les voies d'adressage mises en jeu? Sont-elles ancrées au réticulum, ancrées à des éléments de cytosquelette – spécifiques aux tubes criblés

et jusqu'à présent non identifiés- ou ancrées à la membrane plasmique ? Existe-t-il une sélection dans les protéines qui vont être transportées avec le flux de masse, selon leur fonction ou selon certains organes puits? Par exemple dans le cas de protéines comme FT qui sont transportées spécifiquement vers les méristèmes caulinaux apicaux, il pourrait exister des mécanismes de régulation permettant de cibler leur transport vers des organes puits particuliers, dans les parties aériennes ou dans les racines. Il a ainsi été proposé qu'il puisse exister des mécanismes de tri sélectif pour cibler les protéines. Dans une publication de Aoki et collaborateurs en 2005, il a été montré que certaines protéines sont transportées de façon spécifique vers les racines, et que ce transport nécessiterait des complexes protéiques spécifiques. Ces expériences n'ont toutefois pas été confirmées sur d'autres systèmes et le mécanisme moléculaire impliqué reste à établir.

### **III.3 Analyse fonctionnelle du phloème**

Les fonctions du phloème ont été aussi largement explorées grâce à l'étude de mutants dérégulés pour l'expression de gènes dans le phloème et à l'observation des altérations phénotypiques associées à ces dérégulations. Il existe de nombreux mutants affectant des facteurs clés intervenant dans le développement du phloème. Ces mutants présentent des altérations de mise en place du phloème ou des tissus vasculaires, pouvant même aller jusqu'à l'absence de phloème fonctionnel dans la plante. Ils sont délicats à étudier car souvent leur développement s'arrête précocement, la mutation pouvant même être létale. D'autres classes de mutants affectant les mécanismes de transport mis en jeu dans le phloème ont également été décrites, et ces mutants présentent souvent une croissance réduite et dans certains cas des altérations de l'architecture et du développement.

#### **III.3.1 Mutants affectés dans la mise en place des tissus vasculaires et du phloème**

##### Mutants présentant des problèmes de discontinuités vasculaires:

Il existe de nombreux mutants décrits dans la littérature qui présentent des défauts dans le patron vasculaire. La plupart présentent aussi des altérations de développement. Par exemple, chez le mutant *mp* (*monopteros*), les plantes présentent des défauts de continuité vasculaire. *MP* serait impliqué dans la différenciation des tissus vasculaires et serait induit en

réponse à la présence d'auxine dans les cellules (Wenzel *et al.*, 2007). Depuis, de nombreux autres mutants ont été identifiés qui se caractérisent par des défauts de morphogenèse foliaire et de patron vasculaire. La plupart de ces mutants sont altérés dans l'expression de facteurs intervenant dans la signalisation de l'auxine (*MP*, *SCARFACE*, *CVP2*...). Ils sont affectés généralement à la fois dans la formation du phloème et dans celle du xylème et présentent souvent un défaut initial de mise en place du procambium ou du cambium (Caño-Delgado *et al.*, 2010).

#### Mutants présentant des altérations de différenciation du phloème:

Peu de mutants affectés uniquement dans la mise en place du phloème ont été à ce jour identifiés. Le mutant *apl* (*altered phloem development*), est un de ces mutants. Il présente une absence totale de phloème fonctionnel dans toute la plante, alors qu'il possède des files de xylème surnuméraires à la place du phloème (Bonke *et al.*, 2003). Le gène *APL* code pour un facteur de transcription qui possède deux rôles: il serait impliqué dans la différenciation du phloème, et dans la répression de la différenciation en xylème lors du développement des tissus vasculaires. Le mutant *octopus*, décrit par l'équipe de JC Palauqui à l'INRA de Versailles (Truernit *et al.*, 2012), est un mutant présentant des problèmes de patron vasculaire dans les cotylédons et des altérations de continuité vasculaire dans la racine. Dans *octopus*, certaines des cellules dans les files de précurseur de phloème ne se différencient pas en protophloème. OCTOPUS est une protéine associée à la membrane plasmique qui serait un déterminant important de la différenciation du protophloème (Truernit *et al.*, 2012), mais dont le rôle exact reste à définir.

Ces mutants de mise en place du phloème se caractérisent par un phénotype très précoce, *in vitro*, caractérisé par des racines très courtes et qui ne se développent pas.

Un seul mutant intervenant dans des étapes plus tardives de différenciation des tubes criblés a été identifié. Il s'agit du mutant *cs7*, un mutant n'exprimant plus le gène *CALS7*, qui code une callose synthase exprimée spécifiquement dans le phloème et responsable de la synthèse de callose dans les tubes criblés en cours de développement. Les conséquences de cette absence de callose sont que moins de pores vont être ouverts au niveau des plages de cribles, et que ces pores auront des plus petites ouvertures. Ceci impacte directement la conductivité de la sève dans les tubes criblés, et entraîne une croissance réduite, ainsi qu'une production de graines réduite (Xie *et al.*, 2011; Barratt *et al.*, 2011; Slewinski *et al.*, 2012).

### III.3.2 Mutants affectés dans le transport de métabolites

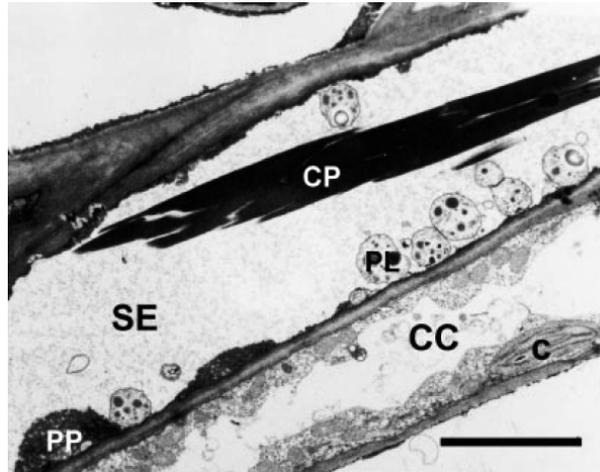
Le mutant du gène *SUC2*, codant un transporteur d'influx de saccharose très exprimé dans les cellules compagnes, possède un phénotype très altéré. En effet, les plantes vont avoir un ralentissement de leur croissance, et présentent un rougissement caractéristique dû à la présence d'anthocyanes. D'autre part, elles accumulent de l'amidon dans les feuilles, ce qui est une réaction de la plante qui stocke les sucres non transportés sous cette forme. D'autre part, leur fertilité est très affectée, selon les conditions de culture en serre (Sauer *et al.*, 1994; Truernit *et al.*, 1995; Zakhleniuk *et al.*, 2001 ; Srivastava *et al.*, 2008). D'autres mutants ont été identifiés dans cette classe de transporteurs *SUC/SUT*, qui ne présentent pas de phénotype aussi marqué. Les mutants des gènes *SWEET11* et *SWEET12* présentent des retards de croissance et des rendements moindres. *SWEET11* et *SWEET12* ont été caractérisés comme des transporteurs de saccharose, présents au niveau des membranes du parenchyme phloémien, et qui seraient impliqués dans l'efflux des sucres vers l'apoplasme (Chen *et al.*, 2012).

Il existe aussi de nombreux autres mutants affectés dans le transport d'autres métabolites transportés par le phloème, comme les acides aminés ou des ions. Par exemple le mutant d'insertion *Sultr1.3* est affecté dans le transport du sulfate au niveau des cotylédons vers les organes puits. Ce mutant a permis de mettre en évidence le rôle du transporteur de sulfate *SULTRI.3* dans le chargement du sulfate des tubes criblés. (Yoshimoto *et al.*, 2002). Le mutant *aap2*, affecté dans une perméase *AAP2*, présente une altération des flux de carbone et d'azote entre les organes sources et les organes puits (Zhang *et al.*, 2010). Suivant la fonction de ces transporteurs, le phénotype des mutants affectés dans leur expression peut être très varié.

### III.3.3 Mutants affectés dans la signalisation

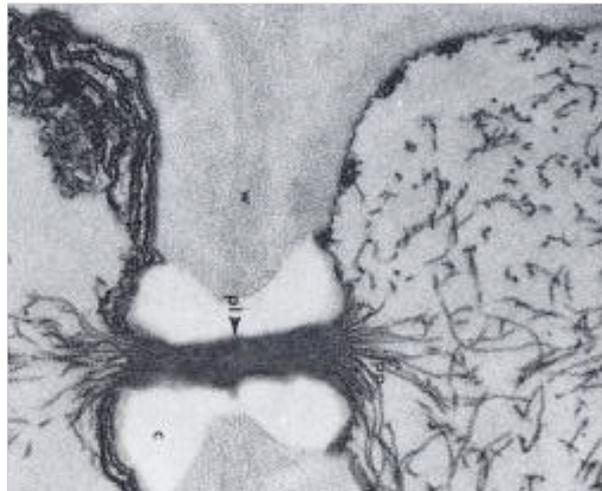
De nombreux mutants affectés dans la signalisation par le phloème ont été décrits. Citons à titre d'exemple les mutants dominants d'*iaa28* et *iaa18*, les gènes *IAA28* et *IAA18* codant pour des régulateurs de transcription intervenant dans la signalisation auxinique. Les transcrits sont transportés à longue distance via le phloème depuis les feuilles matures et sont nécessaires au développement des racines (Notaguchi *et al.*, 2012). Ces mutants présentent des défauts de formation des racines latérales.

Le mutant *isi1* appartient à une autre classe de mutants, affectée dans la signalisation par les sucres dans le phloème. Le gène *ISII* est impliqué dans la synthèse d'amidon en réponse au sucre. Il est exprimé principalement dans le phloème de feuilles sources. Chez le



**Figure 11: Structure des forisomes, corps cristalloïdes des tubes criblés, chez *Vicia faba***

Observation en MET de protéines P de *Vicia faba*, formant des corps cristalloïdes dans les tubes criblés (CP). SE: Sieve element (élément criblé). CC: cellule compagne. c: chloroplaste. PP: protéines P pariétales. PL: plastes. (Knoblauch et al., 2001)



**Figure 12: Structure en filaments des protéines P chez *Cucurbita maxima***

Observation en MET de protéines P chez *Cucurbita maxima*. Ici les protéines P sont présentes sous forme filamenteuse. On voit que de nombreuses protéines P s'accumulent au niveau d'un crible. (Cronshaw & Esaii, 1967)

mutant *isi1*, il y a une mauvaise coordination entre la quantité de sucre dans la cellule, et l'expression de gènes induits par le sucre. Les plantes ont un phénotype de croissance réduite, et un rendement diminué. Cela met en avant le rôle de signal que peuvent jouer les sucres dans les feuilles sources. (Rook *et al.*, 2006).

#### ***IV. Les protéines spécifiques des tubes criblés***

Le phloème est un tissu très organisé et très complexe. Comme nous l'avons vu, les cellules des tubes criblés présentent une organisation subcellulaire très particulière, qui permet le transport de la sève par flux de masse avec des vitesses relativement élevées et sous de fortes contraintes hydrostatiques. Ces cellules présentent des structures très spécifiques, constituées par exemple des protéines P, ou d'autres classes de protéines, telles que les protéines PP2.

##### **IV.1 Les protéines P**

Un élément caractéristique des tubes criblés est la présence de protéines P. Les protéines P, pour « Phloem Proteins », sont des protéines présentes de façon abondante dans les tubes criblés. Elles existent sous différentes formes: filamenteuses, tubulaires, cristalloïdes, granulaire et fibrillaire (Figure 11 et 12). Il est important de noter que la définition des protéines P a été établie sur des critères uniquement morphologiques (Hartig, 1837, Esaü & Cheadle, 1958). Les protéines P sont produites très précocement lors de la différenciation des complexes TC/CC (Evert, 1990). Ces protéines P se retrouvent principalement dans les tubes criblés, mais chez certaines espèces, elles peuvent être présentes dans les cellules compagnes et dans le parenchyme phloémien. Les protéines P sont présentes chez de nombreuses espèces de dicotylédones, et chez de rares espèces de monocotylédones (Evert, 1990). La fonction de ces protéines P serait de bloquer le flux de sève lors d'une blessure ou d'un stress, permettant ainsi de diminuer la perte de sucres et de solutés (Ernst *et al.*, 2012).

#### IV.1.1 Les protéines P chez *Cucurbita maxima*

Les Cucurbitacées sont des organismes modèles pour observer le phloème. Ils disposent de gros tissus vasculaires (diamètre relatif important et diamètre des tubes criblés de 35-40  $\mu\text{m}$ ), et ils peuvent exsuder des volumes importants de sève (plusieurs mL). Ils permettent ainsi des études du phloème à différents niveaux, des observations sur l'anatomie du phloème aux analyses transcriptomiques, ou bien protéomiques (Zhang *et al.*, 2010). D'autre part, il est possible de réaliser facilement des greffes sur ces plantes, permettant d'analyser le mouvement de protéines à longue distance dans le phloème.

Ce modèle était donc idéal pour étudier les protéines P, qui sont présentes sous forme de filaments chez cette espèce. Des expériences d'immunolocalisation ont montré que deux classes de protéines, nommées PP1 et PP2, étaient associées aux protéines P (Smith *et al.*, 1987). Des Western-blots réalisés sur de la sève phloémienne ont également montré que ces deux protéines étaient également les plus abondantes de la sève.

##### a) Les protéines PP1 chez *Cucurbita maxima*

PP1 est une protéine de 96 kDa, qui est présente dans les tubes criblés mais également dans les cellules compagnes (Clark *et al.*, 1997). Elle est produite au niveau des cellules compagnes, ce qui laisse supposer qu'elle peut être transportée de cellule à cellule des CC vers les TC. PP1 possède la capacité de former une sorte de gel dans les tubes criblés en conditions oxydatives. Des expériences d'immunolocalisation ont montré que PP1 était présente au niveau des protéines P de *Cucurbita maxima*. D'autre part, cette protéine est capable d'interagir avec CbmPP2, en formant des liaisons covalentes. Ceci explique que PP1 et que PP2 ont été caractérisées comme étant les protéines P présentes chez les Cucurbitacées. Toutefois PP1 est une protéine spécifique à cette famille, alors que PP2 est une protéine que l'on retrouve chez de nombreuses Angiospermes.

##### b) Les protéines PP2 chez les Cucurbitacées

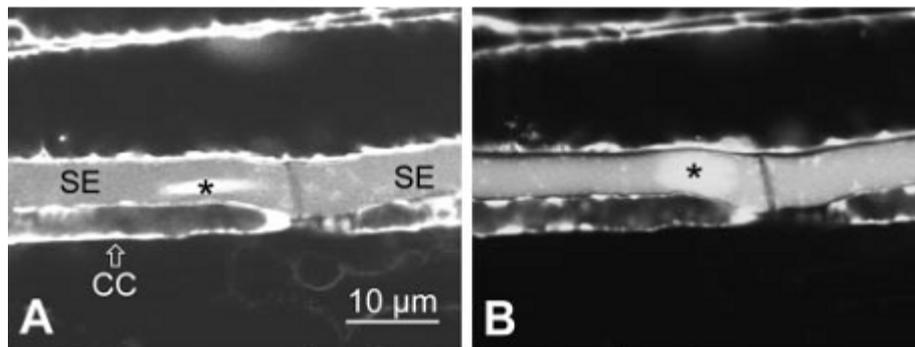
Chez *Cucurbita maxima*, CbmPP2 est une protéine présente principalement sous forme dimérique (48 kDa), bien que la forme monomérique soit également présente (26 kDa) (Read & Northcote, 1983a). PP2 interagit par des liaisons covalentes avec les PP1, et par des

expériences d'immunolocalisation il a été montré une localisation au niveau des protéines P (Smith *et al.*, 1987). Elle possède des activités de lectine, en se fixant de façon spécifique à des oligomères de N-acétyl-D-glucosamine. Des expériences de greffe interspécifique montrent que CbmPP2 a la capacité d'être transportée à longue distance dans les tubes criblés, et qu'elle peut également être transportée des tubes criblés vers les cellules compagnes (Golecki *et al.*, 1999). De plus, il a été établi que le transcrite de *CbmPP2* était présent dans les CC alors que la protéine s'accumule préférentiellement dans le TC, indiquant que CbmPP2 est transportée des CC où elle est produite vers les TC, où elle va être transportée à longue distance (Dannenhoffer *et al.*, 1997). Ceci nous indique que la protéine est capable de plusieurs types de mouvement, aussi bien du transport de cellule à cellule des cellules compagnes vers les tubes criblés, que du transport à longue distance dans les tubes criblés. Elle possède également la capacité d'augmenter la taille d'exclusion limite des plasmodesmes (Balachandran *et al.*, 1997). Des analyses complémentaires montrent que chez le concombre, *Cucumis sativa*, CsPP2 peut fixer des ARN de différentes natures, et des viroïdes (Gomez & Pallás, 2004).

Dans la sève phloémienne de ces espèces, il existe une forme plus courte (17-18 kDa), Cmlec17 chez *C. maxima* et Cmmlec17 chez le melon, présentant des propriétés de lectine similaires. Chez le melon, CmmPP2 et Cmmlec17 peuvent se lier à des ARN, et sont transportées à longue distance dans le phloème, ce qui a été mis en évidence grâce à des expériences de greffe interspécifiques entre la courge et le melon (Gomez *et al.* 2005). Ces éléments suggèrent que les protéines PP2 pourraient jouer un rôle dans le transport de macromolécules au sein du phloème, bien qu'il reste à établir s'il s'exerce sur le chargement des tubes criblés en macromolécules, ou sur leur transport à longue distance au sein des tubes criblés.

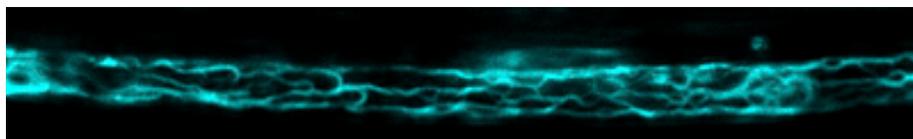
#### IV.1.2 Les protéines SEO et SEO-like

Alors qu'il semblait bien établi que les constituants des protéines P comprenaient des protéines de type PP1 et PP2, des travaux réalisés à partir de 2007 chez les Fabacées qui possèdent des protéines P particulières, appelées forisomes, ont fortement remis en cause ces résultats (Noll *et al.*, 2007). En effet, il a été montré que les constituants des forisomes étaient des protéines de la famille FOR/SEO chez différentes Fabacées. Très récemment, ces résultats ont été étendus à *Arabidopsis* et au tabac (Ernst *et al.*, 2012), établissant que les protéines P ayant des morphologies aussi variées que les forisomes des Fabacées ou les filaments chez les



**Figure 13: Dilatation et contraction du forisome en réponse à la blessure**

Un forisome chez *Vicia faba* est observé en microscopie confocale après coloration avec le CDMFDA (5[6]-carboxy-4',9,5'-diméthylfluorescein diacetate). En A, le forisome marqué par une \* est dans un état contracté. En réponse à la blessure (B) il va se disperser, permettant ainsi un arrêt transitoire du flux de sève. SE: sieve element. CC: cellule compagne (D'après Knoblauch et al., 2001)



**Figure 14: Morphologie des protéines P chez Arabidopsis**

Les protéines P sont visualisées avec AtSEOR1-GFP dans un tube criblé de racine d'*Arabidopsis*. SEOR1 forme des filaments, qui ne ressemblent en rien à des forisomes présents sur la Figure 11. SEOR1 forme un réseau bien organisé, qui semble accroché au niveau de la membrane du tube criblé (D'après Froelich et al., 2011)

Brassicacées (*Arabidopsis*) et les Solanacées (tabac) sont toutes constituées de protéines de la famille des SEO. Cette découverte très récente a permis de clairement relier les protéines P à des gènes exprimés dans le phloème. La plupart des espèces de Monocotylédones ne possèdent pas de protéines P, et effectivement la famille des SEO se retrouve principalement chez les Dicotylédones (Rüping *et al.*, 2010)

a) Les protéines SEO chez les Fabacées

Chez les Fabacées comme *Vicia faba*, les protéines P forment des corps particuliers appelés forisomes (Behnke *et al.*, 1991). Ces forisomes possèdent des propriétés particulières, notamment la capacité de se contracter et de se dilater de façon réversible en réponse à l'environnement, par exemple la disponibilité en ions  $Ca^{2+}$  et  $Sr^{2+}$  (Figure 13). Ces changements de conformation sont déclenchés par des stress comme les blessures ou un choc thermique (Knoblauch *et al.*, 2001). Cette capacité contractile intervient très rapidement au sein du phloème. De plus, des analyses réalisées *in vitro* montrent que ces mouvements peuvent être modulés par le potentiel d'oxydoréduction et aussi par la concentration en sucre (Knoblauch *et al.*, 2012). Cette capacité contractile pourrait permettre de moduler les flux de sève directement en contrôlant la contraction des forisomes en réponse à un stress. Trois protéines ont été identifiées chez *Vicia faba*, FOR1, 2 et 3 (Noll *et al.*, 2007). Cependant, pour des raisons de nomenclature, ces protéines ont été renommées « SEO » pour *Sieve Element Occlusion* (Pelissier *et al.*, 2008). On retrouve des orthologues chez d'autres Fabacées, comme *Medicago truncatula* (Rüping *et al.*, 2010).

b) Les protéines SEO chez les autres Dicotylédones

Des analyses de séquences ont montré qu'on pouvait retrouver des gènes « SEO-like » chez d'autres Dicotylédones, dont *Arabidopsis thaliana* ou encore *Nicotiana tabacum* (Rüping *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis* 3 gènes ont été identifiés, *SEOR1*, *SEOR2* et *SEOR3*, ce dernier étant très probablement un pseudogène. L'équipe de Knoblauch a montré en 2011 que la protéine SEOR1 était un constituant principal des protéines P filamenteuse d'*Arabidopsis* (Figure 14), et que les amas de protéines SEOR1 n'étaient pas suffisants pour arrêter le flux de masse dans les tubes criblés. (Froelich *et al.*, 2011). Des propriétés similaires ont été montrées en 2012 pour SEOR2. Lorsque l'un ou l'autre de ces gènes est dérégulé, il y a disparition des filaments de protéines P dans les tubes criblés chez *Arabidopsis* (Anstead *et*

*al.*, 2012). Notons que chez *Arabidopsis*, les protéines P ne sont pas présentes sous forme de corps protéiques cristalloïdes, mais sous forme de filaments de plus ou moins grande taille, ce qui signifie que leur assemblage doit être différent de celui se produisant chez les Fabacées. Néanmoins, les mutants dérégulés pour l'expression de ces gènes ne présentent pas d'altération de croissance ou de développement, et le rôle de ces protéines reste inconnu.

Deux gènes *SEO* ont également été identifiés chez le tabac (Ernst *et al.*, 2012), espèce chez laquelle les protéines P sont également présentes sous forme filamenteuse. Dans cette publication récente, les auteurs ont montré, dans un système d'expression transitoire, que l'expression ectopique de ces protéines dans d'autres types cellulaires permettait bien de produire des filaments de protéines P. De plus, chez des mutants RNAi dérégulés pour l'expression des gènes *SEO*, les auteurs constatent que lors d'une blessure, la perte de photoassimilats est plus importante que chez le sauvage. Ceci constitue la première preuve fonctionnelle du rôle de ces protéines SEO dans le contrôle des flux de sève. Néanmoins, ces plantes ne présentent pas d'autres altérations phénotypiques.

#### IV.1.3 Hypothèses sur le rôle des protéines P dans le phloème

Les protéines P auraient donc un rôle important à jouer dans la régulation des flux de sève en cas de blessure ou de stress. Des analyses complémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer ce rôle et établir sa signification biologique. Néanmoins, d'autres rôles ont été proposés pour ces protéines P. De façon plus générale, elles pourraient intervenir dans le guidage de macromolécules au sein du phloème. Une hypothèse évoquée dans la littérature est que ces protéines P pourraient former une sorte de « gel filtrant » permettant à certaines molécules de passer préférentiellement dans le flux de sève, et en retenant d'autres (Esaü, 1968). Ces différentes hypothèses, qui restent à confirmer pourraient ajouter un rôle de signalisation aux protéines P.

## IV.2 Les lectines PP2

### IV.2.1 La famille des PP2 chez les Angiospermes

Les PP2 forment une vaste famille dont on retrouve des membres chez de très nombreuses Angiospermes: les Cucurbitacées, plusieurs membres de cette famille ont été étudiées chez la courge (*Cucurbita maxima*), le concombre (*Cucumis sativa*) ou encore le melon (*Cucumis melo*). On retrouve aussi des PP2 chez le céleri (*AgPP2-1* et *AgPP2-2*) (Dinant *et al.*, 2003), chez *Arabidopsis*, où il existe une trentaine de PP2. On trouve également dans la littérature des données concernant des PP2 chez d'autres espèces. Ainsi le promoteur d'un gène codant pour une protéine PP2 a été cloné chez l'oranger (*Citrus sinensis*), et des analyses de fusion de ce promoteur au gène *uidA* montre qu'il s'exprime bien dans les cellules compagnes (Miyata *et al.*, 2012). Son rôle chez l'oranger reste inconnu. Chez le pommier, des gènes *PP2* ont été montrés comme étant régulés positivement, après guérison chez des plantes ayant été infectées par des phytoplasmes (Musetti *et al.*, 2009) Il est donc possible que les protéines PP2 interviennent également dans la défense des plantes face aux pathogènes. D'autre part, grâce aux données de séquençage de plus en plus nombreuses, on retrouve des gènes codant pour des protéines ayant des séquences proches de PP2, par exemple chez le riz, le sorgho et la vigne. La présence de ces protéines PP2 chez de très nombreuses plantes vasculaires nous laisse penser qu'elles possèdent un rôle central au sein du phloème et confirme qu'elles sont probablement présentes chez toutes les Angiospermes.

### IV.2.2 Les protéines PP2 d'*Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis thaliana* 31 gènes codant potentiellement pour des protéines *PP2* ont été mis en évidence. Il s'agit une grande famille multigénique qui a connu de nombreuses duplications de gènes (Dinant *et al.*, 2003). Une très grande partie de ces gènes sont exprimés dans le système vasculaire, d'après les données de transcriptome disponibles (Zhao *et al.*, 2005). Ces gènes codent pour des protéines qui sont toutes constituées d'un domaine principal, avec une succession de quatre domaines fortement conservés que l'on retrouve dans les parties centrale et C-terminale des protéines. La partie C-terminale des protéines serait constituée de feuillets  $\beta$  (Beneteau *et al.*, 2010), alors que la partie N-terminale est plus



**Figure 15: Modèle de la structure tridimensionnelle de PP2-A1**

*Ce modèle de repliement de PP2-A1 a été réalisé à l'aide du logiciel I-TASSER. La partie bleue représente la partie N-terminale de la protéine, partie variable et qui pourrait contenir un domaine d'interaction avec les ARN. Le reste de la protéine est composé de feuillets  $\beta$ .*



**Figure 16: Modèle de structure tridimensionnelle de PP2-A2**

*Ce modèle de repliement de PP2-A2 a été réalisé à l'aide du logiciel I-TASSER. Ici la partie N-terminale est beaucoup plus courte, la protéine est composée essentiellement de feuillets  $\beta$ .*

variable, pouvant contenir des domaines d'interaction protéine-protéine, comme des domaines SKIP, ou des domaines TOLL. Le gène le plus exprimé de la famille est *AtPP2-A1* (At4g19840). C'est également celui-ci qui a été le plus étudié jusqu'à présent (Zhao *et al.*, 2005, Mustroph *et al.*, 2009).

#### IV.2.3 La protéine PP2-A1

*PP2-A1* est un gène codant pour une protéine de 26 kDa (Figure 15). La protéine possède la capacité de s'auto-assembler, et peut former des oligomères pouvant aller jusqu'à  $n=24$  *in vitro* (Beneteau, 2008, Douville, 2010). C'est une lectine, ce qui signifie qu'elle peut reconnaître des sucres. Des expériences de glycan-array ont montré qu'elle pouvait interagir de façon spécifique avec plusieurs sucres: Le chitotriose, le mannose à N-glycanes, et un acide neuraminique particulier, l'acide sialique 9-acyl-N-acetylneuraminique. De plus les analyses de données de transcriptome et de translatome ont montré que la protéine était l'une des plus exprimées et des plus traduites dans les cellules compagnes (Mustroph *et al.*, 2009). Des expériences réalisées sur des pucerons montrent que PP2-A1 a une action sur la fertilité des pucerons, en diminuant celle-ci (Beneteau *et al.*, 2010). PP2-A1 pourrait donc avoir un rôle à jouer dans les mécanismes de défense de la plante au sein du phloème. Des expériences de Far Western ont montré que PP2-A1 pouvait interagir avec au moins une dizaine de protéines de sève phloémienne (Beneteau *et al.*, 2010). De plus, PP2-A1 est une lectine qui interagit avec le N-acétyl-glucosamine, et elle pourrait donc également interagir avec des protéines glycosylées.

#### IV.2.4 La protéine PP2-A2

PP2-A2 est une protéine plus courte que PP2-A1, elle ne fait que 18 kDa (Figure 16). Elle possède une extension N-terminale très courte, ce qui fait que la protéine est constituée quasi exclusivement de feuillets  $\beta$ . Dans le génome d'*Arabidopsis*, le gène de *PP2-A2* est situé en tandem répété direct par rapport à *PP2-A1*, il est probable que l'un soit une duplication de l'autre. Ce gène s'exprime également dans le complexe CC-TC chez *Arabidopsis*, son niveau d'expression semble toutefois plus faible que celui de *PP2-A1*, sur la base d'analyses transcriptomiques réalisées sur *Arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2005, Mustroph *et*

*al.*, 2009). Aucune fonction de lectine n'a été identifiée pour PP2-A2, la protéine s'agrège trop lorsqu'elle est produite *in vitro*, empêchant de réaliser les expériences de glycan-array (Douville, 2010).

#### IV.2.5 Hypothèses sur le rôle des PP2

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour le rôle des PP2:

1) Les PP2 pourraient avoir un rôle de protéines structurales dans le phloème. En se basant sur les expériences d'immunolocalisation précédemment réalisées chez *Cucurbita maxima* (Smith *et al.*, 1987), les PP2 étant colocalisées avec les protéines P (Read & Northcote, 1983a), l'hypothèse de PP2 en tant que protéine structurale du phloème s'imposait. D'autre part, les PP2 se retrouvent chez de très nombreuses espèces de Dicotylédones, cette observation en fait de bons candidats pour être des constituants des protéines P. Ce n'est que très récemment en 2010 et 2011 que des protéines SEO ont été caractérisées chez les dicotylédones autres que les Fabacées et que cette hypothèse a été remise en question (Ruping *et al.*, 2010).

2) Les PP2 pourraient intervenir dans la défense des plantes. Toutes les PP2 caractérisées jusqu'à présent ont des propriétés de lectine, pouvant reconnaître des sucres comme le chitotriose, qui est un dérivé de la chitine, un sucre que l'on retrouve dans la paroi des champignons (Allen, 1979). D'autres lectines ayant les mêmes propriétés, par exemple la protéine appelée WGA (Wheat Germ Agglutinin), interviennent en effet dans l'inhibition de la croissance des hyphes. D'autre part, chez *C. maxima*, les PP2 forment des filaments avec les PP1 et pourraient ainsi bloquer le mouvement des champignons et des bactéries (Read & Northcote, 1983b). Par ailleurs, des expériences réalisées sur pucerons ont montré que quand les pucerons ingéraient PP2-A1, leur croissance était inhibée (Beneteau *et al.*, 2010). D'autres expériences menées en 2011 (Zhang *et al.*, 2011) ont montré que des plantes surexprimant *PP2-A1* étaient moins colonisées par les pucerons, montrant ici un rôle de PP2-A1 dans la défense de l'organisme.

3) Les PP2 peuvent avoir un rôle dans le trafic de macromolécules de cellule à cellule et/ou le « shuttling » intracellulaire. PP2-A1 peut reconnaître de nombreuses protéines dans la sève phloémienne. Elle pourrait donc avoir un rôle dans le guidage de macromolécules dans les flux de sève. A une autre échelle, les PP2 reconnaissent des motifs N-acétyl-glucosamine (Beneteau *et al.*, 2010). Il est possible que les PP2 interagissent avec d'autres protéines glycosylées dans un transport entre noyau et cytosol.

### IV.3. Autres familles remarquables

D'autres familles de protéines spécifiques du phloème ont été décrites dans la littérature. Dans notre étude nous nous sommes intéressés à plusieurs d'entre elles intervenant soit dans le transport systémique de macromolécules, soit dans l'export des sucres.

#### IV.3.1 Les RTM

Les protéines RTM, pour "restricted TEV movement", sont des protéines qui interviennent de façon spécifique dans la restriction du mouvement du virus *Tobacco Etch Virus* (TEV). Trois protéines de la classe RTM ont été identifiées à ce jour. RTM1 est décrite comme étant une jacaline, une lectine intervenant dans la réponse au jasmonate. RTM2 quant à elle possède des domaines HSP (Heat Shock Protein) (Chisholm *et al.*, 2001). RTM3 a été caractérisée plus récemment, c'est une protéine à domaine MATH (Meprin and TRAF homology) (Cosson *et al.*, 2010a, Cosson *et al.*, 2010b). Les gènes *RTM1*, *RTM2* et *RTM3* sont strictement exprimés dans le phloème et les observations décrites dans la littérature suggèrent pour RTM1 et RTM2 qu'elles sont localisées dans les TC (Chisholm *et al.*, 2001). Le système RTM est tout à fait remarquable car il ne fait intervenir ni une réponse hypersensible, ni une réponse systémique acquise de la plante. Dans les plantes possédant une version active de RTM, le virus est présent et se reproduit au sein du phloème, mais tant que le système RTM est actif, le virus ne peut se déplacer. Le système RTM est donc un très bon exemple de système mettant en jeu des protéines agissant de façon coordonnée dans le phloème pour limiter le mouvement de macromolécules, ici un virus, à longue distance dans la plante.

#### IV.3.2 RCI2A

*RCI2A* (*RARE COLD INDUCIBLE 2A*) est un gène codant pour une petite protéine membranaire de 6kDa qui intervient dans la signalisation en réponse à des stress abiotiques (Capel *et al.*, 1997, Medina *et al.*, 2001). Elle est exprimée au niveau des cellules de garde, mais aussi au niveau des vaisseaux conducteurs. Sa petite taille lui permet de passer par les plasmodesmes. L'utilisation de cette protéine en fusion avec une protéine fluorescente a

permis de réaliser des marquages de membranes de cellules compagnes et de tube criblés chez le tabac et chez *Arabidopsis* (Thompson & Wolniak, 2008).

#### IV.3.2 NHL26

NHL26 est une protéine d'*Arabidopsis*, codée par l'orthologue le plus proche du gène de céleri AgHIN1 identifié lors d'une étude transcriptomique réalisée sur phloème de céleri (Vilaine *et al.*, 2003). Elle appartient à la famille NDR/HIN1 -like (Zheng *et al.*, 2004). Il s'agit d'une protéine membranaire localisée au niveau des plasmodesmes, qui interviendrait dans la régulation du transport des sucres (Vilaine *et al.*, soumis). Les plantes surexprimant *NHL26* vont accumuler le saccharose dans les feuilles. Ces plantes accumulent les anthocyanes dans les feuilles et ont une croissance retardée par rapport à une plante sauvage.

### ***V. Objectifs de la thèse***

Le phloème est un tissu complexe responsable du transport de sucres et de macromolécules. Parmi ces macromolécules, de nombreuses protéines et ARN servent de signaux pour contrôler le développement de la plante. Les protéines PP2 sont des protéines exprimées dans les cellules compagnes, et qui existent chez de nombreuses Dicotylédones (Dinant *et al.*, 2003). Ces protéines ont des fonctions de lectine, peuvent se lier à des protéines et possèdent la capacité de former des oligomères. Cependant, leur rôle n'a encore jamais été élucidé au sein du phloème.

Les objectifs de ma thèse sont donc:

1) D'étudier la fonction des protéines PP2 d'*Arabidopsis thaliana*, en se focalisant sur 2 membres codées par les gènes *AtPP2-A1* et *AtPP2-A2*. Nous voulons déterminer si ces gènes ont un rôle dans la signalisation et/ou dans le transport de macromolécules à longue distance, et/ou s'il s'agit d'un rôle dans le transport de cellule à cellule, des cellules compagnes vers les tubes criblés. Pour cela nous avons besoin de connaître la localisation subcellulaire des protéines dans le phloème, et particulièrement dans le complexe CC/TC.

2) De rechercher les partenaires de ces protéines au sein du phloème. Des expériences de Far Western ont en effet montré que PP2 A1 interagissait avec des partenaires protéiques dans la sève phloémienne. Connaître leur identité nous permettrait de savoir si PP2-A1 participe à des processus de signalisation dans le phloème.

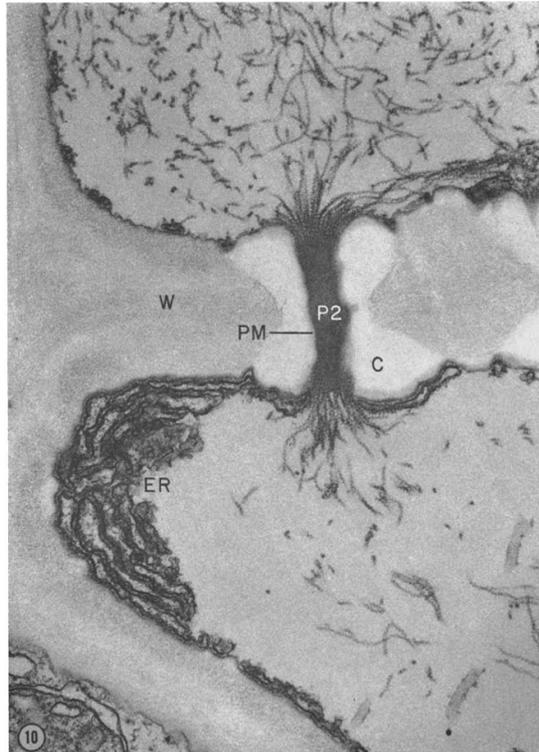
3) De produire des plantes dérégulées pour l'expression de ces deux gènes: des lignées exprimant des microARN pour diminuer le niveau d'expression de ces gènes, ou à l'inverse, des lignées présentant un niveau accru d'expression de ces gènes, ceci pour étudier la fonction des protéines PP2. En effet, des études réalisées par Julie Beneteau lors de sa thèse sur des lignées dérégulées dans l'expression de *PP2-A1* par une approche d'ARN interférence (RNAi) ont montré que ces plantes présentaient un phénotype très pléiotrope, avec des altérations de développement, des problèmes de croissance et de fertilité. Cependant le phénotype altéré de ces plantes n'apparaît pas de façon régulière. De plus, nous ne sommes pas sûrs que d'autres gènes de la famille des PP2 ne soient pas dérégulés. C'est pourquoi nous voulons approfondir ces analyses par l'étude de lignées exprimant des microARN dérégulant spécifiquement l'expression de *PP2-A1* et *PP2-A2*.

Pour répondre à ces questions, nous avons eu besoin de créer des outils pour localiser PP2-A1 et PP2-A2 dans les CC et dans les TC. Ceci nous a amené à mener une description plus précise *in vivo* de l'organisation subcellulaire des CC et des TC chez *Arabidopsis*, ce qui n'était pas disponible. Les TC et les CC étant des cellules très modifiées, nous avons dû développer une méthode pour visualiser les structures existantes et pour pouvoir interpréter nos résultats. Pour réaliser ces analyses nous avons eu recours principalement à la microscopie confocale à balayage laser, avec laquelle nous utiliserons *PP2-A1* exprimée spécifiquement dans les cellules compagnes, comme marqueur des CC ce qui nous permettra dans un premier temps de repérer ces cellules dans le tissu. Dans un second temps, nous avons utilisé des marqueurs subcellulaires connus pour une description précise de leur localisation dans ces cellules.

Des immunolocalisations ont déjà été réalisées au laboratoire et montrent que PP2-A1 forme des agrégats dans les tubes criblés. Nous avons donc souhaité identifier avec précision la nature de ces structures. D'autre part, des analyses de protéomes de sève réalisées au laboratoire ont montré qu'on ne retrouvait pas de PP2 dans la sève phloémienne. Cela signifie que la protéine n'est pas transportée à longue distance dans le phloème, mais qu'elle est ancrée à des structures dans les tubes criblés, hypothèse que nous voulons confirmer.

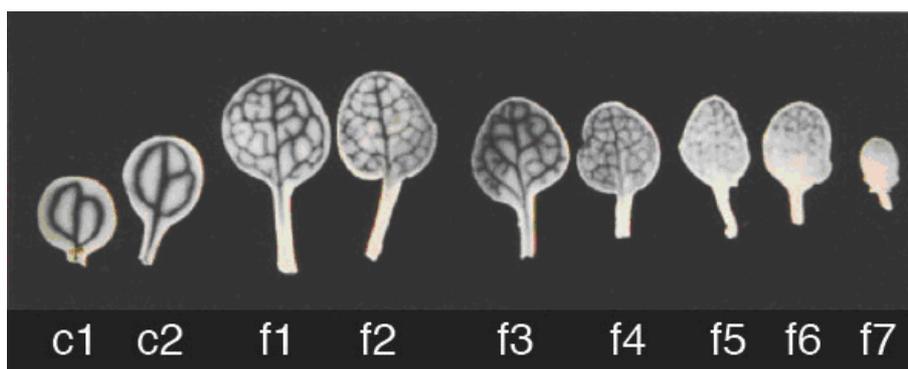
L'objectif final de ces travaux est d'obtenir une image plus précise de l'organisation fonctionnelle du complexe CC/TC chez *Arabidopsis*, d'identifier la localisation précise de PP2-A1 au sein de ce complexe et de mieux comprendre le rôle de PP2-A1 dans le phloème.

# Chapitre 1



**Figure 17: Observation en microscopie électronique à transmission d'une coupe longitudinale d'un élément criblé différencié**

Détails d'une plage de crible permettant de visualiser des dépôts de callose à l'extérieur du pore (en blanc) caractéristiques d'un tube criblé différencié. Des filaments de protéines P sont également identifiables dans le crible. Observation en MET (X62 000) chez *Nicotiana tabacum*, (D'après Esau, 1967). ER: réticulum endoplasmique. PM: membrane plasmique. P2: pore d'un crible. W: paroi. C: callose.



**Figure 18: Profil d'expression du gène SUC2 dans les feuilles d' Arabidopsis**

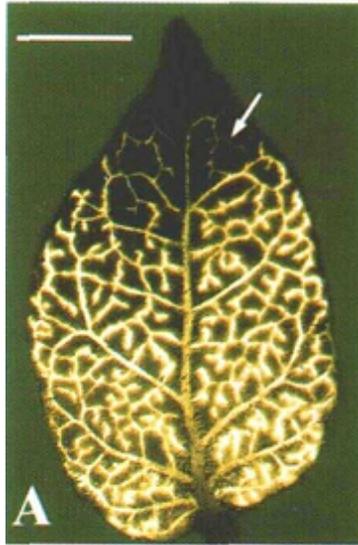
Activité de la  $\beta$ -glucuronidase dans les feuilles de rosette d'une lignée d'*Arabidopsis* exprimant le gène rapporteur GUS exprimé sous le contrôle du gène SUC2. De gauche à droite, les 2 cotylédons et des feuilles de rosettes sources (1 à 4), puis en cours de transition (5-6) et puis (7). c: cotylédons, f: feuilles. (D'après Truernit, et al., 1995)

## ***I. Cytologie du phloème: vers une description détaillée de son organisation subcellulaire in vivo***

L'étude du phloème a très largement bénéficié du développement de la microscopie électronique à transmission (Figure 17), qui a permis d'obtenir une description très fine et très précise des cellules du phloème (Esau, 1969). Mais cette approche présente un certain nombre de limitation:

- Existence d'artefacts de fixation car les tubes criblés sont sous de fortes pressions: la présence des protéines P au niveau des plages de cribles pourrait résulter de l'action de la pression au niveau du phloème, et ne pas refléter leur localisation dans le tissu non fixé.
- Existence d'artefacts liés au fait que les tubes criblés ont mis en place des mécanismes de colmatage en cas de blessure, notamment la formation de callose dans les cribles et l'apparition rapide des bouchons de protéines P qui peuvent refléter la réponse à la blessure et modifier l'organisation *in vivo* des cellules du phloème.
- L'identification des structures subcellulaires présentes dans les tubes criblés est complexe: on trouve de nombreux agrégats, d'autre part, il est difficile d'observer les structures membranaires des organites présents dans les tubes criblés, comme les amyloplast. Il existe également des structures spécifiques comme les *clamps-like-structure* du RE décrites par Ehlers (Ehlers *et al.*, 2000).

Plus récemment le développement de la microscopie confocale à balayage laser a permis de réexaminer la biologie cellulaire du phloème. Par rapport à la microscopie optique et les observations en transmission, la microscopie confocale permet d'améliorer la résolution des échantillons en profondeur, ce qui est adapté pour le phloème, un tissu très profond. D'autre part, les observations peuvent se faire *in vivo*, ce qui diminue fortement le nombre d'étapes de préparation (fixation, inclusions) qui pourraient entraîner des artefacts, et ainsi fausser les observations. Le premier objectif de ma thèse a été de développer une méthodologie chez *Arabidopsis thaliana*, permettant d'observer le phloème de façon précise et rapide *in vivo*, principalement au niveau des organes sources que sont les feuilles.



**Figure 19: Marquage du phloème avec un traceur symplasmique le 5,6 CFDA**

*Déchargement de 5,6 CFDA dans une feuille de nicotiana benthamiana lors de la transition source-puits. (Roberts et al., 1997).*

## **I.1 Le promoteur *SUC2*, un outil précieux pour l'observation du phloème**

Le gène *SUC2* code un transporteur de saccharose présent dans les cellules compagnes et impliqué dans le chargement du phloème (Figure 18). Ce gène est fortement exprimé tout au long de la vie de la plante. Des études de promoteur ont montré que son expression était restreinte aux CC du phloème (Truernit *et al.*, 1995), même si des analyses plus récentes, qui utilisent un promoteur *SUC2* plus long (2300pb) montrent que le gène peut aussi être exprimé au niveau de l'épiderme de la pointe racinaire de plantules cultivées *in vitro* (Thompson & Wolniak, 2008). Ce gène est indispensable pour la plante ; en effet, des mutants d'insertion nuls *suc2* ont un phénotype très altéré, les plantes sont naines et présentent une forte stérilité (Srivastava *et al.*, 2008). Le promoteur de ce gène a été utilisé très largement pour diriger l'expression de protéines dans les cellules compagnes, par exemple pour des études du déchargement de la GFP dans le phloème de racine d'*Arabidopsis* (Stadler *et al.*, 2005).

## **I.2 Quelques colorants pour l'observation du phloème**

Une caractéristique des tubes criblés est la présence de plages de cribles dans lesquelles se trouvent des dépôts de callose. La callose est impliquée, lors d'un stress, dans l'obstruction des pores (Evert 1990; Froelich *et al.*, 2011). En microscopie, la callose est facilement observable avec un colorant spécifique, le bleu d'aniline qui permet d'identifier aisément les tubes criblés. Une autre classe de colorants a été utilisée spécifiquement pour observer les flux dans le phloème, et regroupe la 5-6 carboxyfluorescéine (5,6 CFDA) (Figure 19), et l'acide hydroxypyrene-trisulphonique (HPTS). Ces fluorochromes sont transportés dans le flux de masse du phloème, et sont visibles depuis le lieu où ils sont chargés vers les organes puits où ils sont déchargés (Roberts *et al.*, 1997 ; Oparka *et al.*, 1994 ; Wright *et al.*, 1996)

**Tableau 2: Lignées d'*Arabidopsis* utilisées exprimant des marqueurs subcellulaires fluorescents**

Lignées utilisées disponibles	Motif d'adressage	Nature de la protéine servant de marqueur	Référence
<i>p35S:PDLP1:GFP</i>	Protéine de fusion avec PDLP1	Protéine de plasmodesme, de fonction inconnue	Thomas <i>et al.</i> , 2008
<i>p35S:HDEL:YFP</i>	Fusion avec le peptide HDEL	Signal de localisation au RE	Nelson <i>et al.</i> , 2007
<i>p35S:RbcS:YFP</i>	Fusion avec 77 aa de la petite sous-unité de la RuBisCO	Enzyme	Nelson <i>et al.</i> , 2007
<i>p35S:MBD:GFP</i>	Fusion avec MBD (MDB : microtubule binding domain)	Domaine de liaison aux microtubule de MAP4	Camilleri <i>et al.</i> , 2002
<i>p35S:FABD2:GFP</i>	Fusion avec ABD2 (Actin Binding Domain 2)	Fimbrine (protéine de liaison à l'actine)	Voigt <i>et al.</i> 2005
<i>p35S:γTIP:YFP</i>	Fusion avec γTIP (Tonoplast Intrinsic Protein)	Aquaporine	Nelson <i>et al.</i> , 2007
<i>p35S:H2B:RFP</i>	Fusion avec H2B	Histone	Nelson <i>et al.</i> , 2007
<i>pSUC2:RCI2AYFP</i> <i>p35S:LTI6B:GFP</i>	Fusion avec RCI2A ou LTI6B	Protéines membranaires	Thompson <i>et al.</i> , 2008
<i>P35S:ScCOX4:YFP</i>	Fusion avec 29 aa de ScCOX4	COX4 : Cytochrome C oxydase	Nelson <i>et al.</i> , 2007
<i>pSEOR1:SEOR1:GFP</i>	Fusion avec SEOR1 SEO: Sieve Element Occlusion	Protéine P	Froelich <i>et al.</i> , 2011
<i>pSEOR2:SEOR2:GFP</i>	Fusion avec SEOR2	Protéine P	Froelich <i>et al.</i> , 2011
<i>pRTM1:GFP:RTM1</i>	Fusion avec RTM1	Jacaline	Chisholm <i>et al.</i> , 2001
<i>pRTM2:RTM2:GFP</i>	Fusion avec RTM2	Chaperone, small heat shock protein	Chisholm <i>et al.</i> , 2001

**Tableau 3: Caractéristiques spectrales des protéines fluorescentes utilisées**

Protéine	Laser utilisé	λ Max excitation	λ Max émission
CFP (mCerulean)	Diode 405 nm	433 nm	475 nm
GFP	Argon 488 nm	488 nm	507 nm
YFP (mVenus)	Argon 488 ou 514 nm	515 nm	528 nm
mCitrine	Argon 488 ou 514 nm	516 nm	529 nm
RFP	Hélium Néon 543 nm	584 nm	607 nm
mCherry	Hélium Néon 594 nm	587 nm	610 nm

**Tableau 4: Lignées transgéniques générées dans le cadre de cette étude**

Constructions	Nombre de lignées générées	Caractéristiques, antibiotique de sélection
<i>pSUC2:PP2-A1:GFP</i>	10	Phénotype normal, kanamycine
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i>	15	Phénotype normal, Basta
<i>pSUC2:PP2-A1:mcherry</i>	6	Expression faible, hygromycine
<i>pSEOR2:PP2-A1:GFP</i>	7	Phénotype normal, kanamycine
<i>pSUC2:GFP:PP2-A1</i>	8	Expression faible dans CC, hygromycine
<i>pSUC2:PP2-A2:YFP</i>	2	Phénotype normal, kanamycine
<i>pSUC2:PP2-A2:mcherry</i>	6	Expression faible, hygromycine
<i>pSUC2:GFP</i>	13	Expression variable, hygromycine
<i>pSUC2:PP2-A1</i>	5	hygromycine, kanamycine

## ***II. Création de matériel biologique pour l'observation du phloème***

### **II.1 Objectifs**

Un des objectifs de ce travail a été de développer une technique permettant l'observation *in vivo* de phloème dans la feuille d'*Arabidopsis* et d'identifier des critères anatomiques permettant de reconnaître les différents types cellulaires du phloème. Nous avons utilisé l'espèce modèle *Arabidopsis*; car il existe aussi de nombreuses lignées chez cette plante exprimant des protéines de fusion (Tableau 2). Il s'agit également de décrire les structures subcellulaires des cellules compagnes et de certains organites des tubes criblés. Enfin, une fois ces données acquises, il s'agit de déterminer la localisation de PP2-A1 dans les cellules compagnes et dans les tubes criblés, et de comparer cette localisation à celle des protéines SEOR1 et SEOR2, protéines P d'*Arabidopsis* et potentiels partenaires de PP2-A1.

### **II.2 Plantes transgéniques utilisées et créées:**

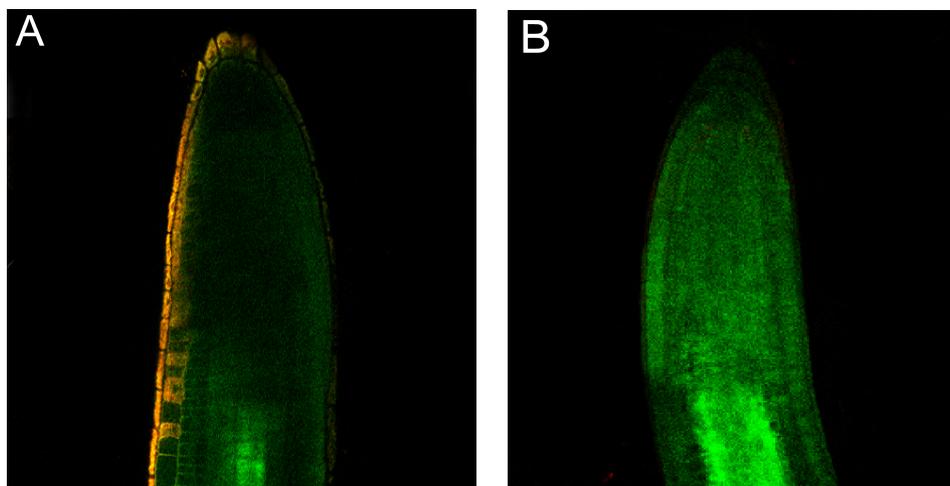
Les observations réalisées sur des plantes issues de croisements ont été faites sur les plantes F1 (Tableau 5). Pour les observations réalisées sur des racines et des feuilles, celles-ci ont été répétées au moins sur une dizaine de plantes, et plusieurs feuilles par plante et par lignée. Les observations réalisées sur les plantes créées pendant ma thèse ont été faites sur des lignées homozygotes (génération T3, Tableau 4).

## ***III. Description des cellules du phloème au moyen de protéines étiquetées avec des marqueurs fluorescents***

Le phloème présente une organisation différente dans la racine et dans les feuilles. Dans les jeunes feuilles, le phloème est relativement accessible, car il y a peu de couches cellulaires à traverser avant d'atteindre la profondeur du phloème. De même, au niveau de la pointe racinaire, on peut assez facilement observer le protophloème. Dans les feuilles matures, par contre, le phloème est beaucoup plus profond. Une cuticule et des couches de parenchyme mésophyllien protègent le phloème. De plus, la chlorophylle présente dans les chloroplastes empêche de visualiser la mCherry et la RFP (Tableau 3). Nous avons cependant décidé d'observer du phloème de feuille, car c'est dans cet organe que se réalise le chargement en sucres et en macromolécules, c'est donc dans les feuilles que le phloème sera le plus intéressant à étudier.

**Tableau 5: Récapitulatif des croisements réalisés dans le cadre de cette étude et des caractéristiques phénotypiques des plantes obtenues**

Croisement	Caractéristiques des F1
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>pSUC2:PP2-A2:YFP</i>	Augmentation de la biomasse, croissance modifiée
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:GFP<sub>HDEL</sub></i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:γTIP:YFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:PDLP1:GFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:ABD2:GFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:ScCOX<sub>429</sub>:YFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:GmMan<sub>149</sub>:GFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:H2B:RFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:MBD:GFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>p35S:SUrubisco<sub>77AA</sub>:YFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>pSEOR1:SEOR1:GFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>pSEOR2:SEOR2:GFP</i>	Pas de phenotype altéré
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>pRTM1:GFP:RTM1</i>	Pas d'observations réalisées
<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i> x <i>pRTM2:RTM2:GFP</i>	Pas d'observations réalisées



**Figure 20: Observation de la diffusion de la GFP dans la pointe racinaire de lignées *pSUC2:GFP***

Profil de fluorescence observé dans deux lignées indépendantes exprimant une construction *pSUC2:GFP* (GFP soluble) et observation du déchargement de la GFP dans la racine principale. En B: le déchargement de la GFP est plus importante dans la pointe racinaire car dans la lignée *pSUC2:GFP* #5.4, l'expression de la GFP est plus importante. En A, le déchargement est moins important dans la pointe racinaire (Lignée *pSUC2:GFP* #3.4)

entre des marqueurs subcellulaires connus et des protéines fluorescentes. Nous voulons observer en microscopie confocale des structures subcellulaires déjà observées en MET, comme les protéines SEOR, et évaluer les différences entre ces deux types d'observation. Par ailleurs, nous voulons déterminer la localisation de protéines phloémiennes comme la protéine PP2-A1, les protéines RTM1 et RTM2 qui n'ont jamais été observées dans les tubes criblés de feuilles, ainsi que des protéines membranaires comme RCI2A. Nous avons utilisé des marqueurs déjà connus et décrits dans la littérature (Nelson *et al.*, 2007, Thompson *et al.*, 2008), pour visualiser les organites dans les cellules du phloème.

### III.1 Observation du phloème dans la racine

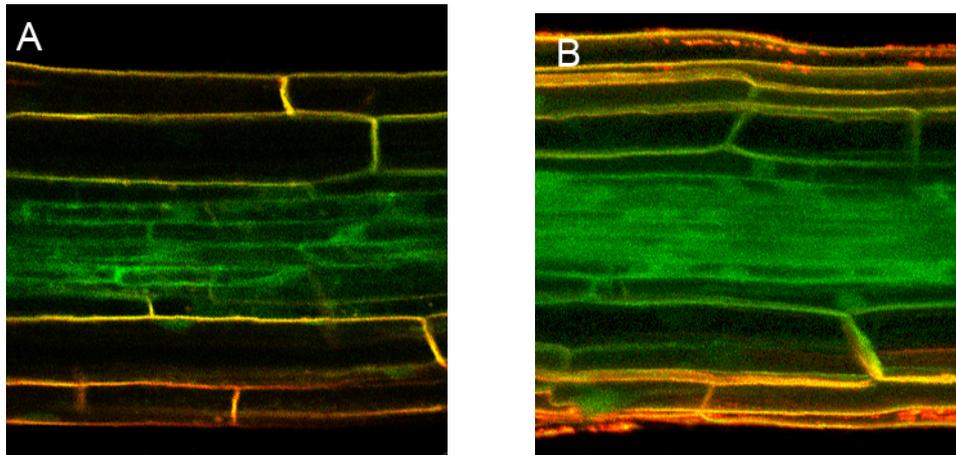
La racine est un bon modèle d'étude pour le phloème. En effet, au niveau de la pointe racinaire il est possible d'observer le protophloème. Dans une racine jeune (plante âgée de moins de 6 jours après semis) on peut également observer le métaphloème sans difficulté majeure, la racine n'étant pas encore trop épaisse. La plupart des observations de phloème dans les racines sont réalisées sur des plantules *in vitro*. C'est le cas des observations qui ont été faites sur les mutants *apl*, *octopus*, ou dans les lignées exprimant *PSUC2:GFP* (Bonke *et al.*, 2003, Truernit *et al.*, 2012, Stadler *et al.*, 2005). Lors de nos expériences, nous n'avons pas réussi à observer la CFP dans les racines. Nous pensons que la fluorescence de cette protéine dans le phloème n'est pas suffisante pour être observée dans la racine.

#### III.1.1. Méthodes d'observation

Les observations ont été réalisées sur des plantules *in vitro* 4 et 6 jours après semis. Nous avons observé le phloème après la zone de différenciation, quand nous avons du métaphloème différencié, sauf dans le cas d'observation de pointes racinaires (observations du déchargement de la GFP). Les racines ont été observées entre lame et lamelle, dans de l'eau ou dans un colorant vital comme le FM4-64, qui marque les membranes des cellules, et fluoresce dans le rouge ( $\lambda_{\max}$  Em: 730 nm), permettant l'observation d'une protéine fluorescente comme la GFP ou l'YFP ( $\lambda_{\max}$  Em: 508 nm).

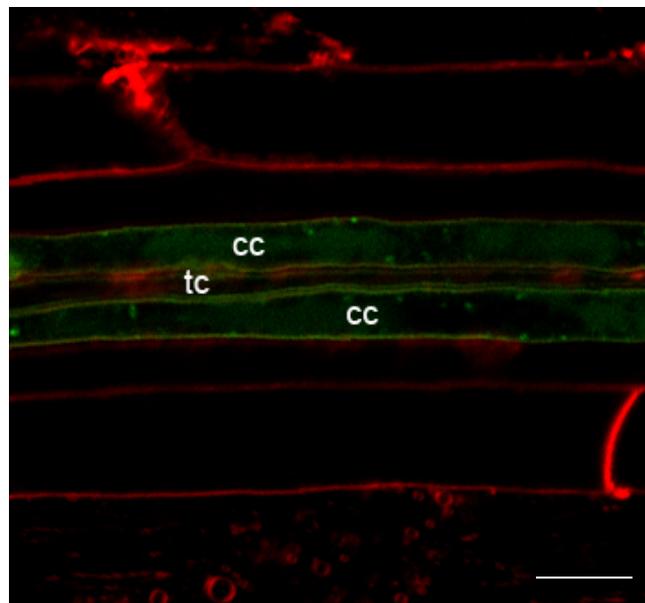
#### III.1.2. Localisation de différents marqueurs subcellulaires

- a) Observation de la GFP soluble sous le contrôle d'un promoteur spécifique des CC



**Figure 21: Comparaison de la fluorescence et de la diffusion de la GFP dans la racine de différentes lignées pSUC2:GFP**

Observation de la fluorescence dans des plantes exprimant une construction pSUC2:GFP (soluble) au niveau d'une racine. En A, la lignée #3.4 montre une fluorescence restreinte au tissu vasculaire. En B, dans la lignée # 5.4, on observe que la GFP a diffusée jusqu'aux cellules du parenchyme cortical. Cette deuxième lignée n'a pas été retenue pour étudier l'organisation du phloème dans la racine. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X20.



**Figure 22: Observation du phloème dans la racine d'une lignée pSUC2:mCitrine:RCI2A**

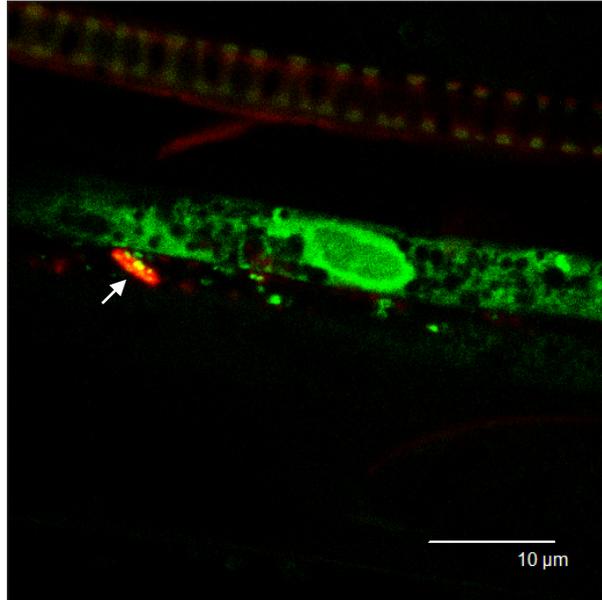
Fluorescence révélant la localisation de la protéine de fusion mCitrine-RCI2A dans du métaphloème dans une racine. On différencie clairement la membrane des CC de celle du TC. D'autre part, on voit l'organisation très simple du phloème dans une racine jeune: un pôle phloémien comprend 1 tube criblé et 2 cellules compagnes. CC: cellule compagne ; tc: tube criblé. Les observations ont été réalisées après la zone de différenciation, sur une plantule ayant poussé in vitro 4 jours après semis. Echelle: 10  $\mu$ m. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X20.

Les lignées exprimant la construction *pSUC2:GFP* déjà existantes (Stadler et al., 2005) sont des lignées réalisées dans un fond génétique C24. Lors de ma thèse, j'ai utilisé l'écotype Col-0. Nous avons donc réalisé une nouvelle construction avec un promoteur *SUC2* et une GFP soluble, que nous avons introduite dans des plantes col-0 sauvage.

Afin de confirmer que le promoteur de 1400 pb que nous avons cloné conférait une expression au niveau des cellules compagnes, conformément à ce qui a été publié précédemment (Stadler *et al.*, 2005, Thompson *et al.*, 2008), nous avons observé des plantes des lignées *pSUC2:GFP* générées avec cette nouvelle construction. Cette construction contrôle la production d'une GFP soluble, qui peut diffuser de cellule à cellule par les plasmodesmes. Selon les transformants obtenus, nous avons observé une fluorescence plus ou moins forte, révélant probablement des effets de position liés au site d'insertion du transgène. Dans les lignées dans lesquelles la fluorescence de la GFP était la plus forte, nous avons observé la GFP au niveau d'autres types cellulaires que dans les cellules compagnes du phloème, révélant une diffusion de la GFP de cellule à cellule (Figure 20 & 21). Dans ces lignées, le déchargement de la GFP au niveau de la pointe racinaire est très important, et on observe une fluorescence extrêmement forte. Pour nos études ultérieures, ces lignées ne sont pas exploitables dans la racine. Néanmoins, nous avons pu sélectionner une lignée présentant une expression de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *SUC2* plus faible, ou la localisation de la GFP était restreinte dans les cellules compagnes.

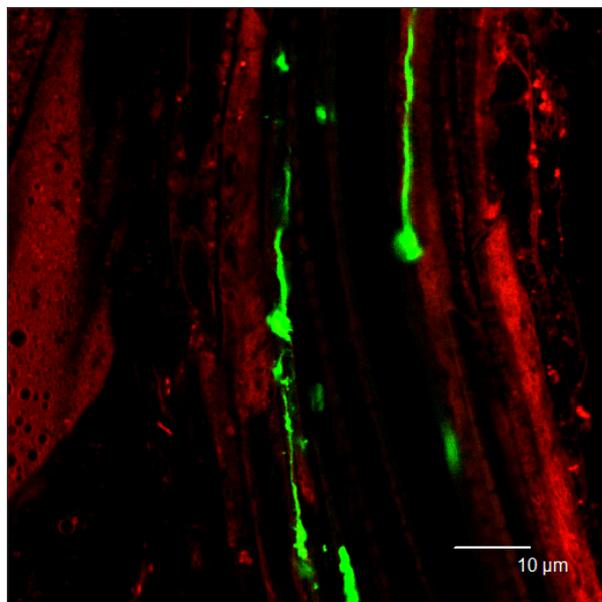
#### b) Observation de la protéine de fusion mCitrine-RCI2A

Nous avons utilisé des plantes de deux lignées exprimant la protéine de fusion mCitrine-RCI2A, soit sous contrôle du promoteur *pSUC2* soit sous contrôle du promoteur du CoYMV (Commelina yellow mottle virus): *pCoYMV-mcitrine-RCI2A*. Ces lignées ont été décrites précédemment (Thompson & Wolniak, 2008) (don de Stephen Wolniak, Université de Maryland). Le promoteur du CoYMV est un promoteur viral conférant une expression constitutive forte dans les tissus vasculaires (Medberry *et al.*, 1992), principalement dans le phloème. Ces deux constructions permettent d'adresser la mCitrine à la membrane plasmique par une fusion traductionnelle avec une protéine membranaire (RCI2A) (fusion de 34 kDa), à la fois dans les cellules des tubes criblés et dans les cellules compagnes, pour la lignée *pSUC2:mcitrine-RCI2A*, et dans l'ensemble des cellules du phloème pour la lignée *pCoYMV:mcitrine-RCI2A*. Ces lignées nous ont permis d'observer l'organisation cellulaire très simple du phloème dans une racine jeune (Figure 22). Dans une racine observée six jours après semis, on observe au niveau du métaphloème deux pôles de phloème. Chaque pôle est



**Figure 23: Observation du phloème dans la racine d'une lignée pSUC2:PP2-A1:GFP**

*Localisation de PP2-A1:GFP dans la racine d'Arabidopsis thaliana. En rouge: marquage de la plage de crible au bleu d'aniline. On voit bien que PP2-A1 est présente dans le cytosol et dans le noyau de la CC, et forme des petits agrégats dans le tube criblé. Flèche: plage de crible. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.*



**Figure 24: Observation du phloème dans la racine d'une lignée pSEOR2:SEOR2:GFP**

*Localisation de SEOR2:GFP dans la racine d'Arabidopsis. On voit ici la présence de filaments se terminant par un bouchon, caractéristiques des protéines P dans les tubes criblés. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X20.*

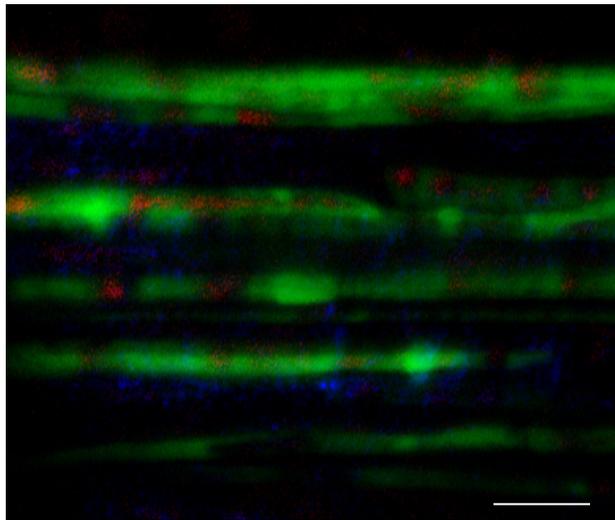
organisé de façon simple, avec 2 cellules compagnes et un tube criblé. Les cellules compagnes apparaissent dans ce cas plus larges que les tubes criblés, alors que nous sommes dans un organe puits. Les tubes criblés sont facilement identifiables par leur petit diamètre, et par leur paroi épaisse, qui apparaît comme un vide entre les membranes. Sur ces observations, on constate que les diamètres moyens pour ces deux types cellulaires sont de l'ordre de 5  $\mu\text{m}$  pour les CC et 2  $\mu\text{m}$  pour les TC.

#### c) Observations de PP2-A1:GFP

La localisation de la protéine PP2-A1 dans le phloème de racine, a été réalisée en observant des plantes de lignées exprimant la construction *pSUC2:PP2-A1:GFP*. Dans les racines, PP2-A1:GFP est localisée dans les cellules compagnes, dans lesquelles elle a une localisation nucléocytoplasmique. Sur certaines images, On voit que PP2-A1 ne marque pas tout le volume du noyau, mais se retrouve à sa périphérie, à proximité de la membrane nucléaire. Au niveau des TC, PP2-A1 forme des agrégats peu abondants dont la localisation est irrégulière. On observe aussi bien la protéine au niveau des plages de cribles que répartie dans la lumière du tube criblé (Figure 23). Toutefois aucun mouvement de PP2-A1:GFP n'a été observé au sein des tubes criblés, ce qui signifie que la protéine est ancrée, vraisemblablement à des membranes. Pour le moment, aucun domaine de fixation spécifique n'a pu être identifié chez PP2-A1, même si on trouve avec le programme DGPI sur le site Aramemnon [<http://aramemnon.uni-koeln.de/>] une prédiction d'ancre GPI pour PP2-A1. Des études complémentaires restent à effectuer pour déterminer comment la protéine reste immobile dans les tubes criblés.

#### d) Les protéines SEOR1 et SEOR2 dans la racine

Nous avons obtenu de Gary Thompson (Université de Pennsylvania State) des graines de lignées exprimant les constructions *pSEOR1:SEOR1:GFP* et *pSEOR2:SEOR2:GFP* (Anstead *et al.*, 2012). Les plantes de ces lignées nous ont permis de localiser les protéines SEOR1 et SEOR2 chez *Arabidopsis*, et d'observer la morphologie de ces protéines *in vivo*. Nous avons constaté que ces deux protéines sont accumulées très précocement dans la racine. On peut voir la fluorescence de la GFP chez des plantules dès le troisième jour après germination. De même, les gènes sont exprimés au niveau du métaphloème dans les tubes criblés en différenciation, mais également au niveau du protophloème.



**Figure 25: Observation du phloème dans la feuille d'une lignée pSUC2:PP2-A1:GFP sans peeling**

*Observation de veine majeure dans une plante de la lignée pSUC2:PP2-A1:GFP dans une feuille sans peeling. En vert: PP2-A1:GFP, rouge: autofluorescence des plastes, bleu: bleu d'aniline. Des observations... confuses. Echelle: 20 $\mu$ m. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X20.*

Nous avons observé des agrégats de deux tailles différentes pour les protéines SEO. En se rapprochant de l'hypocotyle, nous observons des gros amas de protéines P ainsi que des filaments, de même nature que ceux qui ont été décrits très récemment dans la littérature (Anstead *et al.*, 2012) (Figure 24). Au niveau de la pointe racinaire, on observe principalement des petits agrégats de protéines SEOR1:GFP ou SEOR2:GFP. Ces petits agrégats peuvent être fixes, mais nous avons aussi observé dans certains cas des agrégats mobiles dans les tubes criblés, et ce mouvement dans les tubes criblés semblait indépendant de la direction du flux de sève. D'autre part, la vitesse de déplacement de ces agrégats semble bien plus lente que la vitesse présumée du flux de sève. En effet, les petits agrégats de SEOR se déplacent à des vitesses estimées inférieures à 1 µm par seconde, alors que la vitesse estimée du flux de sève est de 20 µm par seconde. Cette observation suggère que le déplacement de ces protéines ne se fait pas de façon passive, mais qu'il est dû à un mécanisme spécifique, dont la nature reste encore à déterminer. Il est possible que les protéines P interagissent avec des protéines ancrées à la membrane plasmique, ce qui expliquerait un tel déplacement dans les TC. Nous ne pouvons pas exclure un ancrage à d'autres constituants des tubes criblés, encore non identifiés.

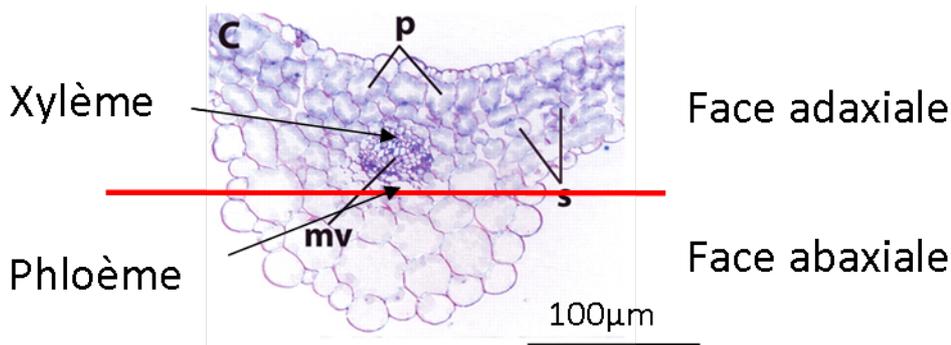
### **III.2 Observation du phloème dans la feuille**

Nous avons restreint notre étude à l'observation de phloème de feuille mature, i.e. « source », dans laquelle le phloème a que un rôle prépondérant dans le chargement en sucre et en macromolécules.

#### III.2.1. Mise au point d'une technique pour l'observation de la feuille

##### a) Observation, sans peeling préalable, de phloème de feuille chez *Arabidopsis*

Nous avons également réalisé des observations de protéines fluorescentes dans le phloème d'*Arabidopsis thaliana* au niveau de feuilles sources. Nos premières expériences consistaient en l'observation de feuille côté abaxial, afin d'être plus proche du phloème. Néanmoins, comme on peut le voir sur la Figure 25 nos observations étaient floues et imprécises. En effet, les couches d'épiderme et de parenchyme présentes perturbent la pénétration et la réflexion de la lumière jusqu'au phloème, ce qui entraîne la diffusion de la fluorescence émise par les protéines fluorescentes. C'est pourquoi nous avons mis au point une technique de préparation des tissus (peeling) chez *Arabidopsis*, en nous inspirant des travaux réalisés par Helle Martens sur le tabac et par Michael Knoblauch sur *Vicia faba* (Knoblauch *et al.*, 1998; Martens *et al.*, 2006).

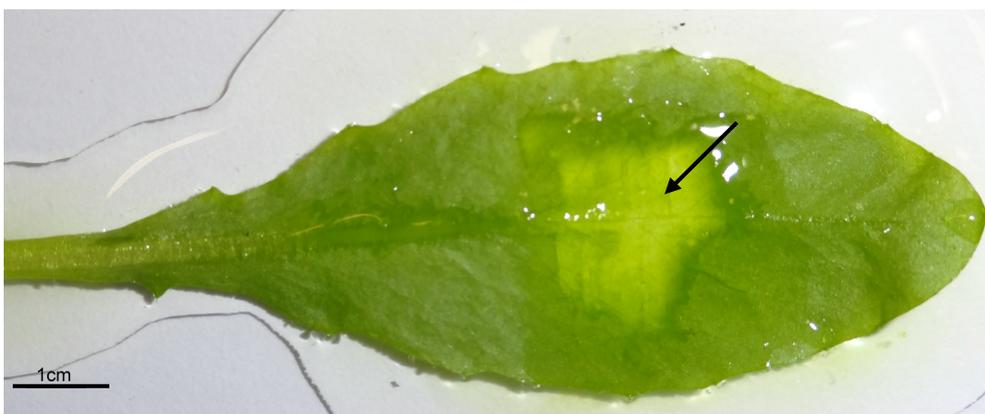


**Figure 26: Coupe transversale de feuille d'Arabidopsis illustrant la profondeur du tissu phloémien.** Schéma présentant le principe de préparation de feuille d'Arabidopsis. La feuille est doucement abrasée sur sa face abaxiale à l'aide d'un scalpel afin de retirer l'épiderme et les couches de parenchyme. (Lin et al., 2003)



**Figure 27: Feuille d'Arabidopsis d'une plante âgée de 6 semaines avant préparation pour l'observation en microscopie confocale.**

La feuille a été mise sur une lame, puis une goutte d'eau a été ajoutée. Cette goutte d'eau permet aux débris cellulaires de ne pas se coller sur les tissus à observer. La préparation est optimale avec des feuilles matures, prélevées sur des plantes âgées d'environ six semaines cultivées en serre, en conditions de jours longs.



**Figure 28: Observation d'une feuille d'Arabidopsis mature après préparation pour observation du phloème**

Après préparation, la zone pelée (flèche) apparaît plus claire, et on peut clairement observer par transparence le réseau de nervure. On constate que la région pelée chevauche différents niveaux de nervure (nervure principale, ordre, II, III et nervures mineures). La zone pelée est ensuite découpée, transférée entre lame et lamelle après montage dans de l'eau, et observée au microscopie confocale à balayage laser SP2.

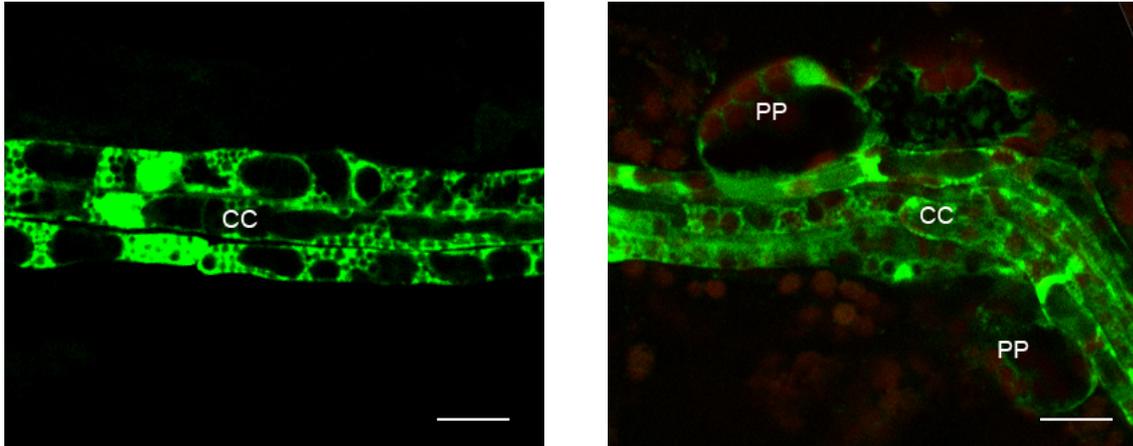
## b) La préparation de feuilles d'*Arabidopsis*

Afin de mieux observer les cellules du phloème, nous avons mis au point une technique de préparation des feuilles, qui permet en microscopie de rapprocher l'objectif des tissus vasculaires. Cette technique permet de raccourcir significativement le trajet optique en microscopie confocale et d'améliorer significativement la résolution et d'avoir moins de perte de signal par diffusion. (Figure 26).

La technique pour préparer une feuille d'*Arabidopsis* consiste à prélever une feuille mature, si possible n'ayant pas encore fini sa croissance. Il est possible d'observer des feuilles complètement matures voire sénescentes, mais la préparation est plus délicate, car les tissus seront plus mous, et donc plus délicats à manipuler. Sur une lame de verre, il faut mettre la feuille côté abaxial au dessus, puisque nous allons retirer l'épiderme et les premières couches de cellule de ce côté. Cette préparation est plus simple à réaliser à l'aide d'une loupe binoculaire, mais elle est aussi réalisable sans loupe.

Le protocole est le suivant:

- Ajouter une goutte d'eau sur la feuille. Cela permet de mieux voir le tissu à préparer (Figure 27). A l'aide d'un scalpel, il faut passer la lame sur la feuille, en ne maintenant qu'une très faible pression sur la feuille. En appuyant trop fort, on déchire la feuille, au lieu de simplement la peler. Ne pas hésiter à passer la lame plusieurs fois, jusqu'à ce que des déchirures de l'épiderme soient visibles. Sur une feuille jeune, il est possible de retirer des grands morceaux d'épiderme très simplement en utilisant cette technique.
- Une fois l'épiderme retiré, il reste les premières couches de parenchyme à enlever. Pour retirer celles-ci, de la même façon, il faut gratter le plus légèrement possible à l'aide d'un scalpel. C'est une étape délicate dans la mesure où un grattage trop fort pourrait abîmer les tissus vasculaires.
- Une fois la feuille pelée, avec épiderme et parenchyme lacuneux retirés (Figure 28), il faut rincer la feuille, pour retirer tous les morceaux d'épiderme et de cellules qui peuvent gêner les observations. Pour cela, il faut rincer la feuille quelques secondes dans de l'eau stérile. Une autre possibilité consiste à ne prélever qu'un petit morceau de la feuille à observer, et rincer celui-ci dans de l'eau stérile.
- Une fois la feuille rincée, il est possible de réaliser des colorations (FM4-64, DioC<sub>6</sub>, MitoTracker...) ou d'observer directement le phloème en montant l'échantillon dans de l'eau. L'avantage de cette technique est que l'on peut observer aussi bien au niveau de la veine principale que des veines mineures, selon l'endroit pelé. Toutefois, au niveau du pétiole, les observations de phloème restent délicates en raison de l'épaisseur du tissu.



**Figure 29: Observation de la diffusion de la GFP dans le phloème dans la feuille de deux lignées *pSUC2:GFP***

*On observe une différence de localisation entre une GFP soluble fortement ou faiblement exprimée dans le phloème. La construction qui exprime faiblement la GFP (A, lignée 3.4) ne va permettre l'observation d'un signal fluorescent que dans les cellules compagnes, alors que la lignée qui exprime fortement la GFP (B, lignée 5.4) va être plus intéressante car elle permet d'observer les cellules compagnes mais également le parenchyme phloémien. CC: cellule compagne. PP: parenchyme phloémien. En rouge: autofluorescence des plastes. Echelle: 10  $\mu$ m. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.*

### III.2.1. Observation de protéines fluorescentes dans le phloème de feuille après peeling

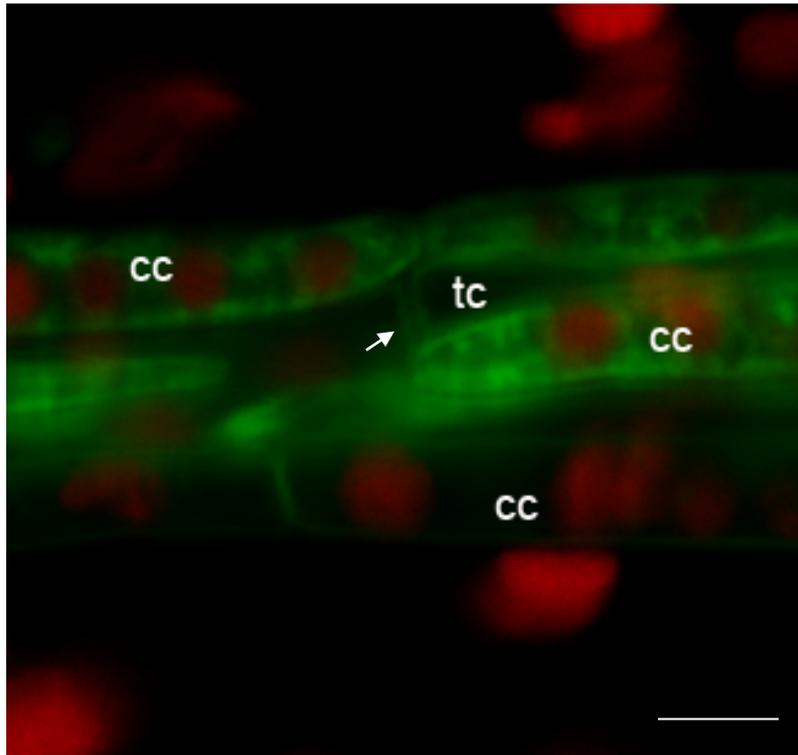
Une fois les feuilles pelées, l'observation de protéines fluorescentes dans les tissus vasculaires devient bien plus simple car le signal est moins diffus (moins de perte de photons par diffusion) et nous permet de visualiser en détail et avec une bien meilleure résolution les cellules du phloème.

#### a) Observation de GFP soluble dans le phloème

Nous avons observé les racines des mêmes lignées *pSUC2:GFP* (GFP soluble) que nous avons observées précédemment. Nous pouvons voir qu'une lignée exprimant fortement la GFP, comme la lignée 5.4, nous permet d'observer non seulement les cellules compagnes, mais également les cellules du parenchyme phloémien (Figure 29). Ceci nous confirme bien que les grosses cellules que nous observons proches des CC sont des cellules du phloème. Par contre, nous ne pouvons pas observer les tubes criblés dans les racines de telles lignées. L'hypothèse la plus simple pour expliquer l'absence de signal dans les TC, alors même que de plusieurs publications ont détaillé le chargement et le déchargement de la GFP (Oparka., 1999) est que la GFP chargée dans les TC est ensuite rapidement transportée à longue distance, d'où l'absence de signal.

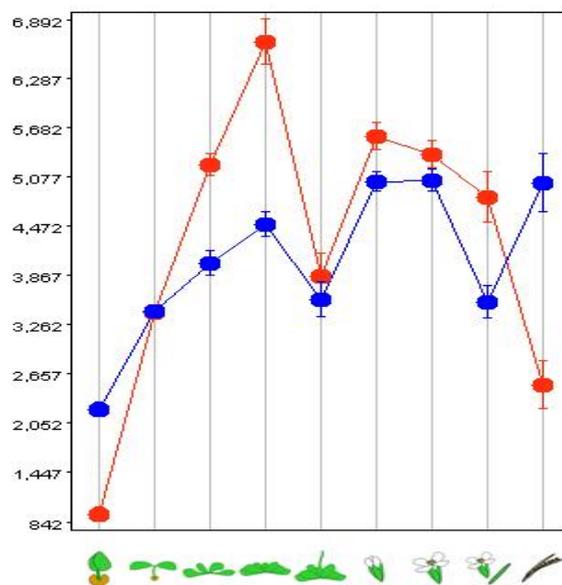
#### b) Observation de la protéine de fusion mcitrine-RCI2A

Les plantes transgéniques exprimant la protéine de fusion mcitrine-RCI2A nous permettent de visualiser les membranes plasmiques. Sur l'image présentée en Figure 30, on voit clairement la présence d'une plage de cribles séparant 2 tubes criblés. De même, on peut voir la membrane des cellules compagnes. Toutefois les plantes de cette lignées présentent un phénotype typique d'un problème de transport des sucres, à savoir un rougissement des feuilles et un retard de croissance. Il est possible que la protéine fusion RCI2A-mCitrine localisée à la membrane des cellules du phloème empêche le chargement des sucres, par un mécanisme encore non élucidé.



**Figure 30: Observation du phloème dans la feuille d'une lignée pSUC2:mcitrine-RCI2A**

Les membranes des CC et des TC sont bien visibles, on peut voir une plage de cribles entre 2 TC. cc: cellule compagne, tc: tube criblé. La flèche montre la plage de crible. En rouge: autofluorescence des plaste. Echelle: 5  $\mu$ m. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.



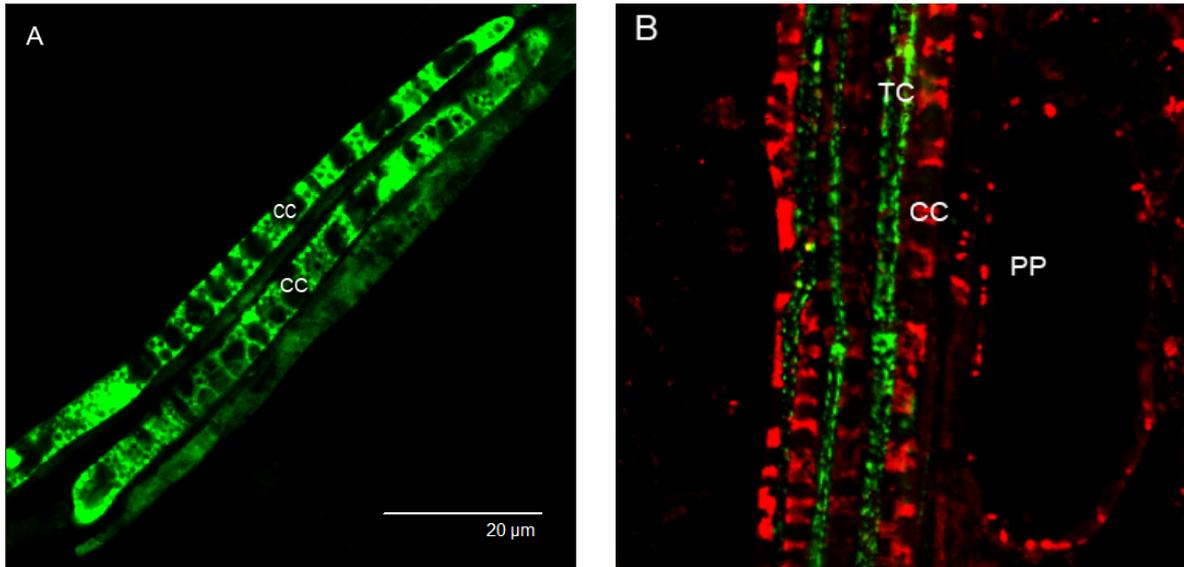
**Figure 31: Expression relative de PP2-A1 et de SUC2 au cours du développement de la plante**

Valeurs d'expression relative de PP2-A1 et de SUC2 à différents stades de développement de la plante, d'après les données disponibles sur Genevestigator [[www.genevestigator.com/](http://www.genevestigator.com/)]. En rouge ; PP2-A1, en bleu: SUC2. Ces courbes montrent que dans les tissus végétatifs et reproducteurs les niveaux d'expression relatifs de PP2-A1 et SUC2 sont très proches.

c) Observation de PP2-A1 et PP2-A2 dans le complexe cellules compagnes - cellules criblées

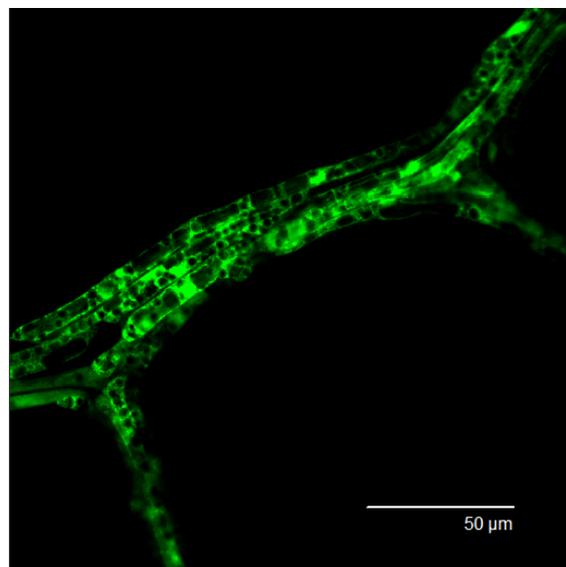
Nous avons réalisé plusieurs constructions pour la production dans les lignées transgéniques de protéines PP2-A1 et PP2-A2 fusionnées à la GFP ou ses dérivés (CFP, YFP) sous le contrôle du promoteur de *SUC2* (Tableau 5). Les deux gènes *PP2-A1* (At4g19840) et *PP2-A2* (At4G19850) sont exprimés dans les cellules compagnes dans les parties aériennes et la racine (Dinant *et al.*, 2003). Nous ne pouvons pas utiliser le promoteur endogène de *PP2-A1* car quand celui-ci est associé à un transgène il provoque fréquemment des dérégulations en trans de l'expression de *PP2-A1* par un probable mécanisme de silencing (Transcriptional Gene Silencing) (Résultats non publiés). C'est pourquoi nous avons été obligés d'utiliser un promoteur conférant une expression tissulaire et cellulaire similaires, et nous avons choisi le promoteur du gène *SUC2*. D'autre part, des recherches *in silico* sur Genevestigator [[www.genevestigator.com/](http://www.genevestigator.com/)] ont montré que *PP2-A1* et *SUC2* avaient des niveaux d'expression proches in planta (Figure 31). Le gène *PP2-A2* est quant à lui peu exprimé nativement dans la plante. Aussi, nous n'étions pas certains de pouvoir localiser la fusion PP2-A2:YFP dans le phloème si nous utilisons le promoteur endogène de *PP2-A2*; c'est pourquoi nous avons aussi décidé d'utiliser le promoteur du gène *SUC2* plutôt que celui de *PP2-A2*, afin de surexprimer la protéine.

Dans les lignées exprimant *pSUC2:PP2-A2:YFP*, la protéine de fusion PP2-A2 fusionnée à l'YFP (Venus: Nagai *et al.*, 2002) est localisée au niveau du noyau et du cytosol des cellules compagnes (Figure 33). L'expression est strictement localisée dans ces cellules, aucun signal de fluorescence n'ayant été observé dans les TC ou les PP. Nous ne savons pas si cela résulte du fait que la protéine n'est pas transportée de cellule à cellule, ou si elle forme des oligomères trop gros pour passer par les plasmodesmes. Plusieurs lignées différentes ont été observées, et les observations ont été réalisées sur au moins 20 feuilles d'âge et d'ordre différent.



**Figure 32: Observation de PP2-A1:GFP dans les cellules compagnes et dans les tubes criblés.**

*Localisation de PP2-A1:GFP dans les cellules compagnes (A) et dans les tubes criblés matures (B). En A, PP2-A1:GFP, dont l'expression est restreinte aux CC. PP2-A1:GFP est localisée dans le noyau et dans le cytosol des CC. En B PP2-A1:GFP dont l'expression est dans les tubes criblés immatures. PP2-A1:GFP est localisée au niveau de la membrane des tubes criblés. En rouge: marquage des mitochondries avec le MitoTracker Red. CC: cellule compagne. TC: tube criblé. PP: parenchyme phloémien. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.*

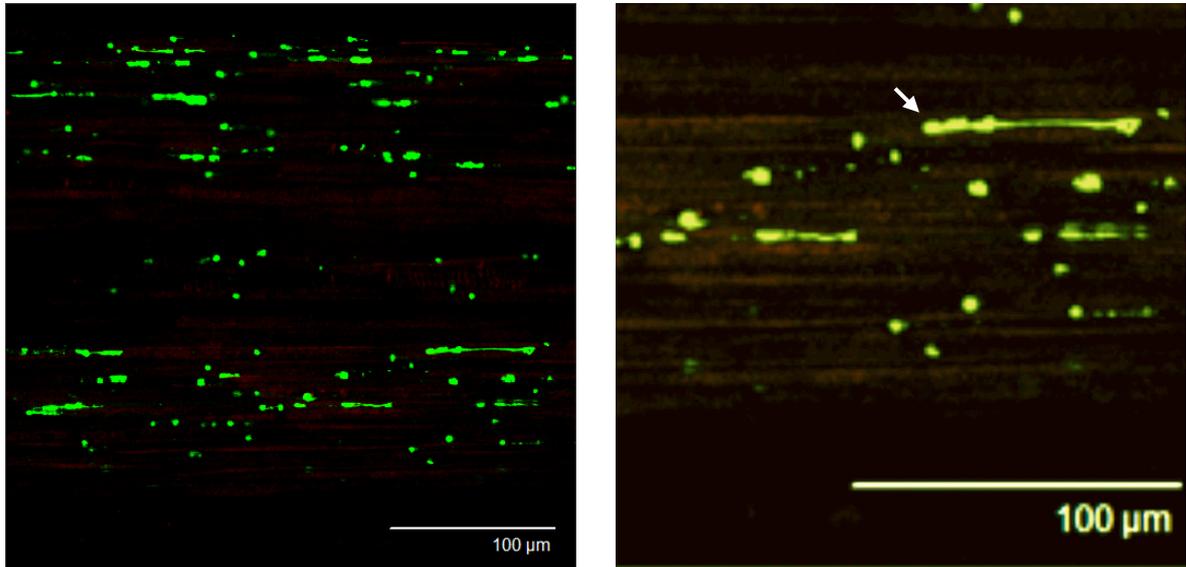


**Figure 33: Observation de PP2-A2 YFP dans les cellules compagnes de feuille.**

*Localisation de PP2-A2:YFP dans les cellules compagnes dans une lignée pSUC2:PP2-A2:YFP. Le signal est localisé dans les noyaux et dans le cytosol des CC. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X20.*

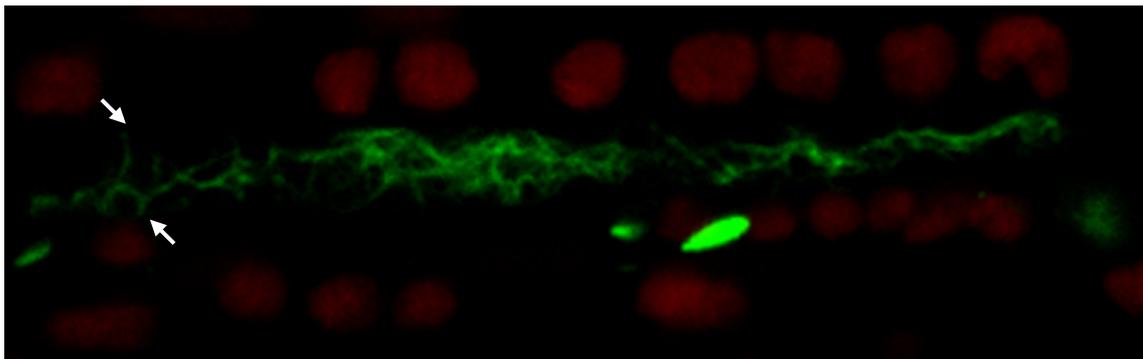
Dans les lignées exprimant *pSUC2:PP2-A1:GFP* et *pSUC2:PP2-A1:CFP*, PP2-A1 fusionnée à la GFP ou à la CFP (protéine fluorescente bleu Céruléen (en anglais : Cerulean): Rizzo *et al.*, 2004) possède une localisation nucléocytoplasmique dans les CC, identique à celle observée avec PP2-A2 (Figure 32). En revanche, contrairement à ce que nous avons pu observer dans les tubes criblés de racines, nous n'avons observé aucun signal de la protéine de fusion dans les tubes criblés. Ce résultat est surprenant car les expériences d'immunolocalisation réalisées avec des anticorps spécifiques de PP2-A1 ont montré que PP2-A1, dans les feuilles, était principalement localisée dans les tubes criblés, le signal dans les CC étant très faible (Batailler *et al.*, 2012), indiquant que la protéine à l'état natif est capable de se déplacer des CC dans les TC. Une hypothèse est que l'ajout d'une protéine fluorescente empêche la reconnaissance de sites d'adressage de PP2-A1, et empêche donc son transport vers les TC. Une autre hypothèse est que PP2-A1 forme des dimères, et que l'ajout de la protéine fluorescente forme une protéine de fusion de trop grosse taille pour passer dans les TC via les plasmodesmes, dont la taille d'exclusion limite est de 67 kDa (Stadler *et al.*, 2005)

Pour pouvoir déterminer la localisation de PP2-A1 dans les tubes criblés dans la feuille, nous avons donc été amenés à réaliser de nouvelles constructions où nous avons exprimé la protéine de fusion PP2-A1:GFP sous le contrôle du promoteur du gène *SEOR2* (*At3g01670*). Comme nous l'avons vu précédemment, et comme cela a été décrit récemment dans la littérature (Anstead *et al.*, 2012), ce promoteur confère une expression dans les tubes criblés (Tableau 5). Dans les plantes exprimant cette construction, nous avons pu localiser la protéine dans les tubes criblés matures, où elle forme des agrégats. Ces agrégats sont répartis de façon aléatoire dans les TC, principalement à la périphérie, proches de la membrane plasmique. D'autre part, en utilisant ce promoteur qui s'exprime de façon très précoce dans le tube criblé immature, nous avons observé également la protéine de fusion dans des TC en cours de différenciation. Ces observations indiquent que la localisation de PP2-A1 change au cours de la différenciation. Dans un TC immature, PP2-A1 va être cytosolique, alors que plus le TC va se différencier (perte des chloroplastes, de la compartimentation) et plus PP2-A1 va passer sous une forme agrégée. Nous pensons que ce passage d'un état soluble à un état agrégé est dû aux conditions physico-chimiques à l'intérieur de la cellule, et notamment l'état d'oxydo-réduction de la cellule, qui pourrait permettre à PP2-A1 de former des ponts disulfures (plusieurs cystéines présentes dans la protéine) et donc de s'auto-associer.



**Figure 34: Observation du phloème dans la feuille d'une lignée pSEOR2:SEOR2:GFP**

*Localisation de SEOR2:GFP dans la veine principale de feuille d'Arabidopsis. On voit que SEOR2 forme des agrégats de taille variable dans les tubes criblés. Flèche: un gros amas de protéines SEOR2. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X20.*



**Figure 35: Observation des filaments de SEOR2:GFP dans les tubes criblés matures**

*Localisation de l'accumulation de SEOR2:GFP dans les tubes criblés matures. On voit des filaments très fins dans les tubes criblés. Les flèches montrent des potentiels sites d'ancrage de SEOR2 à la membrane plasmique. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.*

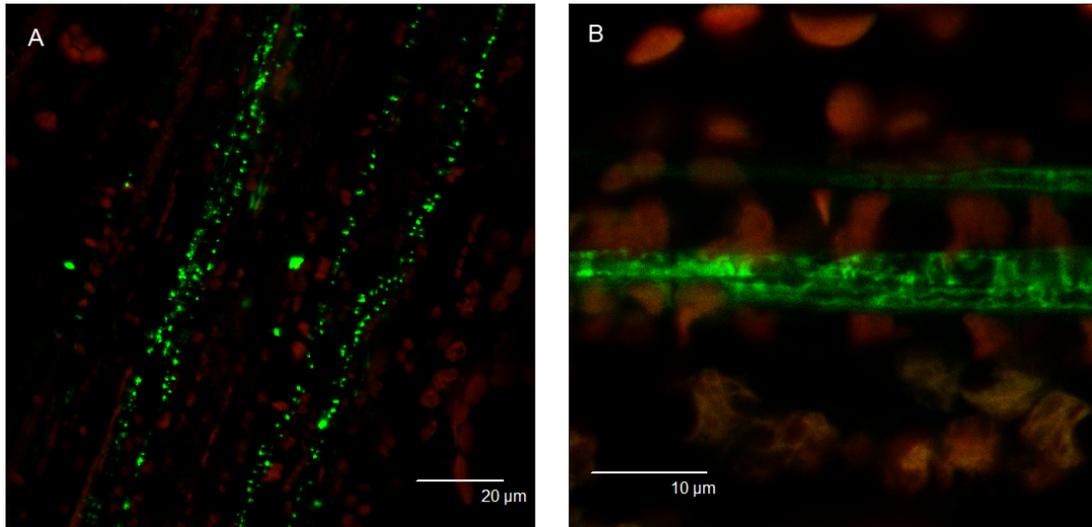
#### d) Les protéines SEOR dans les tubes criblés de feuilles

Dans les plantes des lignées *pSEOR1:SEOR1:GFP* et *pSEOR2:SEOR2:GFP*, les protéines de fusion SEOR1-GFP (At3g01680) et SEOR2-GFP (At3g01670) apparaissent localisées de façon préférentielle dans les veines d'ordre I et II. En revanche on observe peu de fluorescence dans les veines mineures, indiquant une plus faible activité des promoteurs des gènes codant ces protéines dans ces veines. Les deux protéines forment des gros amas dans les tubes criblés, similaires aux amas de protéines P visibles en microscopie électronique (Figure 34). Cependant nous avons également observé dans les TC des réseaux de filaments plus fins, ceci avec SEOR1-GFP ou SEOR2-GFP, similaires à ceux observés et décrits dans une publication par l'équipe de Knoblauch en 2012 (Figure 35). Nous observons ces amas aussi bien dans les feuilles en cours de d'expansion que dans les feuilles matures. Or, dans les feuilles matures on retrouve peu de tubes criblés immatures. Ces observations suggèrent que ces protéines de fusion avec la GFP, qui sont synthétisées dans les tubes criblés immatures, cellules qui présentent encore une activité transcriptionnelle et traductionnelle, peuvent rester longtemps présentes dans les tubes criblés, après la fin de différenciation et pendant toute la durée de vie des tubes criblés matures. Ceci nous donne des informations sur la grande stabilité de ces protéines dans les tubes criblés

#### e) RTM1 et RTM2, des protéines localisées dans les tubes criblés

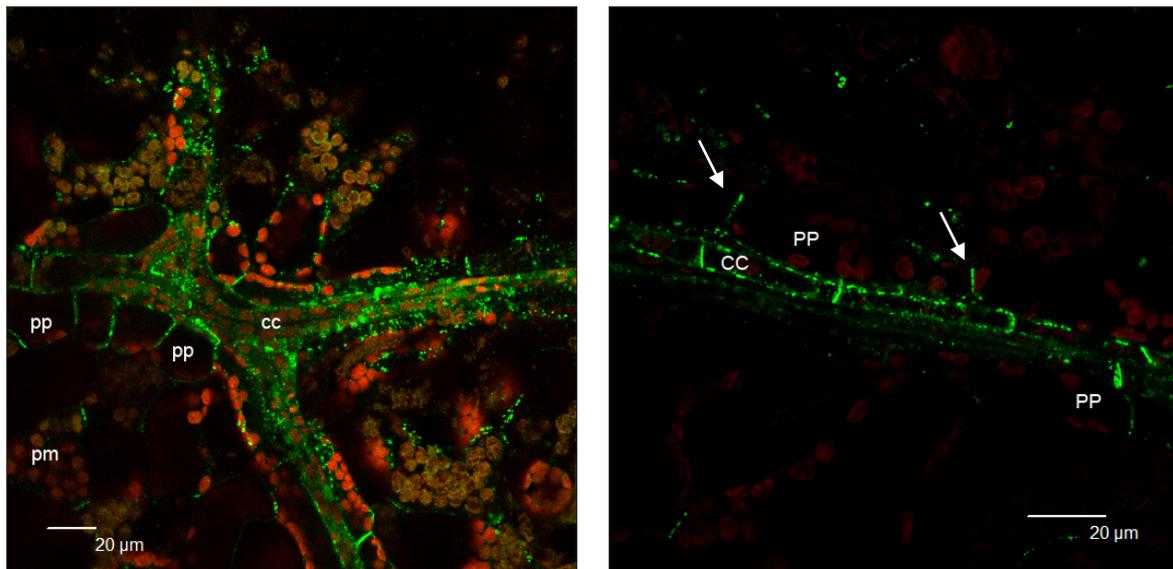
Nous avons utilisé les deux lignées produites par l'équipe de Jim Carrington (Chisholm *et al.*, 2001) exprimant les constructions *pRTM1:GFP:RTM1* et *pRTM2:RTM2:GFP*. Ces lignées sont dans le fond génétique C24, et complètent des mutants perte de fonction. Elles nous ont été fournies par Frédéric Revers (INRA-Bordeaux). Nous avons utilisé des plantes de ces lignées pour regarder la localisation de ces deux protéines dans le phloème. RTM1 et RTM2 sont toutes les deux présentes au niveau des tubes criblés, ce qui confirme les résultats publiés en 2001, où seules les racines de ces lignées ont été observées. (Chisholm *et al.*, 2001).

Dans ces plantes, on observe que la protéine de fusion GFP-RTM1 forme des petits amas répartis en périphérie des tubes criblés (Figure 36A). Nous avons mesuré la dimension de ces amas, qui est en moyenne de 1  $\mu\text{m}$ . Ces amas sont fixes dans les tubes criblés. Les seuls organites qui pourraient correspondre à la taille des amas de RTM1 observés seraient les



**Figure 36: Observation des tubes criblés dans la feuille de lignées *GFP:RTM1* et *RTM2:GFP***

*Localisation de RTM1 (A) et RTM2 (B). RTM1 forme de très nombreux agrégats dans les tubes criblés. La localisation de RTM2 est plus compliquée à interpréter. La protéine semble marquer les membranes dans les tubes criblés. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.*



**Figure 37: Observation de la répartition des plasmodesmes dans le phloème de feuille d'une lignée exprimant *p35S:PDLP:GFP***

*La fluorescence révèle la répartition des plasmodesmes au niveau des veines mineures d'Arabidopsis. Sur la Figure de gauche, on voit bien que les plasmodesmes sont très présents au niveau du parenchyme phloémien et dans les cellules compagnes. Sur la Figure de droite, on voit que PDLP1 est répartie de façon plus ou moins polarisée dans le phloème (les flèches indiquent les plages de plasmodesmes). PP: cellule du parenchyme phloémien, CC: cellule compagne, pm: parenchyme mésophyllien. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.*

amyloplastes ; toutefois les images de TC obtenues en MET montrent qu'il n'y a que peu de plastes présents dans les tubes criblés, alors qu'on y observe beaucoup de spots de RTM1.

L'utilisation d'un marqueur des plastes ou une coloration vitale spécifique des amyloplastes serait nécessaire pour déterminer si la protéine RTM1 est bien associée aux plastes dans les TC.

Dans les plantes *pRTM2:RTM2:GFP*, nous avons observé que la fluorescence de la protéine de fusion RTM2:GFP est localisée à la membrane plasmique des tubes criblés (Figure 36B). Cependant, nous pensons que le promoteur de RTM2 est exprimé plus précocement que celui de RTM1. En effet, dans de nombreuses observations, les tubes criblés n'apparaissent pas vides, et on peut voir le contenu de la cellule car RTM2 va se fixer à différentes membranes et vésicules, qui restent toutefois à identifier. Il faudrait exprimer RTM2 sous le contrôle d'un promoteur fonctionnant de façon précoce dans les tubes criblés, comme celui de *SEOR1* ou *SEOR2*, et observer la localisation de RTM2 pendant la différenciation des tubes criblés. Pour l'instant, nous ne pouvons pas dire à quel stade de différenciation se trouve la cellule sur l'image de la Figure 36, B.

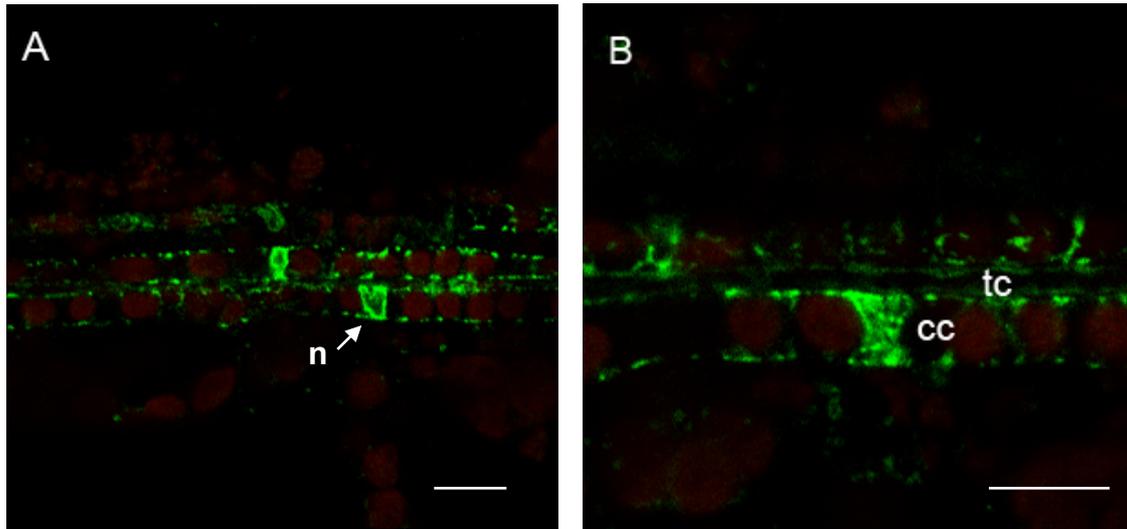
Ces résultats illustrent bien la difficulté à identifier les structures subcellulaires des tubes criblés et le besoin de développer des marqueurs subcellulaires utilisables pour ces cellules.

#### f) Observations des plasmodesmes dans le phloème

Nous avons également étudié une lignée exprimant la construction *p35S:PDLP1:GFP* (don d'Andy Maule, John Innes Institute, Norwich). PDLP1 est une protéine associée aux plasmodesmes (Thomas *et al.*, 2008). Bien qu'*Arabidopsis* soit considérée comme une espèce apoplasmique pour le chargement des sucres, il existe des plasmodesmes dans tous les types cellulaires du phloème: CC, TC et PP. En revanche, les seules données dont nous disposons sont des données d'ultrastructure en MET, ce qui ne donne pas une vision très complète de la distribution des plasmodesmes au sein des cellules du phloème. Nous avons ainsi étudié dans ces plantes la distribution des plasmodesmes dans le phloème au niveau des veines mineures.

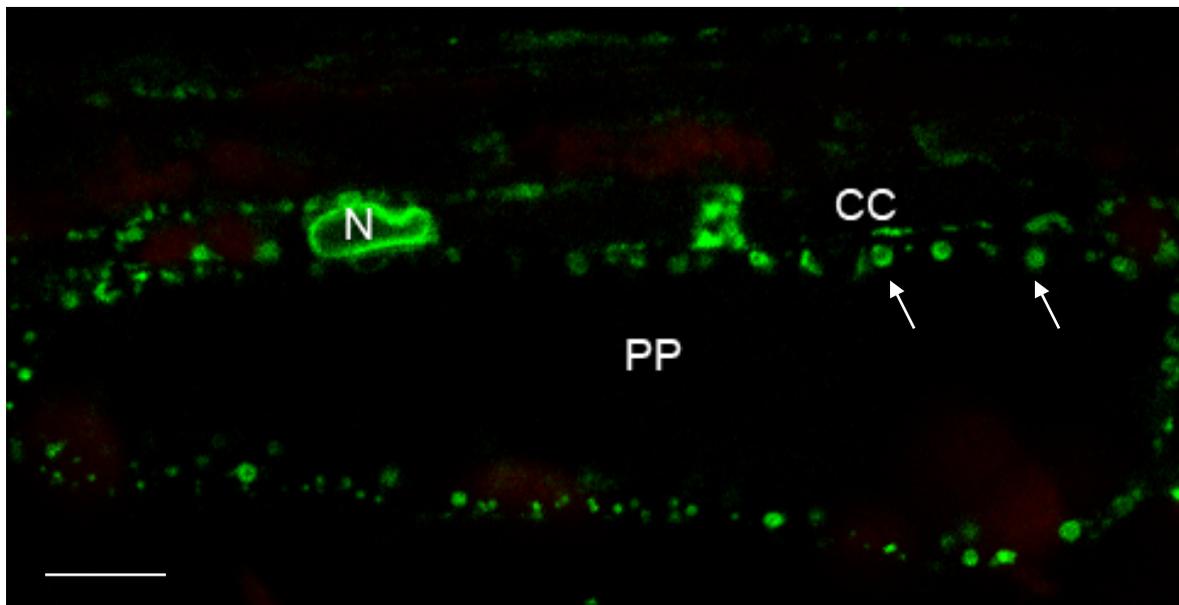
Dans les cellules compagnes, on observe un très grand nombre de plasmodesmes répartis à la périphérie de la cellule (Figure 37). Nous observons aussi des plages de plasmodesmes, bien qu'il soit difficile d'identifier avec quels autres types cellulaires ceux-ci sont connectés.

Au niveau du parenchyme phloémien, les plasmodesmes sont également présents tout autour de la cellule. Cependant, sur certaines images, on voit une distribution beaucoup plus polarisée de ces plasmodesmes, ils sont localisés de façon plus importante sur les côtés longitudinaux. Ces observations sont à compléter avec d'autres marqueurs de plasmodesmes



**Figure 38: Observations de NHL26:GFP dans le phloème de feuille**

*Localisation d'une fusion traductionnel NHL26 :GFP dans les feuilles d'Arabidopsis dans une lignée exprimant pNHL26:NHL26:GFP. On voit en A que NHL26 est présent autour du noyau des CC. On voit également un marquage en ponctuation au niveau de la membrane des CC. En B, on voit un marquage au niveau de la membrane des TC, sous forme de ponctuations identifiées comme des plasmodesmes. Echelle: 10 $\mu$ m tc: tube criblé ; cc: cellule compagne ; n: noyau. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.*



**Figure 39: Détails de la localisation de NHL26:GFP**

*NHL26 :GFP est localisé au niveau du réticulum endoplasmique, et forme aussi des petites ponctuations, ici dans les cellules du parenchyme phloémien (PP) (flèches) Echelle: 5 $\mu$ m. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.*

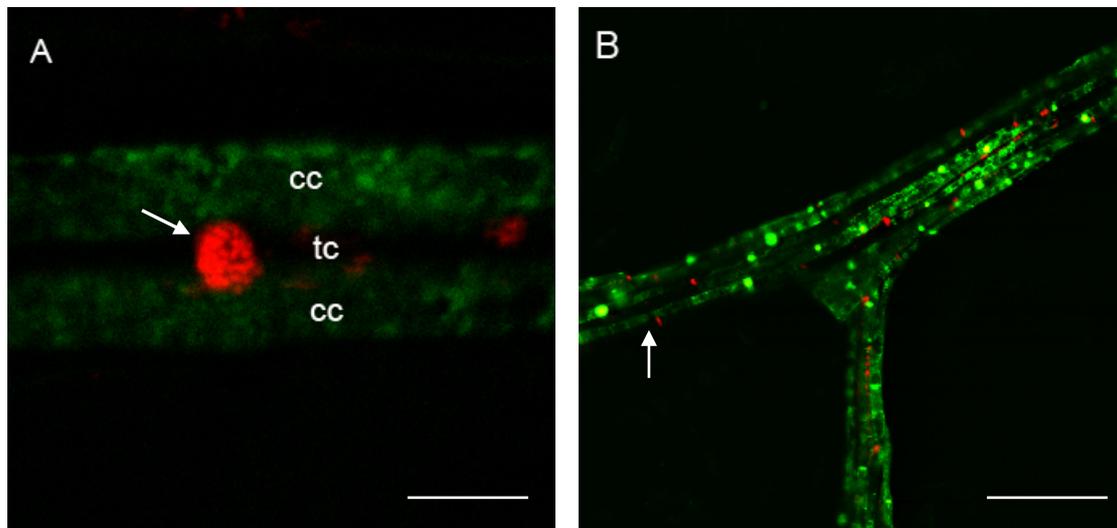
par exemple PDCB1 (Simpson *et al.*, 2009). En effet un seul membre de la famille des PDLP a été observé, et on peut penser que cette protéine ne marque pas tous les plasmodesmes. L'utilisation de marqueurs pour les autres membres de la famille des PDLP pourrait être utile pour confirmer cette répartition.

#### g) Observation de *NHL26* dans le phloème

*NHL26* est une protéine annotée comme étant membranaire. Les analyses réalisées au laboratoire sur des plantes surexprimant le gène *NHL26* indiquent un rôle dans l'export des sucres, et des analyses de patron d'expression ont établi que ce gène s'exprime dans le phloème. Afin de pouvoir proposer des hypothèses sur le mode d'action de *NHL26*, nous avons déterminé la localisation de son expression en utilisant la technique de peeling que j'ai mise au point. Les plantes de lignées exprimant la construction *pNHL26:NHL26:GFP* avec un promoteur endogène de 1.5 Kb, obtenues par Françoise Vilaine, ont été utilisées pour ces études. Nous avons analysé plusieurs lignées, présentant des niveaux d'expression plus ou moins forts. Dans les lignées avec un niveau d'expression moyen, nous avons observé que la protéine de fusion était localisée sous forme de ponctuations présentes au niveau de la membrane des cellules compagnes et des tubes criblés (Figure 38B), mais également autour du noyau (Figure 38A). Dans les lignées où le transgène est plus fortement exprimé, on retrouve également la protéine dans le réticulum endoplasmique, ce qui se voit particulièrement bien dans le parenchyme phloémien (Figure 39). Des expériences réalisées ultérieurement par immunomarquage sur des coupes ultrafines observées en MET ont confirmé une localisation dans les plasmodesmes des cellules du phloème, entre cellules compagnes, cellules des tubes criblés et parenchyme phloémien, et dans le réticulum endoplasmique des tubes criblés (Vilaine *et al.*, Soumis).

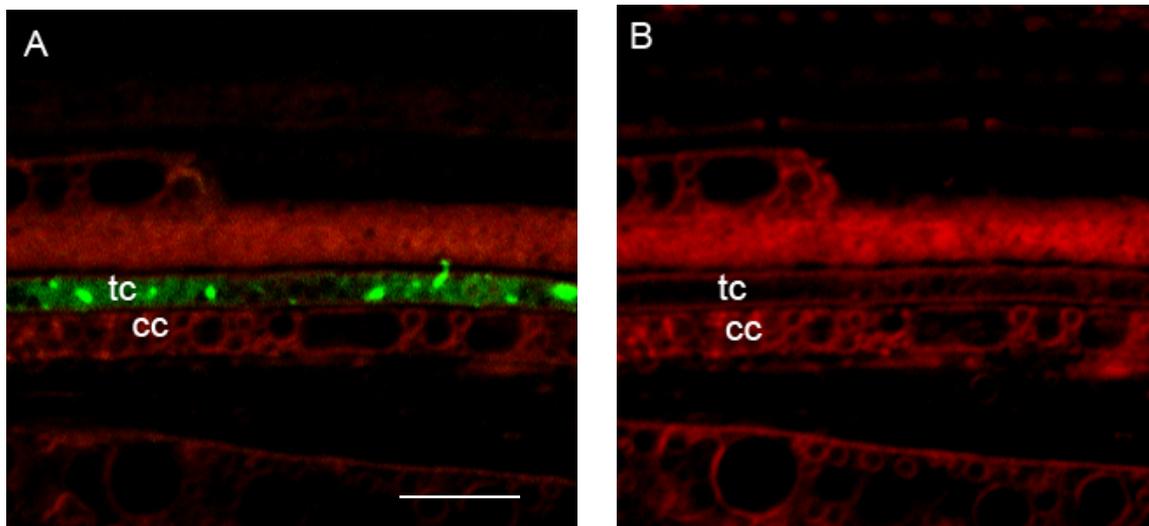
#### ***IV. Adaptation de colorants vitaux pour la visualisation du phloème***

Pour identifier les cellules du phloème, il existe des colorants classiques, comme le bleu d'aniline. Néanmoins, d'autres colorants existent et ont été décrits dans la littérature pour l'observation de ces cellules. Ainsi, parallèlement à l'usage de marqueurs fluorescents, j'ai



**Figure 40: Identification de tubes criblés par une coloration de la callose des plages de cribles**

La callose est visualisée dans les TC par une coloration au bleu d'aniline chez des plantes exprimant *pSUC2:PP2-A1:GFP*. Le bleu d'aniline ici visualisé en rouge marque les plages de cribles. En A, on reconnaît la structure simple du phloème de racine avec deux CC et un TC. La plage de cribles est visualisée légèrement de biais, ce qui permet de distinguer quelques pores. En B c'est un réseau de veines d'ordre II / III dans la feuille. Le marquage est plus difficile à observer vu que le phloème comporte beaucoup plus de couches cellulaires. Echelle: A: 5 $\mu$ m ; B: 25 $\mu$ m Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.



**Figure 41: Observation des membranes dans les cellules de phloème avec le FM4-64**

L'internalisation du FM4-64 au niveau du phloème de racine chez des plantes exprimant *SEOR1-GFP*. *SEOR1* est localisé dans le tube criblé. On voit que le FM4-64 marque bien la membrane du TC. La CC est reconnaissable car on voit les très nombreux compartiments intracellulaires caractéristiques. Echelle: 5 $\mu$ m. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63

également testé une gamme de fluorochromes vitaux pour l'observation des cellules du phloème.

#### IV.1.1 Caractéristiques des différents colorants utilisés

Lors de ma thèse, j'ai utilisé des nombreux colorants vitaux. Certains sont spécifiques du phloème, comme le bleu d'aniline, d'autres sont des colorants classiques, utilisés couramment pour observer les membranes ou les mitochondries (Tableau 6).

**Tableau 6: Caractéristiques des différents colorants utilisés**

Colorant	$\lambda$ Excitation	$\lambda$ Emission	Usage	Réf	concentration mère	Concentration finale
5,6 CFDA	488 nm	500-550 nm	Traceur symplasmique du phloème	Oparka <i>et al.</i> , 1994	60 mg.mL <sup>-1</sup>	Dépôts 3 $\mu$ L à 60mg.mL <sup>-1</sup>
Bleu aniline	405 nm	414-476 nm	Coloration de la callose	Thompson et Wolniak, 2008	solide	0,05%
FM4-64	488 nm	701-708 nm	Coloration des membranes	Vida & Emr, 1995	100 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup>	5 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup>
DiOC <sub>6</sub>	488 nm	515-580 nm	Coloration des mitochondries et du RE, et dans certaines conditions de toutes les membranes	Martens <i>et al.</i> , 2006	0,1 mg.mL <sup>-1</sup> dans DMSO	1 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup>
MitoTracker Red CMXRos	544 nm	684-764 nm	mitochondries	Poot <i>et al.</i> , 1996	50 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> dans DMSO	2,5 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup>

#### IV.1.2 Utilisation dans l'étude des cellules du phloème

##### a) Visualisation du chargement du phloème avec du 5,6 CFDA

Deux fluorochromes, la carboxyfluorescéine et le HPTS, ont été utilisés dans la littérature pour étudier le chargement symplasmique dans le phloème (Oparka *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1996). Ils sont appliqués sous forme d'esters dans les feuilles ou les cotylédons abrasés, dans lesquels ils sont clivés, chargés, puis transportés, dans le phloème. Ces colorants

correspondent à des petites molécules qui vont passer dans les flux de sève. Elles ont longtemps été utilisées pour réaliser des expériences de suivi de flux dans les feuilles. Nous avons utilisé le 5-6CFDA pour vérifier que le chargement et le transport dans le phloème n'étaient pas affectés par notre méthode de peeling chez *Arabidopsis*. Nous avons ainsi pu suivre le transport de cette molécule depuis son lieu de chargement jusqu'au pétiole chez une plante sauvage, confirmant ainsi que le phloème est toujours fonctionnel chez ces plantes.

#### b) Visualisation des plages de cribles des tubes criblés avec le Bleu d'aniline

Le bleu d'aniline est un colorant spécifique de la callose (( $\beta$ -1,3-glucane). Son spectre d'excitation et d'émission (excitation avec une diode 405 et émission dans le bleu) est compatible avec l'utilisation de la GFP. Nous avons utilisé ce colorant dans les racines, afin de localiser le phloème, et réaliser des colocalisations avec des protéines de fusion GFP pour identifier avec précision les tubes criblés. En effet, dans les racines, nous ne disposons pas de beaucoup d'éléments caractéristiques par rapport aux feuilles pour reconnaître le phloème. Chez des plantules âgées de 4 jours après semis *in vitro* produisant la protéine de fusion PP2-A1:GFP, nous voyons bien que certains amas de PP2-A1 sont présents au niveau de la plage de cribles. Les colorations au bleu d'aniline se font sur des jeunes plantules, pour que le colorant puisse diffuser et atteindre facilement le phloème (Figure 40A). En revanche, le bleu d'aniline s'est avéré plus difficile à utiliser dans les feuilles. En effet, lors de la préparation du tissu, malgré le fait que le phloème soit toujours fonctionnel, la plante est blessée, et va produire de la callose, ce qui entraîne un marquage aspécifique aux sites de production de la callose par le bleu d'aniline (Figure 40B).

#### c) Visualisation des membranes avec le FM4-64

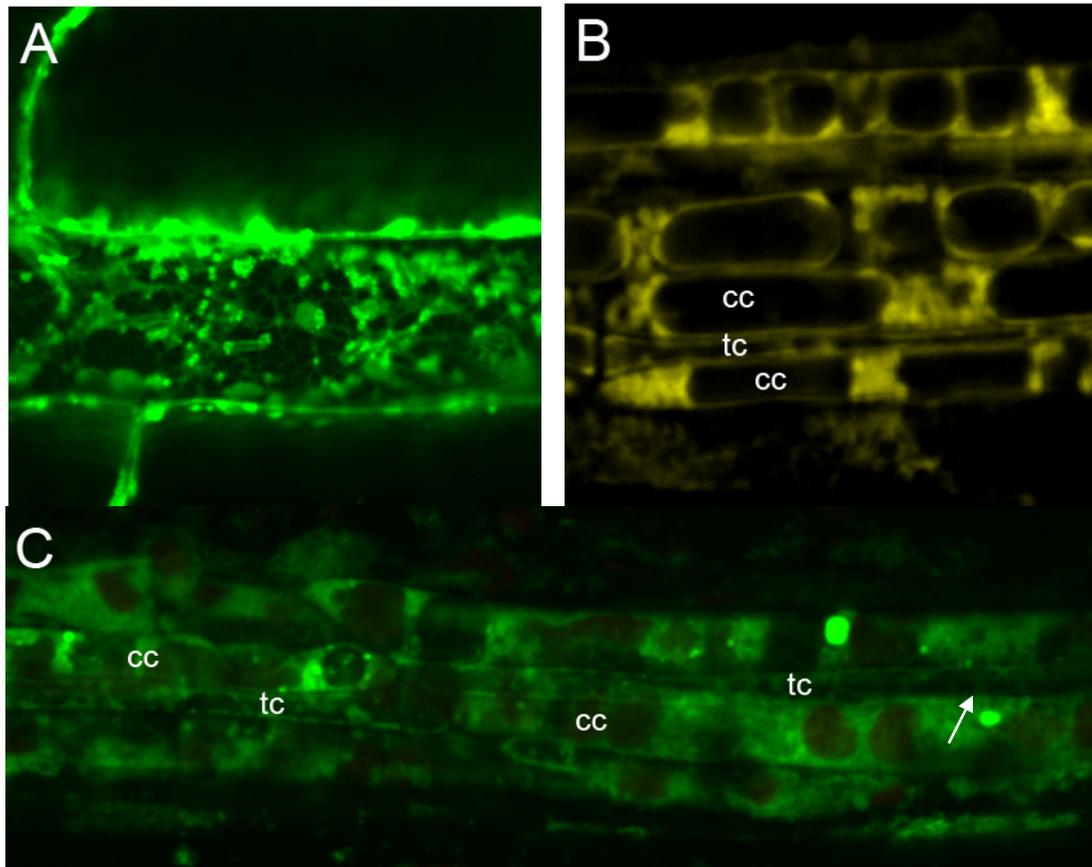
Le FM4-64 est un fluorochrome lipophile très largement utilisé en cytologie comme colorant vital de la membrane plasmique, en raison de son spectre d'émission et d'excitation (émission dans le rouge) compatibles avec l'observation simultanée de la GFP. Il peut également s'internaliser en fonction des conditions d'utilisation et marquer l'ensemble des structures endomembranaires. Dans la racine, avec des incubations de 10 min, il peut atteindre le cylindre central et marquer les membranes des cellules du phloème. Nous avons réalisé des observations de racines en utilisant le FM4-64 comme coloration des membranes. En effet,

lors de l'observation des racines, il n'y a que très peu de moyen de reconnaître les cellules du métaphloème, si ce n'est par l'utilisation de protéines fluorescentes synthétisées sous contrôle d'un promoteur phloème spécifique. Nous avons ainsi pu voir, en observant des racines marquées avec la construction *pSEORI:SEORI:GFP* que le contremarquage au FM4-64 permettait de voir des différences significatives entre les cellules compagnes et les tubes criblés (Figure 41). En effet, au bout de quelques minutes, le FM4-64 va s'internaliser dans les membranes, et comme nous avons pu le voir, les CC contiennent de très nombreux organites, alors que les TC sont presque vides. Ainsi, à l'aide d'un colorant comme le FM4-64, on peut discerner les deux types cellulaires. En revanche, dans les feuilles, le FM4-64 pénètre beaucoup plus difficilement et n'atteint pas les couches cellulaires du phloème.

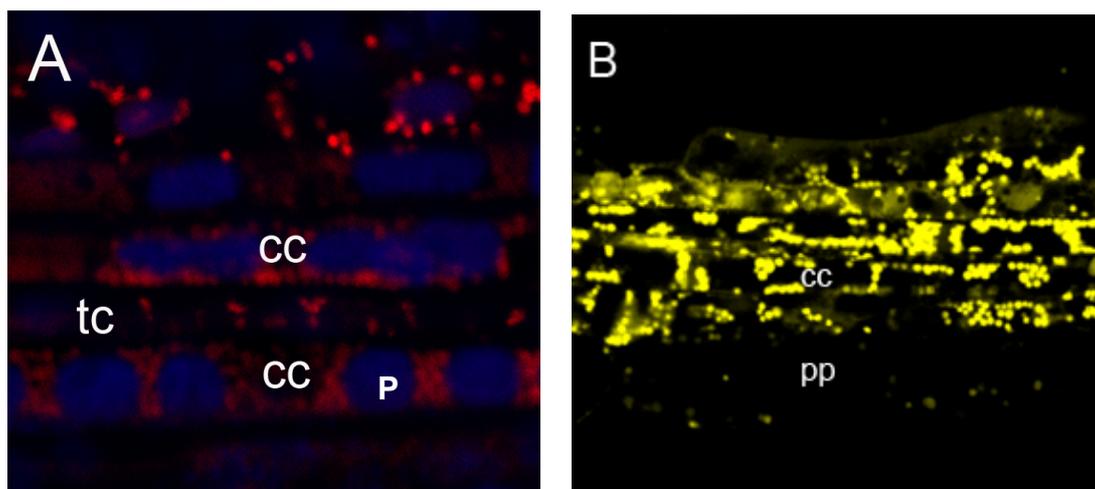
#### d) Visualisation des systèmes endomembranaires avec le DiOC<sub>6</sub>

Le DiOC<sub>6</sub> (3,3'-Dihexyloxycarbocyanine Iodide) est un fluorochrome permettant de visualiser les organites, notamment le réticulum endoplasmique et les mitochondries. A forte concentration, comme le FM4-64, il marque l'ensemble des structures endomembranaires (Figure 42A). Dans la publication de Martens (Martens *et al.*, 2006), ce fluorochrome a été utilisé chez le tabac pour observer le réticulum endoplasmique dans les cellules du phloème. Nous avons utilisé ce colorant chez *Arabidopsis*, là encore pour nous permettre d'identifier de façon plus simple le phloème de feuille. Nos observations nous ont permis de repérer les différents types cellulaires du phloème. Les CC sont très facilement reconnaissables, de part la présence de nombreuses mitochondries, dont les membranes sont bien marquées. D'autre part, nos observations confirment que les membranes des chloroplastes et des vacuoles sont aussi marquées par le DiOC<sub>6</sub> à l'intérieur des CC (Figure 42B).

On observe également un marquage au niveau de la membrane des tubes criblés présents dans les feuilles. On peut aussi distinguer de façon très précise les plages de cribles séparant les TC. D'autre part, nous pouvons voir au sein de ces tubes criblés des petits organites qui semblent marqués, mais leur petite taille ne permet pas de distinguer clairement leur nature. Le DiOC<sub>6</sub> permet donc de marquer les membranes de différents organites de cellules du phloème, et de part la nature fortement atypique de celles-ci (tubes criblés vides, très forte compartimentation des CC), on peut facilement les identifier (Figure 42C). L'inconvénient de ce colorant est son spectre d'émission qui recouvre malheureusement celui



**Figure 42: Coloration des systèmes endomembranaires des cellules de phloème avec le DiOC<sub>6</sub>**  
 Coloration au DiOC<sub>6</sub>. En A ; épiderme de cotylédon, en B et C, du phloème de feuille. Dans l'épiderme, on voit que le DiOC<sub>6</sub> marque la membrane, les mitochondries et colore finement le RE. En B et C, on voit cette fois un marquage de la membrane plasmique des TC, et également un marquage des vacuoles et des mitochondries dans les CC. En C, on peut voir dans un tube criblé un marquage de certains organites dont l'identité reste encore à confirmer (flèche) Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.



**Figure 43: Observation de mitochondries dans les cellules du phloème**  
 Observation de MitoTracker dans le phloème en A. En rouge: MitoTracker et contre-marquage bleu de la chlorophylle par autofluorescence (fausses couleurs). On reconnaît distinctement les cellules compagnes. D'autre part, les mitochondries des tubes criblés apparaissent clairement. En B: une GFP adressée aux mitochondries. Le marquage est similaire dans les cellules compagnes, mais ne permet pas l'observation de mitochondries dans les tubes criblés. P: chloroplaste. Observation en microscopie confocale à balayage laser, objectif X63.

de la GFP et de l'YFP, il est donc difficile de discerner leurs deux spectres d'émission. Par contre il est possible d'observer une CFP (et dérivés) en mode séquentiel avec le DiOC<sub>6</sub>.

Ce colorant nous apparaît très intéressant pour l'observation de l'anatomie du phloème. En effet, il va marquer toutes les cellules phloémiennes, et permet de reconnaître quelques organites dans le tissu. Il peut être par exemple facilement utilisé pour observer le phloème de plantes mutantes. Le DiOC<sub>6</sub> est facilement utilisable dans les feuilles, car son spectre d'émission est similaire à celui de la GFP, alors que le spectre d'émission du FM4-64 est chevauchant avec celui des plastes, ce qui ne permet donc pas de bien distinguer un marquage membrane.

Dans les racines, en revanche, il est plus facile d'utiliser le FM4-64, d'une part car il permet la visualisation d'une GFP et d'autre part car il est moins cytotoxique que le DiOC<sub>6</sub>.

#### e) Visualisation d'organites dans les cellules criblées avec le MitoTracker Red

Les MitoTrackers sont des colorants largement utilisés pour le marquage spécifique des mitochondries, qui comportent un radical chlorométhyle réagissant avec les groupements thiols. Comme il y a de nombreuses mitochondries dans les cellules compagnes, nous voulions voir si ce colorant permettait un marquage plus spécifique qu'une GFP adressée aux mitochondries. En effet, l'observation de la lignée exprimant une protéine de fusion GFP en principe spécifique des mitochondries ne permettait de visualiser aucune mitochondrie dans les tubes criblés (Figure 43B).

Nous avons ici utilisé le MitoTracker Red, excité par le laser He-Ne à 544 nm. Nous avons réalisé nos observations dans un milieu où le MitoTracker était dilué à une concentration de 2,5 µg.mL<sup>-1</sup> sans réaliser de lavages. Nous avons remarqué qu'en réalisant des lavages, le colorant était très rapidement photoblanchi. Par conséquent nous réalisons nos observations en utilisant directement le MitoTracker dilué comme milieu de montage. Nos observations montrent que le MitoTracker permet bien d'observer les mitochondries présentes dans les cellules compagnes, mais également celles présentes dans les tubes criblés différenciés. Ceci est très important car jusqu'à présent nous n'avions pas pu observer les mitochondries de TC *in vivo*. D'autre part, son spectre d'émission étant étroit, il permet d'observer en même temps l'autofluorescence de la chlorophylle présente dans les plastes des CC (émission à 680 nm) (Figure 43A). Ce colorant permet aussi de visualiser la fluorescence de la GFP ou de l'YFP. C'est donc un très bon outil pour étudier la localisation d'une protéine au sein du phloème.

## ***V. Publication N°1***

### **Live imaging of companion cells and sieve elements in the *Arabidopsis* leaves**

Thibaud Cayla<sup>1</sup>, Brigitte Batailler<sup>2,3</sup>, Frédéric Revers<sup>2</sup>, James A. Anstead<sup>4</sup>, Gary A. Thompson<sup>4</sup>, Sylvie Dinant<sup>1</sup>

1: Institut Jean-Pierre Bourgin UMR1318 INRA-AgroParisTech, Versailles France

2: INRA, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, Villenave d'Ornon, France

3: Université de Bordeaux, UMS3420, Bordeaux Imaging Center, F-33000 Bordeaux, France

4: College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

**Corresponding author:** Sylvie Dinant, Institut Jean-Pierre Bourgin UMR1318 INRA-AgroParisTech, Versailles France. Tel: 00 (33) 1 30 83 30 47 ; Fax: 00 (33) 1 30 83 30 96, email:

[sylvie.dinant@versailles.inra.fr](mailto:sylvie.dinant@versailles.inra.fr)

#### **email addresses**

TC: [tcayla@versailles.inra.fr](mailto:tcayla@versailles.inra.fr)

FR: [revers@bordeaux.inra.fr](mailto:revers@bordeaux.inra.fr)

BB: [brigitte.batailler@bordeaux.inra.fr](mailto:brigitte.batailler@bordeaux.inra.fr)

JA: [jaa25@psu.edu](mailto:jaa25@psu.edu)

GT: [gary.thompson@okstate.edu](mailto:gary.thompson@okstate.edu)

SD: [sylvie.dinant@versailles.inra.fr](mailto:sylvie.dinant@versailles.inra.fr)

**running title:** Companion cells and sieve elements organization  
not more than 50 characters, including spaces

**Key words:** lectin, PP2, RTM, SEO, phloem, sieve-element, companion cell, *Arabidopsis*  
up to 10 key words

## Summary

Phloem is a complex tissue composed of highly specialized cells. Most information on the subcellular organization of phloem cells has been obtained with transmission electron microscopy, giving static images of the cell components in these profound, pressurized cells. For live imaging of the phloem, we developed a method with confocal scanning laser microscopy, using subcellular fluorescent markers in the companion cells or the sieve elements, in the model species *Arabidopsis thaliana*. This approach first revealed a dense meshed network of organelles within the companion cells, revealing the packed organization of the endoplasmic reticulum surrounding the nucleus and the unusual topology of nucleus and vacuoles. By contrast, the localization of several protein bodies found inside the sieve elements was sparse and appressed at the cell periphery by the presence of P-proteins. These findings provided landmarks for exploring *in vivo* the organization and the dynamics of phloem cells. This allowed the description of the subcellular localization of the phloem lectin PP2-A1. In companion cells, PP2-A1 was found in the nucleus and cytosol, whereas, in the sieve elements, it encircled round-shape structures, some of them being identified as mitochondria. In sum, these data showed that the subcellular localization of PP2-A1 depends on the cell type and provided cytological evidence on a role of this lectin in nucleocytoplasmic shuttling in the companion cell whereas the protein appeared to be associated to the parietal ground matrix for anchorage of various organelles inside the sieve elements, where it might be involved in the retention of macromolecules.

## Introduction

The cellular biology of the sieve element/companion cell complex, the functional unit for long distance transport within the phloem, has been examined for years with regard to the central function of this complex in the transport of metabolites and macromolecules (Sjolund 1997). During their differentiation both cell types undergo dramatic remodeling of their subcellular organization. Thus in the SEs, the nucleus, the vacuole and the cytoskeleton disintegrate, whereas the endoplasmic reticulum, the mitochondria and the plastids undergo profound spatial and functional reorganizations. This is coupled to concomitant modifications in organization of CCs that become metabolically hyperactive (Esau 1969). These changes are associated to an adaptive metabolism in phloem cells. For example hypoxia in phloem cell leads to a specific sugar metabolism in the CCs (van Dongen *et al.* 2003) and an onset of antioxidant defense systems in the SEs (Walz *et al.* 2002).

However, *in vivo* subcellular localization of a given component in phloem cells can be a challenge. Phloem tissue is indeed located several cell layers underneath epidermal cells (Haritatos *et al.* 2000) and is difficult to image using conventional and confocal microscopy methods. The relative cell volumes of CCs and SEs vary depending on phloem zones – i.e. collection, transport and release phloem (Van Bel 2003) – making it difficult to identify these cells on the basis of their relative dimensions. For many plant species, the diameters of these cells is only few microns (Mullendore *et al.* 2010) and a certain lack of accuracy in the determination of phloem cell types is often encountered. However, the identification of a precise location for specific components in phloem cells can be critical for comprehensive analyses.

A breakthrough in *in vivo* study of functional phloem was achieved by Michael Knoblauch and Aart van Bel in 1998 (Knoblauch and van Bel 1998) by observations with confocal laser scanning microscopy of a peeled region of the leaf in *Vicia faba*, combined to the use of phloem-mobile fluorochromes. This enabled the characterization of the dispersion of forisomes (Knoblauch *et al.* 2001). But this method is not readily available for many other plant species. In the present work we adapted the protocol to the dicotyledon model species *Arabidopsis thaliana*, using a combination of fluorochromes and fluorescent proteins for the identification of subcellular compartments in phloem cells. It provided a thorough description *in vivo* of the CC and SE subcellular organization. The approach was validated for the subcellular localization of the phloem lectin PP2-A1 (Dinant *et al.* 2003) and of two other SE proteins, RTM1 and RTM2 (Chisholm *et al.* 2001).

## Results

### Peeling off *Arabidopsis* leaves for observations *in vivo* of intact phloem

Leaves of *Arabidopsis* were gently cut off from the plant, and immediately immersed under water. The epidermis and downstream spongy mesophyll cells at the abaxial leaf side were peeled off, to remove overlaying layers that contribute to the diffusion of light above the vascular tissues usually obtained by light microscopy. The method enabled to easily visualize from the abaxial leaf side in bright field microscopy the vascular bundles and the phloem tissues with an improved resolution compared to untreated leaves. To determine whether peeling off the cell layers overlaying the phloem tissue alter the integrity of the SEs and phloem loading, we carried out a loading assay with the phloem symplasmic tracer 5,6 carboxyfluorescein-diacetate (5,6 CFDA) (Oparka *et al.* 1994). The movement of the 5,6 CFDA from the peeled area was observed under UV light and monitored with a binocular microscope. From the peeled area where the 5,6 CFDA was applied, we observed in adjacent regions a progressive loading in minor veins and in higher order veins (Figure 1 a,b). The progression of the fluorescence into the veins was rapid (one minute for the 5,6 CFDA to reach the main vein) with 5,6 CFDA moving basipetally in the phloem. These observations confirmed that peeling does not block around phloem loading and does not trigger the sealing of the sieve tubes connected to the treated area.

We then assessed the transport activity of the sieve tubes in the peeled area. We peeled off a leaf at two areas, one for application of the tracer and one for observation of tracer translocation, half a centimeter apart and close to the midrib (Figure 1c). After loading from the application area, we observed similar rate of translocation of the tracer that reached the second peeled area on its pathway to the main vein (Figure 1d-f). A weak leakage was barely detectable in the observation zone, meaning that most SEs conserved their integrity. This showed that an *Arabidopsis* leaf out of which the abaxial side has been peeled off still presents an intact phloem, suitable for loading and transport. This method therefore appeared as suitable for further imaging of functional phloem.

### Use of PP2-A1:GFP fusion as a marker of CCs

For further live imaging of the phloem, we generated in *Arabidopsis thaliana* accession Col-0 several transgenic lines that expressed under the control of the companion-cell specific SUC2 promoter (Truernit and Sauer 1995) either a soluble GFP or a GFP fused to the phloem lectin PP2-A1 (Dinant, *et al.* 2003) (Figure 2a, Supporting Table S1). The vascular tissues were observed *in vivo* immediately after leaf peeling with confocal laser scanning microscopy (CLSM). The vein fluorescence was bright in all vein orders, including minor and secondary veins (Figure 2b) and enabled longitudinal observations of phloem cells. In *pSUC2:PP2-A1:GFP* plants, the GFP fluorescence signal was observed in the cytosol and the nucleus of CCs, no signal being found in SEs or phloem parenchyma cells (PPC). Similar observations were obtained with the *pSUC2:GFP:PP2-A1* and the *pSUC2:PP2-A1:CFP* constructs (Figure 2d-e), in minor and main vein (Figure 2c,d). The elongated shape and the dimensions of CCs, labeled with the fluorescent protein, were easily recognizable, with a 4- $\mu$ m average diameter for up to 100  $\mu$ m length. At the vein junctions, curved CCs showed a characteristic enlargement of their curvature (Figure 2d). In the main veins, up to 20 CCs could be observed in a single focal plane, in contrast with minor veins, having 3 to 5 CCs.

By contrast, the fluorescence in *pSUC2:GFP* plants was observed in PPCs in addition to CCs (Figure 2f). PPCs appeared as thicker, up to 17- $\mu$ m diameter, and were observed in lateral positions within the veins. No fluorescence could be found in the SEs in these plants.

### **Cytological criteria for phloem cell identification**

In *pSUC2:PP2-A1:GFP* plants, the GFP fluorescence signal was strictly limited to CCs. When looking at the autofluorescence of the chlorophyll in these cells, we observed evenly spaced chloroplasts, aligned into single files of six to ten plastids per cell. The diameter of these plastids was on average 2.89  $\mu$ m ( $\pm$ 0.06 sem; n=82), in contrast with plastids from mesophyll cells, which appeared on average 4.88  $\mu$ m ( $\pm$ 0.07 sem; n=111) (Figure 3a). This feature is sufficiently characteristic to constitute a landmark of CCs. Indeed no other cell types present such chloroplast alignment. By contrast, the chloroplasts from the PPCs, (3.01  $\pm$ 0.06 sem; n=73) showing also a smaller size, were located on circular position at the cell periphery (Figure 3a). Hence chloroplast positions and sizes can be used to unambiguously identify phloem cells. Similar observations of these positions were done in *p35S:RbcS:GFP* plants with a GFP-tag addressed to the chloroplast (data not shown).

With these criteria in mind, we analyzed the organization of phloem cells with a set of transgenic lines expressing subcellular fluorescent markers (Supporting Table 2). Leaves were first peeled off as described and phloem cells were identified using chloroplast autofluorescence. As expected, phloem cells were easily recognizable and could be described with regard to the marker used. An illustration of this approach is the analysis of the *p35S:GFP:LTI6b* line (Cutler *et al.* 2000) that carries on a plasma membrane marker. In these plants we could observe the plasma membrane in CCs and PPCs (Figure 3b). In addition, we observed the PM fluorescent marker in SEs, recognized because chloroplasts were lacking and thinner diameter (1-3  $\mu$ m). At the vicinity of the sieve plates between SEs, the fluorescence of the PM was even brighter. This shows the usefulness of these guidelines for live imaging of CCs, SEs and PPCs in *Arabidopsis* leaf.

### **Subcellular organization of the CCs**

The subcellular organization of CCs *in vivo* was assessed in crosses between the *pSUC2:PP2-A1:CFP* line and any of the lines expressing subcellular markers fused to fluorescent markers (Supporting Table 2). Observations were carried out on peeled leaves, and CCs were identified with both chlorophyll autofluorescence and CFP blue fluorescence resulting from the PP2-A1 fusion protein. When observed with *pSUC2:PP2-A1:CFP* (Figure 2c-e), CCs showed high compartmentalization, indicating the presence of numerous organelles. As mentioned, CCs typically contained 8 to 10 chloroplasts. The nuclei in CCs, observed in H2B-RFP plants - with a nucleus marker - appeared dense and compacted, packed in the cell (Figure 4a). This was confirmed by observations in ER-YFP plants - with an endoplasmic reticulum marker, which showed a thin network surrounding the nucleus. In contrast to the ER in PPCs that formed a mesh network in the cells (Supporting Figure 2), the ER in CCs appeared compacted, with an uneven distribution predominantly packed at the periphery of the cell (Figure 4b). In COX4-YFP plants (Figure 4c), we observed a large number of mitochondria located in the cytosol and distributed around the cell in a dense network. By contrast, the observation of the tonoplast with  $\gamma$ TIP:YFP plants showed a crenelated shape, with a succession of invaginations (Figure 4d). Several vacuoles were frequently observed per

cell. In these cells, the organization of the cytoskeleton was observed in GFP:MBD plants, which labeled the cortical microtubules, and in FABD2:GFP plants, which labelled the actin filaments. The structure of the actin filaments was difficult to observe with FABD2:GFP because the fluorescence signal was faint compared to other markers (Supplementary Figure 3). Few thick bundle actin filaments were arranged into a longitudinal orientation within the CCs in addition to a fine network of actin filaments (Supplementary Figure 3 a-c). By contrast, the cortical microtubules (CMTs), visualized with GFP:MBD, presented a highly ordered organization in CCs, with thin microtubule arrays. The orientation of the cortical microtubules (CMT) was oblique in most CCs, although transverse and longitudinal microtubules were observed in some cells (Figure 4e, Supporting Figure 3 d-f). In bended CCs found at vein junctions, the organization was typically oblique (Figure 4e). The CMTs were also observed in PPCs, in which they typically appeared as oblique or longitudinal.

### **Subcellular organization of the SEs**

In this regard, it is interesting to note that, although the CMT fluorescence signal was bright and easily detected in CCs and in PPCs, no signal was found in the SEs. Likewise, we did not observe any signal in the SEs of plants from FABD2:GFP lines. No signal was found either in the SEs from H2B-RFP, COX4-YFP,  $\gamma$ TIP:YFP, and H2B-RFP lines. The only line showing fluorescence was the ER:YFP that showed a thin fluorescence on lateral positions in SEs (Figure 5a, Supporting Figure 2). In these cells, the SE reticulum (SER) was organized as successions of narrow stacks at the cell borders (Supporting Figure 2). We also used a vital dye, MitoTracker Red CMXRos, to visualize mitochondria in SEs. After incubation for 5 min in this dye, it was possible to observe large number mitochondria per cell, exceeding several dozens (Figure 5b). These images, in addition to the visualization of the SE PM in the phloem of Lti6b:GFP plants (Figure 3b), enabled to position main components of the SE, i.e. PM, SER and mitochondria.

We examined the location of known sieve tube proteins in the leaves of transgenic lines expressing fluorescent proteins synthesized in the SEs (Supporting Table 1 and 2). The method of preparation of the samples was first validated with the observation of structural filamentous SEOR2 protein in the sieve tubes of plants from a *pSEOR2:SEOR2:GFP* line (Anstead *et al.* 2012). As expected, filaments were observed in the SEs, up to 200  $\mu$ m long, that looked like the ones described in the root SEs (Figure 5c,d). In some cells, they were organized as spherical protein agglomerates, consistent with published data. These structures have been proposed to appear during early stages of development in root (Froelich *et al.* 2011, Anstead, *et al.* 2012). Similar results were obtained in *pSEOR1:SEOR1:GFP* plants (Froelich, *et al.* 2011). Two proteins were examined, which have previously been found in the SEs, RTM1 and RTM2 (Chisholm, *et al.* 2001). In GFP:RTM1 plants, we observed a large number of spherical protein bodies with an apparent diameter of 1.16  $\mu$ m ( $\pm$  0.01 sem, n= 612) in the SEs. The size of these bodies was in a size range of the diameter of SE plasts (Froelich, *et al.* 2011). These bodies were aligned at the cell periphery, and the number of protein bodies exceeded 50 spots per cell (Figure 5e). By contrast, we observed in RTM2:GFP plants a reticulated organization (Figure 5f) that followed the plasma membrane and also surrounded yet uncharacterized vesicles present at the vicinity of the lateral membranes in SEs. Although the nature of these vesicles in the SEs is unknown, they have been frequently observed in transmission electron microscopy micrographies from the SEs (Supporting Figure 4).

## Localization of PP2-A1 in the SEs

The location of PP2-A1 in the SEs, which is the main site of accumulation of these proteins *in vivo* (Batailler *et al.* 2012) was assessed with the *pSEOR2:PP2-A1:GFP* lines (Supporting Table 1). In these plants, the expression of PP2-A1:GFP was driven with a 1 kb promoter of *SEOR2*, a gene that is expressed in immature SEs (Rüping *et al.* 2010, Anstead, *et al.* 2012). In SEs, PP2-A1 formed round-shape to ovoid- like bodies found on the lateral cell borders (Figure 5g). The distribution of the size of these bodies showed a bimodal distribution with a main peak at 0.52  $\mu\text{m}$  with the majority of the bodies (4/5) and a second one, at 0.96  $\mu\text{m}$ , representing about one fifth of the bodies (n=328). These bodies were motionless, most probably anchored to membranes. Their distribution was even along the cell borders (Figure 6a) reminiscent of the distribution of the mitochondria in SEs observed with MitoTracker Red. When decreasing the CLSM laser intensity, most GFP fluorescence signal was observed as small rings surrounding unlabeled area (Figure 6b,c, Supporting Figure 5), showing that GFP tagged-proteins accumulated at the periphery of SE organelles. When leaf samples from *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plants were treated with MitoTracker Red, we observed that the red fluorescence was encircled by a GFP signal due to PP2-A1:GFP (Figure 6 d-f), and these organelles corresponded to the class of 0.52  $\mu\text{m}$ -bodies previously identified. On TEM micrographs of SEs we confirmed that the mitochondria are evenly attached to the plasma membranes in the SEs, and have an apparent diameter of 0.458  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.026; n=12). These data showed that PP2-A1 is at least in part located around the SE mitochondria. In addition, PP2-A1:GFP fluorescence also surrounded larger bodies that were not labeled with the MitoTracker Red that corresponded to the class of 1  $\mu\text{m}$ -bodies.

## Differential location of PP2-A1 in the SE depending on the differentiation stage

Since the *SEOR2* promoter is expressed early during the differentiation of the SE in immature SE (Rüping, *et al.* 2010). we followed the localization of PP2-A1:GFP in the SE at different stages of differentiation in *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plants. At the earlier stage of differentiation, easily recognizable because the SEs were still vacuolated (Figure 7a), PP2-A1:GFP appeared soluble in the cells. Such cells presented on rare occasions damaged chloroplasts, which could be observed by autofluorescence. In cells that showed a more advance differentiation, the cell compartments have progressively disappeared, the volume of cytosol have increased, the autofluorescence of the chloroplasts have vanished, whereas PP2-A1:GFP was still soluble in the cell cytosol (Figure 7b). Then progressively PP2-A1:GFP aggregated into small points of fluorescence, suggesting that anchoring of PP2-A1 around mitochondria or additional organelles is a process occurring during early SE differentiation (Figure 7c,d). After the disintegration of the vacuoles at the last stages of SE differentiation, the cytosolic signal completely disappeared and afterwards PP2-A1:GFP only appeared as discrete spots (Figure 7e).

## **Discussion**

### **Live imaging of phloem cells in *Arabidopsis***

To observe *in vivo* the phloem in the leaf of *Arabidopsis*, a “peeled off” method has been developed that enabled imaging of the subcellular organization of phloem cells. After peeling, the sieve tubes were still active for loading and transport of 5,6 CFDA and the organization of cytoskeleton was maintained in the CCs, revealing that the preparation of the samples did not alter the activity and organization of these cells. Similar methods have been used in *Vicia faba* (Knoblauch and van Bel 1998) and in tobacco (Martens *et al.* 2006) to visualize the structure of P-proteins and the continuity of the endoplasmic reticulum between the CCs and the SEs. In combination with the use of PP2-A1 fluorescent derivatives expressed either in the CCs or in the SEs, we were able to describe for the first time the topology of several subcellular compartments in the CCs and the SEs.

### **Landmarks for the identification of CCs and SEs**

An obvious feature to identify CCs in the leaf is the remarkable alignment of chloroplasts, one single file per cell, filling up about one third of the cell volume. Chloroplasts in the CCs could be observed by their autofluorescence. Therefore, the typical alignment of chloroplasts together with cell morphology and size represent the simplest landmark to identify CCs. By contrast, the distribution of the chloroplasts in PPCs at the cell periphery constitutes also a useful landmark for PPC identification. The chloroplast-associated autofluorescence was not observed in the SEs, consistent with the maturation of SE plastids in amyloplasts. By contrast, the observation of the SEs in the leaf was more difficult since most GFP markers, including those addressed to mitochondria, plastids, nucleus, or vacuole did not label SEs. However, the membrane markers GFP:Lti6b, and ER:YFP, which labeled respectively the plasma membrane and ER, could be efficiently used for the observation of the SEs, in combination with chloroplast fluorescence to discriminate the thin SE from their neighbor CC. The various SE-located GFP markers, including GFP:RTM1, RTM2:GFP, SEOR1:GFP, SEOR2:GFP and PP2-A1:GFP, expressed either from their own or from the SEOR2 promoters, constitute also good markers for the identification of the SEs. Remarkably, none of these markers diffused in adjacent cells, revealing that they are not soluble in the SEs.

### **Dense and tight organization in CCs**

As already stated, chloroplasts filled up a large volume in CCs, together with vacuoles that also occupied a large volume. As a consequence, the nucleus was compacted along the lateral sides of CC and its shape was different than found in other cell types. Other organelles, including mitochondria and ER also appeared tightly compacted, with a high density of the number of mitochondria relative to the size of these cells. These observations are consistent with descriptions carried out with TEM (Esau 1969), and these characteristics constitute additional discriminant landmarks for these cells.

### **Cytoskeleton and polarity in CCs**

We observed the organization of the cortical microtubules (CMT) and the actin filaments in CCs. Most observations were carried out on leaves that were still expanding. In this regard it is interesting to note that depending on the leaf samples, the CMT displayed transverse,

oblique or longitudinal orientations. The orientation of the CMT is known to change steadily during cell expansion in many cells (Granger and Cyr 2001, Paradez *et al.* 2006). Remarkably the various orientations of CMTs indicated ongoing cell elongation in most of these cells.

By contrast, the observation of F-actin was more difficult in the CCs. Few actin bundles were observed using the FABD2-GFP marker. Longitudinal actin bundles could however be observed in addition to a thin network of actin filaments, which is very similar to orientation found in other cell types, such as hypocotyl epidermal cells or elongated endodermis cells (Voigt *et al.* 2005). The actin cytoskeleton is important for polar growth (**Erreur ! Référence de lien hypertexte non valide.**), suggesting that CCs might still be undergoing anisotropic elongation. The actin cytoskeleton is also essential for endocytosis (Geldner *et al.* 2001, Friml 2010), which may be critical in the highly polarized CCs for proper plasma membrane targeting of polar transporters acting in these cells. Although both CMT and F-actin were observed *in vivo* in CCs, we did not observe any fluorescence signal in SEs using these markers, suggesting either that there is no trafficking of cytoskeleton elements from the CCs, or, as usually stated, that cytoskeleton elements are not organized in the SEs (Evert 1990).

### **SEs: not such empty cells**

There are still many unanswered questions on the structural elements present within the SEs (Knoblauch and Peters 2010). Using fluorescent markers and fluorochromes, we were able to observe a range of organelles in the SEs. The SEOR1-GFP and SEOR2-GFP fusions were easily observed in the SEs of the leaf, and present a distribution similar to that found in the root (Froelich, *et al.* 2011, Anstead, *et al.* 2012). The SER was readily observed with the ER-YFP fusion marker and appeared stuck to the plasma membrane, as observed in the SE of tobacco (Martens, *et al.* 2006). We also observed a surprisingly high number of mitochondria in the SEs with MitoTracker Red. Metabolic activities have indeed been predicted in these cells from biochemical studies (Kenneke *et al.* 1971, Lehmann 1973a, Lehmann 1973b, Geigenberger *et al.* 1993), and more recently by proteomic analyses (Dinant and Lucas 2012). Our findings indicate a high frequency of mitochondria along the SE lateral sides, supporting potentially an intense metabolic activity. Although large and modified plastids - with a diameter of about 1  $\mu\text{m}$  - are also present in the SEs (Froelich, *et al.* 2011), we could not visualize them using current standard markers.

Intact SE plastids have only recently been observed with TEM (Froelich, *et al.* 2011) and the number of plastids per cell is not yet known. We observed in the SEs large bodies with a diameter close to 1  $\mu\text{m}$  with the GFP-RTM1 marker. This size could match the size of the SE amyloplasts. GFP-RTM1 bodies were evenly aligned along the sieve tubes and their number per SE include several dozens of spots. In sum we need to develop other methods for observation of SE plastids, which would be useful to determine the organelles in the SE to which RTM1 is binding. The RTM2-GFP fluorescence was associated to smaller bodies at the periphery of the SEs, whose nature was also unknown. They may correspond to the numerous small vesicles embedded in the SE dense matrix that we observed in TEM images. Similar vesicles have been also reported recently in the parietal ground matrix (Froelich, *et al.* 2011). Overall these findings indicate the presence in the SE of a number of bodies or vesicles that are yet not identified. Even though such structures have already been observed in SE, they have often been considered in TEM imaging as artefacts due to fixations steps. The combination of new cryo-fixation protocols, adapted to the highly pressurized SE cells (Froelich, *et al.* 2011) and the fluorescent markers studied in the current work should be critical to characterize these SE specific structures and identify their function.

## **Nucleocytoplasmic localization of PP2-A1 in the CCs**

PP2-A1 belongs to a unique family of plant lectins in angiosperms (Dinant, *et al.* 2003). PP2 proteins bind to oligomers of N-acetyl glucosamine (GlcNAc) (Sabnis and Hart 1978, Allen 1979, Read and Northcote 1983, Dinant, *et al.* 2003). We have also shown that *Arabidopsis* PP2-A1 binds with high affinity to small oligomers of GlcNAc (Beneteau *et al.* 2010). GlcNAc oligomers are recruited in plant cells for O-linked glycosylation of proteins involved in various signaling pathways including nucleocytoplasmic shuttling (Olszewski *et al.* 2010). An example of O-GlcNAc glycosylation has been described for phloem sap proteins (Taoka *et al.* 2007), it has been proposed that the transport through plasmodesmata between CC and SE, like shuttling between the nucleus and the cytoplasm, may involve O-linked GlcNAc glycosylation (Taoka, *et al.* 2007). Since PP2-A1 binds to GlcNAc oligomers and interacts with phloem sap proteins, it has also been proposed that this protein also have a role in cell-to-cell shuttling between CC and SE (Beneteau, *et al.* 2010). Using GFP fusions, we showed that in the CC PP2-A1 is located both in the nucleus and in the cytosol. These findings suggest that PP2-A1 is also involved in nucleocytoplasmic shuttling within CC. Nictaba, a related tobacco protein belonging to the PP2 family (Dinant, *et al.* 2003), has also been shown to act in nucleocytoplasmic shuttling (Lannoo *et al.* 2006, Schouppe *et al.* 2011). PP2 proteins may act as shuttle proteins for translocation of targeted glycosylated proteins either between nucleus and cytosol or for cell-to-cell movement through plasmodesmata. In the phloem PP2-A1 may thus be involved in shuttling between the nucleus and the cytosol from CC, and then to the cytosol of adjacent SE.

## **Localization of PP2-A1 in the parietal ground matrix of the SEs**

The SEs undergo during their differentiation a dramatic reorganization to maintain the remaining organelles attached to the plasma membrane at the lateral sides of the cells. This enables sieve tubes to support mass flow and to compensate for high pressure generated by sugar loading, for disappearance of the cytoskeleton. However how these subcellular compartments remained anchored to the plasma membrane or to the SE reticulum is a mystery. The improvement of fixation methods to observe the phloem cells in TEM has allowed to describe minute clamp structures anchored between the membrane of organelles, such as mitochondria, the SER and the plasma membrane (Ehlers *et al.* 2000). These structures constitute a parietal ground matrix (Froelich, *et al.* 2011) whose components are so far unknown. Using immunofluorescence we have shown that PP2-A1 mainly accumulated in the SEs and is associated to small yet unidentified bodies (Batailler, *et al.* 2012). Using a GFP-tagged PP2-A1, we now showed that during the early phases of SE differentiation, PP2-A1 is soluble in the cytosol but when the organelles begin to reorganize inside SE, PP2-A1 becomes attached to the periphery of the remaining organelles, including mitochondria, where it remains anchored. We also identified a second class of organelles, with a diameter of about 1µm as plastids. This is consistent with the observations using immunogold labeling that PP2-A1 interacts with SE plastids, in addition to an association with the P-proteins (Batailler, *et al.* 2012). Thus in mature SE PP2-A1 accumulated around organelles and is not any longer soluble. Overall our data indicates that PP2-A1 may be part of the clamp-like structures involved in the anchorage of organelles inside the SEs. In addition, because PP2 proteins present lectin activity and RNA-binding properties for interaction with mRNAs (Gómez and

Pallás 2004, Ham *et al.* 2009), these structures may also have a role in the retention of proteins and RNAs inside SEs.

## Experimental procedures

### Plant materials and growth conditions

*Arabidopsis thaliana* (Columbia accession) plants were used for plant transformation and *in vivo* observations. Plants were grown in the greenhouse in long-day conditions (16 hr light/8 hr night cycle) in soil (Tref Substrates or sand) and watered with Plant-Prod nutritive solution (Fertil). The transgenic lines expressing subcellular markers are described in Supplementary Table 2. Crosses were realized on homozygous plants.

### Expression vectors

The binary vectors for expression of translational fluorescent fusions (*Supplementary Table S1*) were done using the GATEWAY™ system (Invitrogen). Promoter regions for *AtSUC2* (1400bp) and *AtSEOR2* (1000bp) were amplified from genomic DNA extracted from *Arabidopsis* accession Col-O and cloned in pCR®II TOPO® (Invitrogen). After amplification with the PP2-A1Not and PP2-A1XbaI primers (*Supplementary Table S3*), the coding sequence of *AtPP2-A1* was cloned in the NotI and XbaI sites of pCR®II TOPO®. The first PCR step for the creation of ATTB sites was performed with the primers pSUC2attb1, pSEOR2attb1 and PP2-A1attb2. The second PCR step was performed with the primers attB1 and attB2 to reconstitute intact attB recombination sites. These PCR fragments were introduced into pDONR™207 (Invitrogen) by BP recombination. The list of destination vectors for the LR recombination is described in *Supplementary Table S1*. The constructs were verified by sequencing.

### Plant transformation

The binary vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* C58pMP90 (Koncz and Schell 1986) by electroporation. For the pGKG derivatives vectors, the helper vector pSoup (Hellens *et al.* 2000) was added to the *Agrobacterium strain*. *Arabidopsis* plants were transformed by floral dipping (Clough and Bent 1998). Transformants were selected on kanamycin (50 mg.L<sup>-1</sup>), hygromycin (15 mg.L<sup>-1</sup>) or glufosinate (15 mg.L<sup>-1</sup>), depending on the binary vector. For each construct, at least 8 primary transformants were screened and one line was chosen for further use on the basis of its lack of morphological alterations and good fluorescence. Most observations were realized on homozygous F3 plants.

### Cytology

Observations were realized on the veins of rosette or stem leaves. To get clear images of the leaf vein system, the abaxial epidermis was peeled off on a small area (1 cm<sup>2</sup>) using a razor blade, rinsed and mounted in water or in dye directly prior to imaging, as described by Martens (Martens, *et al.* 2006). The best observations were obtained on leaves that were still expanding. For observation of mitochondria, samples were incubated for 5 min and mounted directly in MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) at a concentration of 2.5 µg.mL<sup>-1</sup>.

### Phloem loading assay

To image phloem loading, a small surface (~25 mm<sup>2</sup>) from the abaxial surface of source leaves, at the leaf margin and distant from the main vein, was gently peeled with a razor blade,

and 5  $\mu\text{L}$  of 5,6 carboxyfluorescein diacetate (5,6 CFDA)–mixed isomers (60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Invitrogen) was applied to this surface. The treated leaves were immediately observed on a binocular microscope Nikon SM7/500 under UV light with a GFP filter and the loading of the fluorescent dye was monitored every 1.5 s for 2 min.

### **Confocal laser scanning microscopy**

For confocal laser scanning microscopy, leaf samples were mounted in water. Fluorescence images with GFP and CFP fusions were obtained using a Leica TCS-SP2-AOBS spectral confocal laser-scanning microscope (Leica), equipped with a Leica HCX PL APO x 63 water immersion objectives. CFP was excited using a 405 nm diode laser, GFP and chloroplasts were excited using the 488 nm line of the argon laser. Emission of fluorescence was detected in the range of 450–520 nm for CFP construct, 500–560 nm for GFP constructs, 600–650 nm for MitoTracker Red and 684–784 nm for chloroplast autofluorescence. Images were recorded and processed using the LCS software 2.5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

### **Transmission electron microscopy (TEM) ultrastructure**

The main vein of mature leaves and petioles was prepared as described elsewhere, with samples included in Epon resin (Batailler *et al.*, 2012). Ultrathin sections (60 nm) were cut on a Leica Ultracut-E microtome, stained with 7% uranyl acetate then with lead citrate. Sections were examined in a CM10 TEM operating at 80 kV (FEI) and equipped with a digital X-60 AMT camera.

### **Image analysis**

The size of the protein bodies observed by CLSM was analyzed with the NIH image analysis program ImageJ v1.43u (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Similarly TEM images were analyzed to assess the size in SEs of the plastids and of the mitochondria.

### **Genes accession numbers**

The AGI numbers of the genes used in this work are for *AtPP2-A1*: At4g19840; *AtPP2-A2*: At4g19850, *AtSEOR1*: At3g01680; *AtSEOR2*: At3g01670; *AtSUC2*: At1g22710, *AtRTM1*: At1g05760; *AtRTM2*: At5g04890; *AtLti6B*: At3g05890.

### **Acknowledgements**

We thank Frederic Berger (Temasek Life Sciences Laboratory, Singapore) for supplying the *Arabidopsis* transgenic lines expressing H2B:RFP, Boris Voigt (Bonn, Germany) for lines expressing FABD2:GFP, Martine Pastuglia (Versailles, France) for lines expressing MDB:GFP and Jim Carrington for the lines expressing RTM1:GFP and RTM2:GFP. We thank Olivier Grandjean for his assistance with CLSM, Béatrice Satiat-Jeunemaître for stimulating discussions, Laurence Bill and Nelly Wolff for their assistance with the preparation of plant materials and Françoise Vilaine and Rozenn le Hir for their advices and support. We thank Lionel Gissot for completing a large library of GFP lines available in the laboratory. We gratefully acknowledge the help of Patrick Grillot and Bruno Letarnek for assistance in greenhouses.

## Short legends for Supporting Information

### Supplementary Figure S1

#### Live imaging of PP2-A2:YFP in the companion cells

Fluorescent proteins observed on peeled leaves from pSUC2:PP2-A2:GFP. Images were obtained with CLSM, with GFP fluorescence in green. PP2-A2:GFP is located in the cytoplasm and the nucleus of CC. No fluorescence was observed in the SE. cc: companion cell. Nu: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m.

### Supplementary Figure S2

#### Organization of the sieve element reticulum in the CCs and in the SEs

Fluorescent proteins observed on leaves from pSUC2:PP2-A1:CFP x p35S:ER:GFP plants. Images were obtained with CLSM, with GFP fluorescence in red and CFP fluorescence in green (false colors). (a) Overview of phloem cells, showing the distribution of the ER in the phloem parenchyma, as a mesh network, and in the companion cells and sieve elements; (b) Details on the ER in CCs, showing the punctate organization of the ER; (c) Details showing the organization of SER in the sieve elements. Cc: companion cell. Se: sieve element. Pp: phloem parenchyma. Scale bar is 10 $\mu$ m in (b), 5 $\mu$ m in (c)

### Supplementary Figure S3

#### Organization of the cytoskeleton in CCs and PPCs

Fluorescent proteins observed on leaves from pSUC2:PP2-A1:CFP x p35S:FABD2:GFP and pSUC2:PP2-A1:CFP x p35S:GFP: MBD plants. Images were obtained with CLSM, with GFP fluorescence in red and yellow and CFP fluorescence in green (false colors). (a) –(c) Live imaging in false colors of a colocalisation of the actin network (in red) and PP2-A1:CFP (green) observed in pSUC2:PP2-A1:CFP x p35S:FABD2:GFP plants. The organization of the actin network in the CC show thick actin bundles and thin actin filaments. (d) Overview of the microtubules network in a order II vein. Arrow show different orientation of the cortical microtubules. (e) and (f) Details of the microtubules in CCs and PPCs. cc: companion cell. pp: phloem parenchyma. Stars represent nuclei. Scale bar is 10  $\mu$ m in (c) and (d), and 5 $\mu$ M in (e) and (f).

### Supplementary Figure S4

#### Vesicles observed by TEM in the SEs

Vesicles observed in the SEs at the periphery of the cell, frequently in close contact with the plasma membrane. (a): overview of a sieve element in TEM. (b) and (c) are details of these vesicles. CC: companion cell. SE: sieve element. CW: cell wall. Scale bar is 2  $\mu$ m in (a) and 500nm in (b) and (c).

### Supplementary Figure S5

#### Distribution of the PP2-A1:GFP bodies in the SEs

Fluorescent proteins observed on leaves from pSEOR2:PP2-A1:GFP plant. Images were obtained with CLSM, with GFP fluorescence in green (false colors). (a) and (b) Localisation of PP2-A1 around mitochondria in the SE (represented by stars) but also close to organites with the size of plastids (represented with an arrow)

(c) is a density histogram of the size of PP2-A1:GFP bodies in the sieve elements. The distribution is bimodal, with two peaks, one around 500nm, and another around 1 $\mu$ m. se: sieve element. Scale bar: 5 $\mu$ m

### **Movie S1: Transport of 5-6 CFDA in the phloem**

The 5-6 CFDA is loaded in the phloem, and move toward the petiole. The brighter area is the peeled area observed in Figure 1, (c).

## Figure legends

### Figure 1

#### **Loading and long distance transport of 5,6 CFDA in the vascular tissues cells of *Arabidopsis* leaf**

Leaves observed on a binocular microscope and shown in false colors. Fluorescence appears in black, on a light grey background (a,b) Observation of the delivery of fluorescence after application of 5,6 CFDA from a peeled area on the leaf. (a) After 8 s, the fluorescent already labels the veins in the loading area. (b) After 180 s, the labelling extends to the main vein, secondary vein and minor veins around the loading area.

(c-f) Observation of the transport of fluorescence after application of 5,6 CFDA in the peeled area. (c) Observation of the leaf by autofluorescence immediately after application of the tracer. Peeled areas are less fluorescent, which improve the observation of the vascular network (black arrows). For this experiment, a single vein has been peeled in two different locations, one loading area (la) and the transport area (ta). The 5-6 CFDA symplasmic tracer is loaded in the loading area.

(d) 10 seconds after application of 5,6 CFDA, the fluorescence concentrates in the vascular tissues, indicating loading.

(e) 40 seconds after application of 5,6 CFDA, the fluorescence is transported, and begin to be visible in the transport area.

(f) 100 seconds after application of 5,6 CFDA, the fluorescence moves below the transport area.

La: loading area; ta: transport area; mv: minor vein, sv: secondary vein; v: main vein. Scale bar: 500  $\mu$ m.

### Figure 2

#### **Live imaging of PP2-A1:GFP, PP2-A2:GFP and GFP in phloem cells in a 4-week old leaf**

Fluorescent GFP-tagged proteins observed on leaves from *pSUC2:PP2-A1:GFP*, *pSUC2:PP2-A2:GFP* and *pSUC2:GFP* plants. Images were obtained with CLSM. GFP signal in green, and chlorophyll autofluorescence in red.

(a) Constructs realized for the observation of GFP, PP2-A1 and PP2-A2 in the phloem.

(b) Observation in a peeled leaf of a soluble GFP expressed under the control of the SUC2 promoter in a *pSUC2:GFP* plant. The GFP fluorescence is observed in the veins of order II, III and IV.

(c) Localization of PP2-A1:GFP fluorescence in a main vein from *pSUC2:PP2-A1:GFP* plant. GFP is localized only in the CC.

(d) Details of the localization of PP2-A1:GFP fluorescence in a main vein from *pSUC2:PP2-A1:GFP* plant. It shows the organization of CC at a vein junction. Bent CCs (indicated by \*) are typically found at crossings.

(e) Details of the localization of GFP fluorescence in a main vein from *pSUC2:GFP* plant. The soluble GFP is found in CCs and PPCs.

(f) Localization of the PP2-A2:GFP fluorescence in a minor vein from *pSUC2:PP2-A2:GFP* plant. PP2-A2 is found in the cytosol and in the nucleus of the CC.

Cc = companion cell; pp = phloem parenchyma cell. Scale bar: b): 50  $\mu$ m; (c) – (f): 10  $\mu$ m

### Figure 3 Live imaging of SE, CC and PP

Fluorescent proteins observed on leaves from *pSUC2:PP2-A1:CFP* and *p35S:GFP:Lti6B* plants. Images were obtained with CLSM. GFP and CFP fluorescence in green, and chlorophyll autofluorescence in red (False colors).

(a) Typical distribution of plastids in the CCs. The CCs were identified based on the CFP fluorescence in a *pSUC2:PP2-A1:CFP* plant. In the CCs the chloroplasts observed by their the autofluorescence showed alignments on a single file whereas in PPs, chloroplasts showed a distribution at the cell periphery.

(b) Typical morphology of phloem cells. The distribution of plastids was used to identify two of phloem cell types, CCs and PPCs. In *p35S:Lti6B:GFP* plant, the Lti6B:GFP fluorescence also allows to identify the SEs. PPs are the largest cells and are located on the borders of the vasculature. SEs are the smallest one and are easily recognizable by the absence of chloroplasts. CCs show typical alignments of chloroplasts. pp: phloem parenchyma, cc: companion cell, \*: sieve element. Scale bar: 5µm

### Figure 4

#### Live imaging of subcellular compartments in CCs and PPCs

Fluorescent proteins observed on leaves from plants resulting from crosses between *pSUC2:PP2-A1:CFP* and lines carrying GFP addressed to different subcellular compartments. Images were obtained with CLSM. GFP and CFP fluorescence are presented in false colors, with CFP in green (left panel) and GFP, YFP or RFP in red (center panel). Right panels represent overlays.

(a) Observation of nuclei in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:H2B:RFP* plant. CC possesses square-like nuclei.

(b) Observation of endoplasmic reticulum in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:ER:YFP* plant. In CCs, ER is mainly found next to the plasma membrane of cc, and around the nucleus. On this image, the ER was also observed in a SE, aligned between two arrays of CCs.

(c) Observation of mitochondria in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:COX4:GFP* plant. On this image a large numbers of mitochondria is observed in CCs.

(d) Observation of vacuoles in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:yTIP:YFP* plant. The image shows several vacuoles per CC.

(e) Observation of cortical microtubules in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:GFP:MDB* plant.

cc: companion cell. Arrow: nucleus. Stars indicate the vacuoles. scale bar =:5µm

### Figure 5

#### Live imaging of subcellular compartments and protein bodies in SEs

Fluorescent proteins observed on leaves from plants of lines carrying GFP addressed to different subcellular compartments. Images were obtained with CLSM. GFP fluorescence in

green, autofluorescence of plastids in red. The fluorescence of the MitoTracker Red in green (false colors).

(a) Observation of the endoplasmic reticulum in the CCs and the SEs of a *p35S:ER:YFP* plant. \* indicates the nucleus of CCs. Arrows indicate sieve plates inside the SE.

(b) Observation of mitochondria using the MitoTracker red fluorescent dye. Mitochondria are found both in the CCs and in the SEs.

(c) and (d) Observation of the P-proteins in the SEs of a *pSEOR2:SEOR2:GFP* plant. On these image, the P-proteins show a typical plug (arrow) next to the sieve plate (in (c)), as well as discrete filaments in the lumen of the SE and protein agglomerates (in (d)).

(e) Observation of discrete bodies in *p35S:RTM1:GFP* plant. The size of the bodies in the SEs reaches 1  $\mu\text{m}$ .

(f) Observation of fluorescence in *p35S:GFP:RTM2* plant. The signal is mostly localized at the vicinity of the plasma membrane inside the SE. It is also observed around spherical vesicles (\*) located next to the plasma membrane.

(g) Observation of PP2-A1:GFP in a *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plant. PP2-A1 fluorescence forms in the SEs discrete spots localized on the borders of the cell and present at the vicinity of the sieve plate.

Scale bar: a), (c) – (e), (g): 5 $\mu\text{m}$ . (b) and (f): 3 $\mu\text{m}$

## Figure 6

### Subcellular location of PP2-A1 in the SE

PP2-A1:GFP fluorescent protein observed on leaves of *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plants. Images were obtained with CLSM. GFP fluorescence in green, autofluorescence of plastids in red. For comparison, TEM images showing details of mitochondria in the SEs.

(a) to (d) Observation of PP2-A1:GFP in a *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plant. The fluorescence of PP2-A1:GFP encircled small organelles, most of them being labelled with the MitoTracker Red mitochondria dye.

(a): localization of PP2-A1 in a mature SE. PP2-A1 is located close to the membrane, probably in the SER. Chloroplasts present in the CCs are in red (b) and (c) Details of the localization of PP2-A1:GFP around organelles present in the SEs. Arrows indicates round shape structure surrounded by PP2-A1, and stars (\*) indicate PP2-A1 aggregates.

(d), (e), (f) Colocalization of PP2-A1:GFP with MitoTracker Red. GFP is observed in green and MitoTracker is observed in Red. Arrows indicate mitochondria surrounded by PP2-A1:GFP.

(g) Longitudinal section of a SE observed with TEM. Sieve plate is visible on the right side of the cell. Filaments of P-Proteins are present in the cell lumen and mitochondria are stuck in the SER.

(h) and (i) Details of mitochondria and SER observed in a longitudinal and atransversal section, respectively in (h) and (i).

er: endoplasmic reticulum; mi: mitochondria; pl: plastid; pp: P-proteins; CC: companion cell; se: sieve element. scale bar: (a): 5 $\mu\text{m}$ ; (b),(c): 2 $\mu\text{m}$ ; (d) – (f): 3  $\mu\text{m}$ , (g): 2 $\mu\text{m}$  (h) and (i): 1 $\mu\text{m}$

## Figure 7

## Live imaging of PP2-A1:GFP in SEs ongoing differentiation

PP2-A1:GFP fluorescent protein observed on leaves in *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plants. Images were obtained with CLSM. GFP fluorescence in green, autofluorescence of plastids in red.

- a) Immature SE, showing a soluble PP2-A1:GFP. In this cell a number of subcellular compartments, including, organelles and nucleus are still observed.
  - b) In some cells that begins to differentiate, PP2-A1:GFP fluorescence shows aggregates around organelles of small size. In the same time, some organelles begin to disappear.
  - c) Maturing SEs progressively present a disappearance of organelles.
  - d) At a more advanced stage, the cell does no longer show any subcellular compartments, such as vacuoles or nucleus. PP2-A1:GFP is present in an aggregated form around organelles, presumably mitochondria, although still present in a soluble form in the cytosol. The SE is still closed.
  - e) In mature SEs PP2-A1:GFP is only present attached to organelles.
- Stars (\*) indicate subcellular compartments present in immature SEs as seen in (a) to (c).  
Arrows indicate dense PP2-A1 aggregates around mitochondria.  
Scale bar: 3µm

## Supporting Tables

Construct	Number of primary transformants	Destination vector
pSUC2:PP2-A1:GFP	9	pGKGWG (Zhong <i>et al.</i> 2008)
pSUC2:PP2-A1:CFP	15	pGBGWC (Zhong, <i>et al.</i> 2008)
pSUC2:GFP:PP2-A1	8	pGWB1 (Nakagawa <i>et al.</i> 2007)
pSUC2:PP2-A2:YFP	2	pGKGWY (Zhong, <i>et al.</i> 2008)
pSUC2:GFP	13	pMDC107 (Curtis and Grossniklaus 2003)
pSEOR2:PP2-A1:GFP	7	pGKGWG (Zhong, <i>et al.</i> 2008)

**Table S1: Transgenic lines expressing GFP-tagged proteins in phloem cells**

Line	Short description	Reference
p35S:PDLP1:GFP	PDLP1 plasmodesmal protein	(Thomas <i>et al.</i> 2008)
p35S:ER:YFP	Signal peptide of AtWAK2 and ER retention signal HDEL	(Nelson <i>et al.</i> 2007)
p35S:RbcS:YFP	First 79 aa of the tobacco small unit of Rubisco	(Nelson, <i>et al.</i> 2007)
p35S:GFP-MBD	microtubule binding domain	(Camilleri <i>et al.</i> 2002)
p35S:FABD2:GFP	Actin binding domain FABD2	(Voigt, <i>et al.</i> 2005)
p35S: $\gamma$ TIP:YFP	C-terminus of the tonoplast $\gamma$ TIP	(Nelson, <i>et al.</i> 2007)
p35S:H2B:RFP	Human histone H2B	(Boisnard-Lorig <i>et al.</i> 2001)
pSUC2:mcitrine:RCI2A	RCI2A full length (low-temperature-inducible protein a)	(Thompson and Wolniak 2008)
p35S:GFP:LTI6b	LTI6b protein (low temperature inducible protein b), also known as RCI2b	(Cutler, <i>et al.</i> 2000)
p35S:COX4:YFP	First 29 aa of yeast ScCOX4	(Nelson, <i>et al.</i> 2007)
pSEOR1:SEOR1:GFP	SEOR1 full length	(Anstead, <i>et al.</i> 2012)
pSEOR2:SEOR2:GFP	SEOR2 full length	(Anstead, <i>et al.</i> 2012)
pRTM1:GFP:RTM1	RTM1 full length	(Chisholm, <i>et al.</i> 2001)
pRTM2:RTM2:GFP	RTM2 full length	(Chisholm, <i>et al.</i> 2001)

**Table S2: Transgenic lines expressing fluorescent proteins used for crosses**

Primer name	sequence
AttB1	5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggct-3'
AttB2	5'-ggggaccactttgtacaagaagctgggt-3'
PP2-A1attb2	5'-aagaaagctgggtgctgtttgggacgaattgc-3'
PP2-A1Not	5'-tggcggccgcatgttagaaaccaagac-3'
PP2-A1Xba	5'- cctctagactgtttgggacgaattgc-3'
pSEOR2attb1	5'- aaaaagcaggctgctactcagccggagatcat-3'
pSUC2attb1	5'- aaaaagcaggcgatagttaattattggggg-3'
pSUC2-SalI-forward	5'-gggagctctcaatgaaatcccatagtag-3'
pSUC2-Xho-reverse	5'-gggtcgagatggcagccatccaatg-3'
pSUC2 pcr	5'-cttaactcactgtctcctc-3'
pSEOR2-forward	5' -gctactcagccggagatcatccggcaa -3'
pSEOR2-reverse	5' -gcattggcgaggtgagaaatatatg - 3'

**Table S3: Description of the primers used for cloning of promoters and coding sequenced used in the expression vectors**

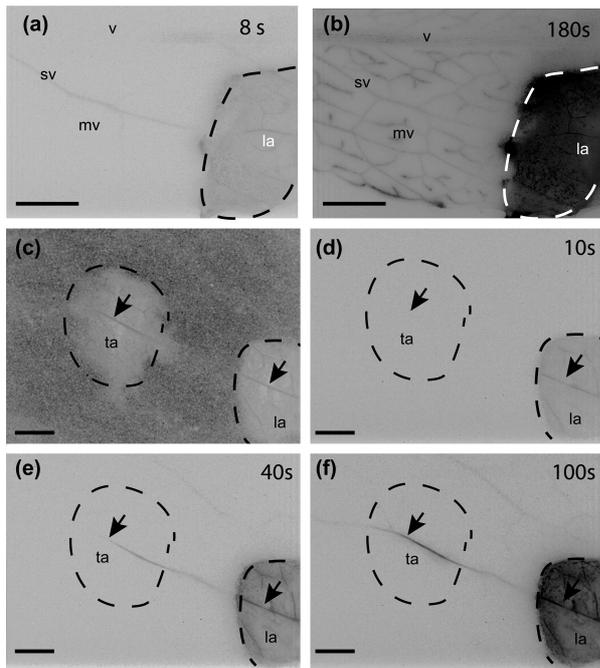
## References

- Allen, A.K.** (1979) A lectin from the exudate of the fruit of the vegetable marrow (*Cucurbita pepo*) that has a specificity for beta-1,4-linked N-acetylglucosamine oligosaccharides. *Biochemical Journal* **183**, 133-137.
- Anstead, J.A., Froelich, D.R., Knoblauch, M. and Thompson, G.A.** (2012) *Arabidopsis* P-Protein filament formation requires both AtSEOR1 and AtSEOR2. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 1033-1042.
- Baluška, F., Wojtaszek, P., Volkmann, D. and Barlow, P.** (2003) The architecture of polarized cell growth: The unique status of elongating plant cells. *BioEssays*, **25**, 569-576.
- Batailler, B., Lemaître, T., Vilaine, F., Sanchez, C., Cayla, T., Beneteau, J., Renard, D. and Dinant, S.** (2012) Soluble and filamentous proteins in *Arabidopsis* sieve elements. *Plant, Cell & Environment*, **35**, 1258-1273.
- Beneteau, J., Renard, D., Marche, L., Douville, E., Lavenant, L., Rahbe, Y., Dupont, D., Vilaine, F. and Dinant, S.** (2010) Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **153**, 1345-1361.
- Boisnard-Lorig, C., Colon-Carmona, A., Bauch, M., Hodge, S., Doerner, P., Bancharel, E., Dumas, C., Haseloff, J. and Berger, F.** (2001) Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *The Plant cell*, **13**, 495-509.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O. and Bouchez, D.** (2002) The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *The Plant Cell*, **14**, 833-845.
- Chisholm, S.T., Parra, M.A., Anderberg, R.J. and Carrington, J.C.** (2001) *Arabidopsis* RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of Tobacco Etch Virus. *Plant Physiology*, **127**, 1667-1675.
- Clough, S. and Bent, A.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **16**, 735-743.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology*, **133**, 462-469.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffitts, J.S. and Somerville, C.R.** (2000) Random GFP-cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 3718-3723.
- Dinant, S., Clark, A.M., Zhu, Y., Vilaine, F., Palauqui, J.C., Kusiak, C. and Thompson, G.A.** (2003) Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. *Plant Physiology*, **131**, 114-128.
- Dinant, S. and Lucas, W.J.** (2012) Sieve elements: puzzling activities deciphered through proteomics studies. In *Phloem Biochemistry* (Thompson, G.A. and van Bel, A. eds): Wiley-Blackwell
- Ehlers, K., Knoblauch, M. and van Bel, A.** (2000) Ultrastructural features of well-preserved and injured sieve elements: Minute clamps keep the phloem transport conduits free for mass flow. *Protoplasma*, **214**, 80-92.
- Esau, K.** (1969) The phloem. *Encyclopedia of plant anatomy*. **5**, 505.
- Evert, R.** (1990) Dicotyledons. In *Sieve elements*: Springer Verlag, pp. 103-137.
- Friml, J.** (2010) Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport. *Eur J Cell Biol*, **89**, 231-235.

- Froelich, D.R., Mullendore, D.L., Jensen, K.H., Ross-Elliott, T.J., Anstead, J.A., Thompson, G.A., Pélissier, H.C. and Knoblauch, M.** (2011) Phloem ultrastructure and pressure flow: sieve-element-occlusion-related agglomerations do not affect translocation. *The Plant Cell*, **23**, 4428-4445.
- Geigenberger, P., Langenberger, S., Wilke, I., Heineke, D., Heldt, H. and M., S.** (1993) Sucrose is metabolised by sucrose synthase and glycolysis within the phloem complex of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta*, **190**, 446-453.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.-D., Jurgens, G. and Palme, K.** (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413**, 425-428.
- Gómez, G. and Pallás, V.** (2004) A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex *in vivo* with Hop stunt viroid RNA. *Journal of Virology*, **78**, 10104-10110.
- Granger, C. and Cyr, R.** (2001) Spatiotemporal relationships between growth and microtubule orientation as revealed in living root cells of *Arabidopsis thaliana* transformed with green-fluorescent-protein gene construct GFP-MBD. *Protoplasma*, **216**, 201-214.
- Ham, B.K., Bandom, J.L., Xoconostle-Cazares, B., Ringgold, V., Lough, T.J. and Lucas, W.J.** (2009) A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *The Plant Cell*, **21**, 197-215.
- Haritatos, E., Medville, R. and Turgeon, R.** (2000) Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **211**, 105-111.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. and Mullineaux, P.M.** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*.
- Kenneke, K., Ziegler, M. and De Fekete, M.A.R.** (1971) Enzymaktivitäten im Siebröhrensaft von *Robinia pseudoacacia* L. und anderer Baumarten. *Planta*, **98**, 330-356.
- Knoblauch, M. and Peters, W.S.** (2010) Münch, morphology, microfluidics – our structural problem with the phloem. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 1439-1452.
- Knoblauch, M., Peters, W.S., Ehlers, K. and van Bel, A.J.E.** (2001) Reversible calcium-regulated stopcocks in legume sieve tubes. *The Plant Cell*, **13**, 1221-1230.
- Knoblauch, M. and van Bel, A.J.E.** (1998) Sieve tubes in action. *The Plant Cell*, **10**, 35-50.
- Koncz, C. and Schell, J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular & General Genetics*, **204**, 383-396.
- Lannoo, N., Peumans, W.J., Pamel, E.V., Alvarez, R., Xiong, T.C., Hause, G., Mazars, C. and Van Damme, E.J.** (2006) Localization and *in vitro* binding studies suggest that the cytoplasmic/nuclear tobacco lectin can interact *in situ* with high-mannose and complex N-glycans. *FEBS Letters*, **580**, 6329-6337.
- Lehmann, J.** (1973a) Studies on the phloem exudate of *Cucurbita pepo* L. I. Enzyme activities of aerobic and anaerobic glycolysis and of the citric acid cycle. *Planta*, **114**, 41-50.
- Lehmann, J.** (1973b) Studies on the phloem exudate of *Cucurbita pepo* L. II. Enzyme activities of gluconeogenesis and of the synthesis and degradation of di- and polysaccharides. *Planta*, **114**, 51-61.
- Martens, H.J., Roberts, A.G., Oparka, K.J. and Schulz, A.** (2006) Quantification of plasmodesmatal endoplasmic reticulum coupling between sieve elements and companion cells using fluorescence redistribution after photobleaching. *Plant Physiology*, **142**, 471-480.

- Mullendore, D.L., Windt, C.W., Van As, H. and Knoblauch, M.** (2010) Sieve tube geometry in relation to phloem flow. *The Plant Cell*, **22**, 579-593.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T.** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**, 34-41.
- Nelson, B.K., Cai, X. and Nebenführ, A.** (2007) A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal*, **51**, 1126-1136.
- Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O. and Hartweck, L.M.** (2010) O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1800**, 49-56.
- Oparka, K.J., Duckett, C.M., Prior, D.A.M. and Fisher, D.B.** (1994) Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **6**, 759-766.
- Paradez, A., Wright, A. and Ehrhardt, D.W.** (2006) Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 571-578.
- Read, S.M. and Northcote, D.H.** (1983) Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin). *European Journal of Biochemistry*, **134**, 561-569.
- Rüping, B., Ernst, A., Jekat, S., Nordziske, S., Reineke, A., Müller, B., Bornberg-Bauer, E., Prufer, D. and Noll, G.** (2010) Molecular and phylogenetic characterization of the sieve element occlusion gene family in Fabaceae and non-Fabaceae plants. *BMC Plant Biology*, **10**, 219.
- Sabnis, D.D. and Hart, J.W.** (1978) The isolation and some properties of a lectin (Haemagglutinin) from *Cucurbita* phloem exudate *Planta*, **142**, 97-101.
- Schoupe, D., Ghesquière, B., Menschaert, G., De Vos, W.H., Bourque, S., Trooskens, G., Proost, P., Gevaert, K. and Van Damme, E.J.M.** (2011) Interaction of the Tobacco Lectin with histone proteins. *Plant Physiology*, **155**, 1091-1102.
- Sjolund, R.D.** (1997) The Phloem Sieve Element: A River Runs through It. *Plant Cell*, **9**, 1137-1146.
- Taoka, K., Ham, B.K., Xoconostle-Cazares, B., Rojas, M.R. and Lucas, W.J.** (2007) Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *The Plant Cell*, **19**, 1866-1884.
- Thomas, C.L., Bayer, E.M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L. and Maule, A.J.** (2008) Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biology*, **6**, e7.
- Thompson, M.V. and Wolniak, S.M.** (2008) A plasma membrane-anchored fluorescent protein fusion illuminates sieve element plasma membranes in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology*.
- Truernit, E. and Sauer, N.** (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta*, **196**, 564-570.
- Van Bel, A.J.E.** (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment*, **26**, 125-149.
- van Dongen, J.T., Schurr, U., Pfister, M. and Geigenberger, P.** (2003) Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiology*, **131**, 1529-1543.

- Voigt, B., Timmers, A.C., Samaj, J., Muller, J., Baluska, F. and Menzel, D.** (2005) GFP-FABD2 fusion construct allows *in vivo* visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *Eur J Cell Biol*, **84**, 595-608.
- Walz, C., Juenger, M., Schad, M. and Kehr, J.** (2002) Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *Plant Journal*, **31**, 189-197.
- Zhong, S., Lin, Z., Fray, R. and Grierson, D.** (2008) Improved plant transformation vectors for fluorescent protein tagging. *Transgenic Research*, **17**, 985-989.



**Figure 1**  
**Loading and long distance transport of 5,6 CFDA in the vascular tissues cells of *Arabidopsis* leaf**

Leaves observed on a binocular microscope and shown in false colors. Fluorescence appears in black, on a light grey background (a,b) Observation of the delivery of fluorescence after application of 5,6 CFDA from a peeled area on the leaf. (a) After 8 s, the fluorescent already labels the veins in the loading area. (b) After 180 s, the labelling extends to the main vein, secondary vein and minor veins around the loading area.

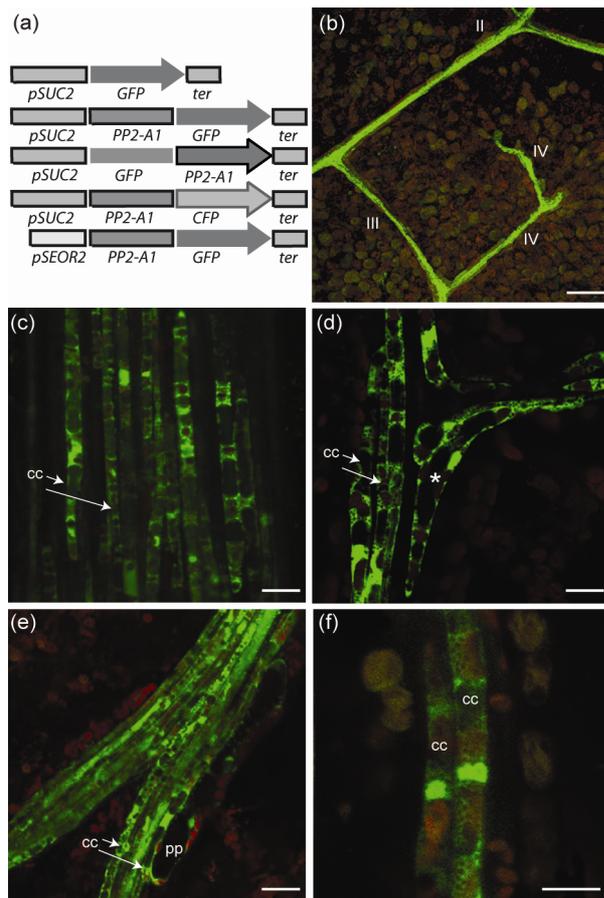
(c-f) Observation of the transport of fluorescence after application of 5,6 CFDA in the peeled area. (c) Observation of the leaf by autofluorescence immediately after application of the tracer. Peeled areas are less fluorescent, which improve the observation of the vascular network (black arrows). For this experiment, a single vein has been peeled in two different locations, one loading area (la) and the transport area (ta). The 5-6 CFDA symplasmic tracer is loaded in the loading area.

(d) 10 seconds after application of 5,6 CFDA, the fluorescence concentrates in the vascular tissues, indicating loading.

(e) 40 seconds after application of 5,6 CFDA, the fluorescence is transported, and begin to be visible in the transport area.

(f) 100 seconds after application of 5,6 CFDA, the fluorescence moves below the transport area.

La: loading area; ta: transport area; mv: minor vein, sv: secondary vein; v: main vein. Scale bar: 500 mm.



**Figure 2**  
**Live imaging of PP2-A1:GFP, PP2-A2:GFP and GFP in phloem cells in a 4-week old leaf**

Fluorescent GFP-tagged proteins observed on leaves from *pSUC2:PP2-A1:GFP*, *pSUC2:PP2-A2:GFP* and *pSUC2:GFP* plants. Images were obtained with CLSM. GFP signal in green, and chlorophyll autofluorescence in red.

(a) Constructs realized for the observation of GFP, PP2-A1 and PP2-A2 in the phloem.

(b) Observation in a peeled leaf of a soluble GFP expressed under the control of the SUC2 promoter in a *pSUC2:GFP* plant. The GFP fluorescence is observed in the veins of order II, III and IV.

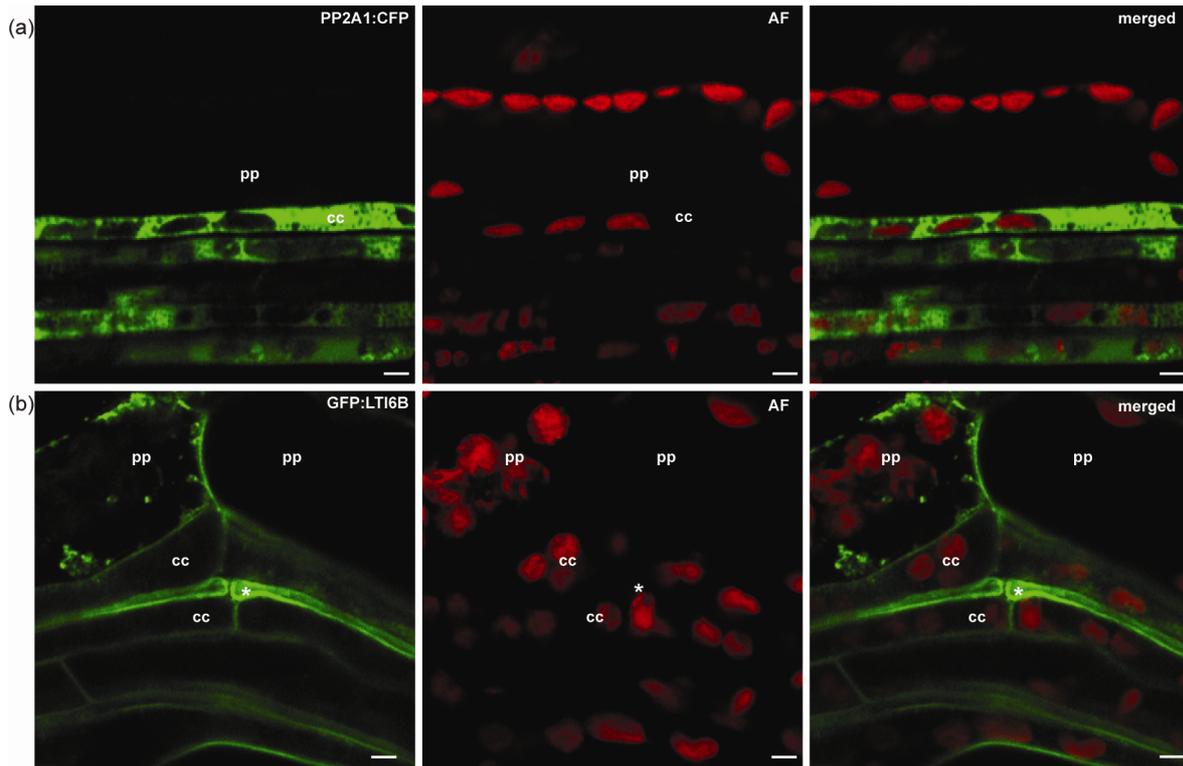
(c) Localization of PP2-A1:GFP fluorescence in a main vein from *pSUC2:PP2-A1:GFP* plant. GFP is localized only in the CC.

(d) Details of the localization of PP2-A1:GFP fluorescence in a main vein from *pSUC2:PP2-A1:GFP* plant. It shows the organization of CC at a vein junction. Bent CCs (indicated by \*) are typically found at crossings.

(e) Details of the localization of GFP fluorescence in a main vein from *pSUC2:GFP* plant. The soluble GFP is found in CCs and PPCs.

(f) Localization of the PP2-A2:GFP fluorescence in a minor vein from *pSUC2:PP2-A2:GFP* plant. PP2-A2 is found in the cytosol and in the nucleus of the CC.

Cc = companion cell; pp = phloem parenchyma cell. Scale bar: b): 50 $\mu$ m; (c) – (f): 10 $\mu$ m

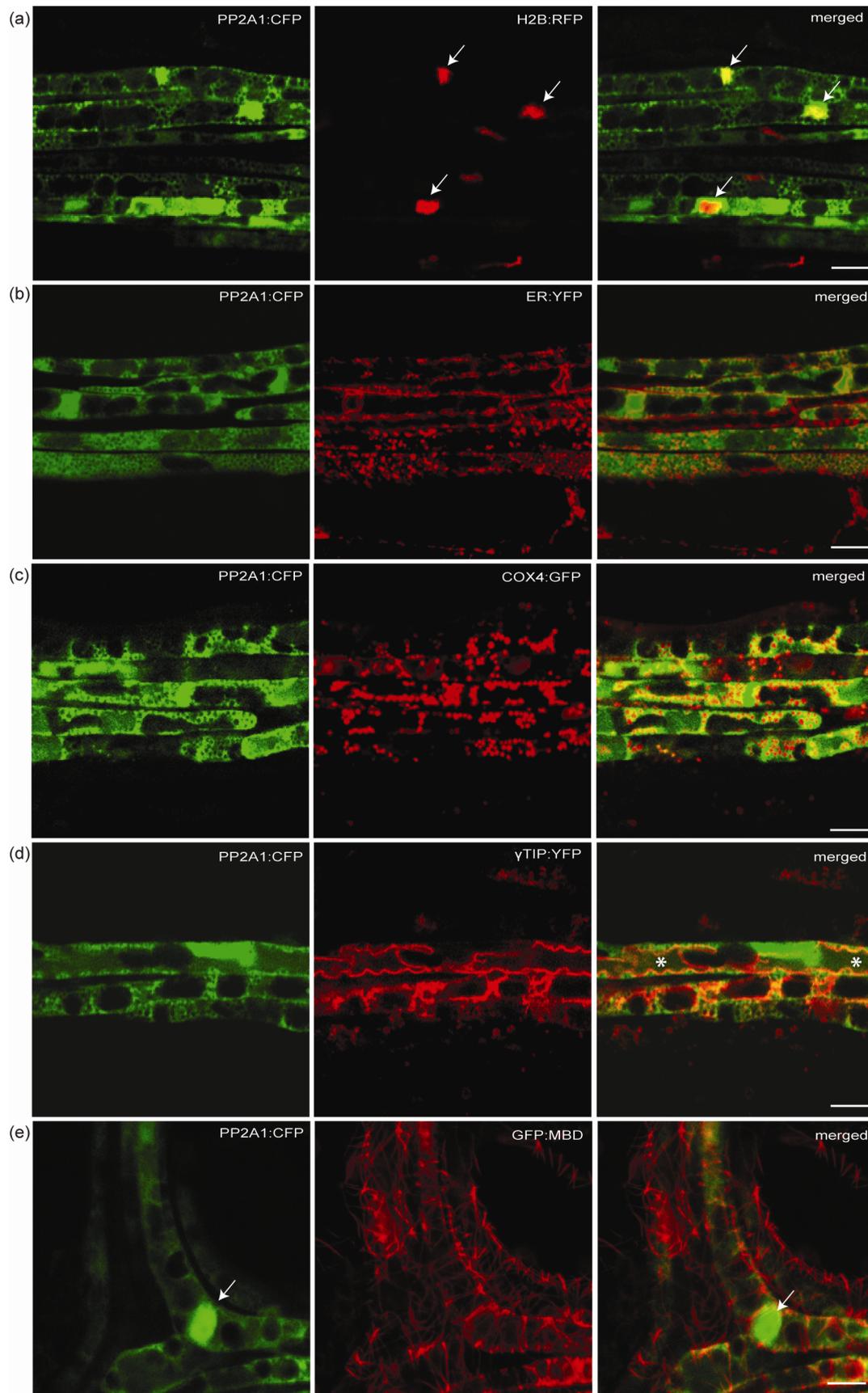


**Figure 3 Live imaging of SE, CC and PP**

Fluorescent proteins observed on leaves from *pSUC2:PP2-A1:CFP* and *p35S:GFP:Lti6B* plants. Images were obtained with CLSM. GFP and CFP fluorescence in green, and chlorophyll autofluorescence in red (False colors).

(a) Typical distribution of plastids in the CCs. The CCs were identified based on the CFP fluorescence in a *pSUC2:PP2-A1:CFP* plant. In the CCs the chloroplasts observed by their the autofluorescence showed alignments on a single file whereas in PPs, chloroplasts showed a distribution at the cell periphery.

(b) Typical morphology of phloem cells. The distribution of plastids was used to identify two of phloem cell types, CCs and PPCs. In *p35S:LTi6B:GFP* plant, the LTi6B:GFP fluorescence also allows to identify the SEs. PPs are the largest cells and are located on the borders of the vasculature. SEs are the smallest one and are easily recognizable by the absence of chloroplasts. CCs show typical alignments of chloroplasts. pp: phloem parenchyma, cc: companion cell, \*: sieve element. Scale bar: 5 $\mu$ m

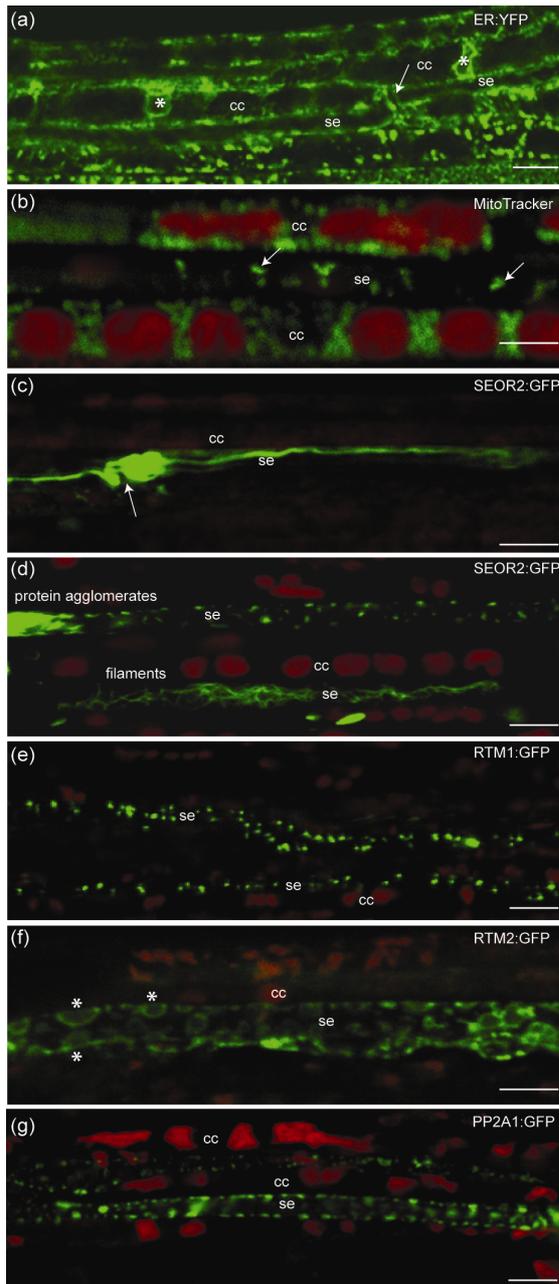


## Figure 4

### Live imaging of subcellular compartments in CCs and PPCs

Fluorescent proteins observed on leaves from plants resulting from crosses between *pSUC2:PP2-A1:CFP* and lines carrying GFP addressed to different subcellular compartments. Images were obtained with CLSM. GFP and CFP fluorescence are presented in false colors, with CFP in green (left panel) and GFP, YFP or RFP in red (center panel). Right panels represent overlays.

- (a) Observation of nuclei in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:H2B:RFP* plant. CC possesses square-like nuclei.
  - (b) Observation of endoplasmic reticulum in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:ER:YFP* plant. In CCs, ER is mainly found next to the plasma membrane of cc, and around the nucleus. On this image, the ER was also observed in a SE, aligned between two arrays of CCs.
  - (c) Observation of mitochondria in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:COX4:GFP* plant. On this image a large numbers of mitochondria is observed in CCs.
  - (d) Observation of vacuoles in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:yTIP:YFP* plant. The image shows several vacuoles per CC.
  - (e) Observation of cortical microtubules in the CCs of a *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:GFP:MDB* plant.
- cc: companion cell. Arrow: nucleus. Stars indicate the vacuoles. scale bar =:5µm



**Figure 5**

**Live imaging of subcellular compartments and protein bodies in SEs**

Fluorescent proteins observed on leaves from plants of lines carrying GFP addressed to different subcellular compartments. Images were obtained with CLSM. GFP fluorescence in green, autofluorescence of plastids in red. The fluorescence of the MitoTracker Red in in green (false colors).

(a) Observation of the endoplasmic reticulum in the CCs and the SEs of a *p35S:ER:YFP* plant. \* indicates the nucleus of CCs. Arrows indicate sieve plates inside the SE.

(b) Observation of mitochondria using the MitoTracker red fluorescent dye. Mitochondria are found both in the CCs and in the SEs.

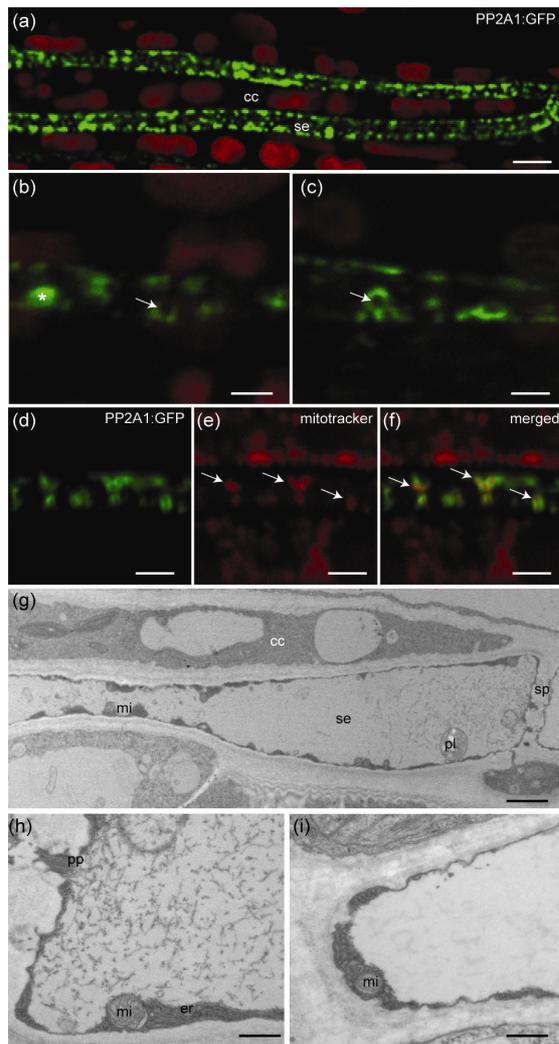
(c) and (d) Observation of the P-proteins in the SEs of a *pSEOR2:SEOR2:GFP* plant. On these image, the P-proteins show a typical plug (arrow) next to the sieve plate (in (c)), as well as discrete filaments in the lumen of the SE and protein agglomerates (in (d)).

(e) Observation of discrete bodies in *p35S:RTM1:GFP* plant. The size of the bodies in the SEs reaches 1  $\mu\text{m}$ .

(f) Observation of fluorescence in *p35S:GFP:RTM2* plant. The signal is mostly localized at the vicinity of the plasma membrane inside the SE. It is also observed around spherical vesicles (\*) located next to the plasma membrane.

(g) Observation of PP2-A1:GFP in a *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plant. PP2-A1 fluorescence forms in the SEs discrete spots localized on the borders of the cell and present at the vicinity of the sieve plate.

Scale bar: a), (c) – (e), (g): 5 $\mu\text{m}$ . (b) and (f): 3 $\mu\text{m}$



**Figure 6**

### Subcellular location of PP2-A1 in the SE

PP2-A1:GFP fluorescent protein observed on leaves of *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plants. Images were obtained with CLSM. GFP fluorescence in green, autofluorescence of plastids in red. For comparison, TEM

images showing details of mitochondria in the SEs.

(a) to (d) Observation of PP2-A1:GFP in a *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plant. The fluorescence of PP2-A1:GFP encircled small organelles, most of them being labelled with the MitoTracker Red mitochondria dye.

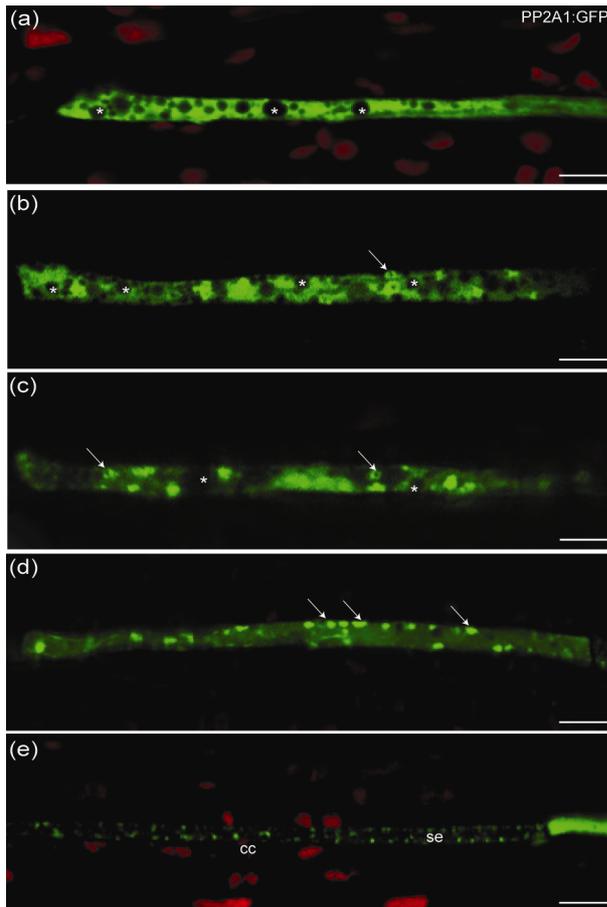
(a): localization of PP2-A1 in a mature SE. PP2-A1 is located close to the membrane, probably in the SER. Chloroplasts present in the CCs are in red (b) and (c) Details of the localization of PP2-A1:GFP around organelles present in the SEs. Arrows indicate round shape structure surrounded by PP2-A1, and stars (\*) indicate PP2-A1 aggregates.

(d), (e), (f) Colocalization of PP2-A1:GFP with MitoTracker Red. GFP is observed in green and MitoTracker is observed in Red. Arrows indicate mitochondria surrounded by PP2-A1:GFP.

(g) Longitudinal section of a SE observed with TEM. Sieve plate is visible on the right side of the cell. Filaments of P-Proteins are present in the cell lumen and mitochondria are stuck in the SER.

(h) and (i) Details of mitochondria and SER observed in a longitudinal and atransversal section, respectively in (h) and (i).

er: endoplasmic reticulum; mi: mitochondria; pl: plastid; pp: P-proteins; CC: companion cell; se: sieve element. scale bar: (a): 5µm; (b),(c): 2µm; (d) – (f): 3 µm, (g): 2µm (h) and (i): 1µm



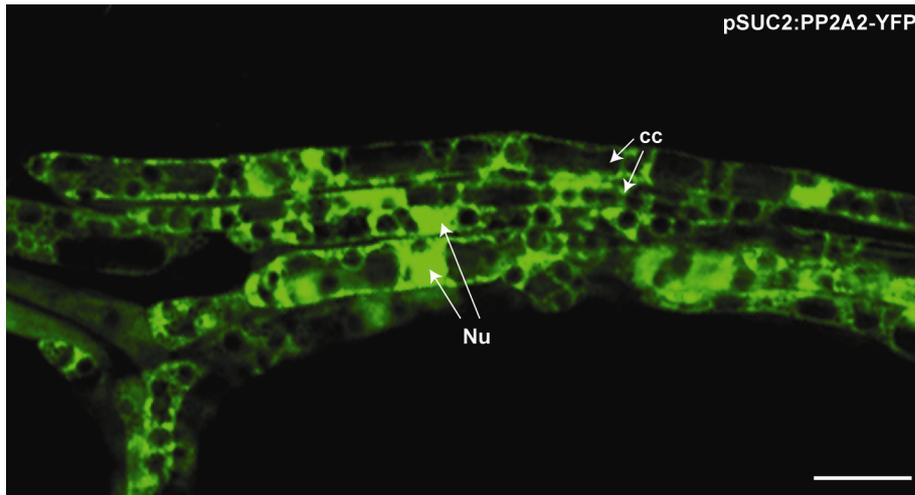
**Figure 7**

**Live imaging of PP2-A1:GFP in SEs  
ongoing differentiation**

PP2-A1:GFP fluorescent protein observed on leaves in *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plants. Images were obtained with CLSM. GFP fluorescence in green, autofluorescence of plastids in red.

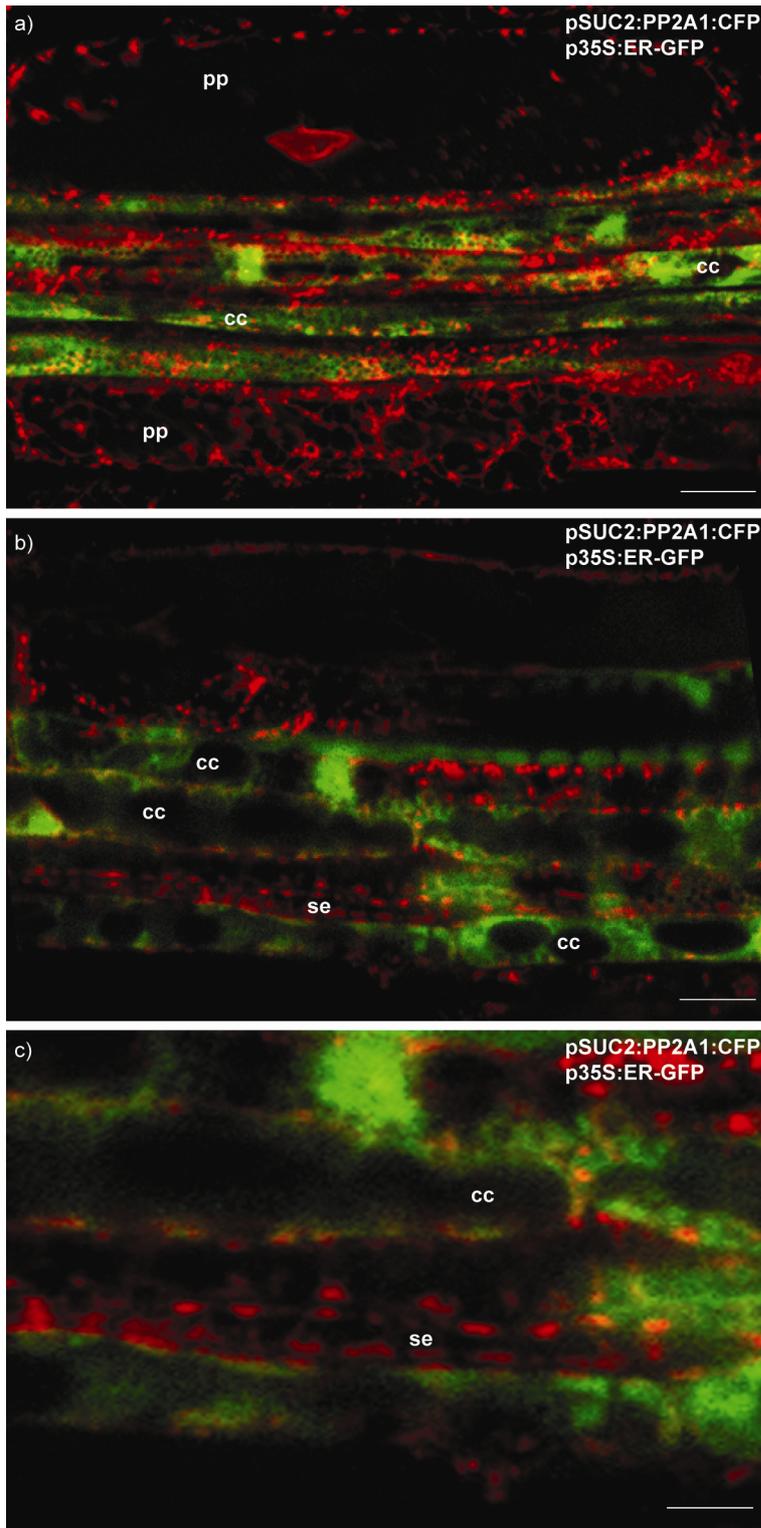
- a) Immature SE, showing a soluble PP2-A1:GFP. In this cell a number of subcellular compartments, including, organelles and nucleus are still observed.
- b) In some cells that begins to differentiate, PP2-A1:GFP fluorescence shows aggregates around organelles of small size. In the same time, some organelles begin to disappear.

- c) Maturing SEs progressively presents a disappearance of organelles.
  - d) At a more advanced stage, the cell does no longer show any subcellular compartments, such as vacuoles or nucleus. PP2-A1:GFP is present in an aggregated form around organelles, presumably mitochondria, although still present in a soluble form in the cytosol. The SE is still closed.
  - e) In mature SEs PP2-A1:GFP is only present attached to organelles.
- Stars (\*) indicate subcellular compartments present in immature SEs as seen in (a) to (c). Arrows indicate dense PP2-A1 aggregates around mitochondria.  
Scale bar: 3μm



**Supplementary Figure S1**  
**Live imaging of PP2-A2:YFP in the companion cells**

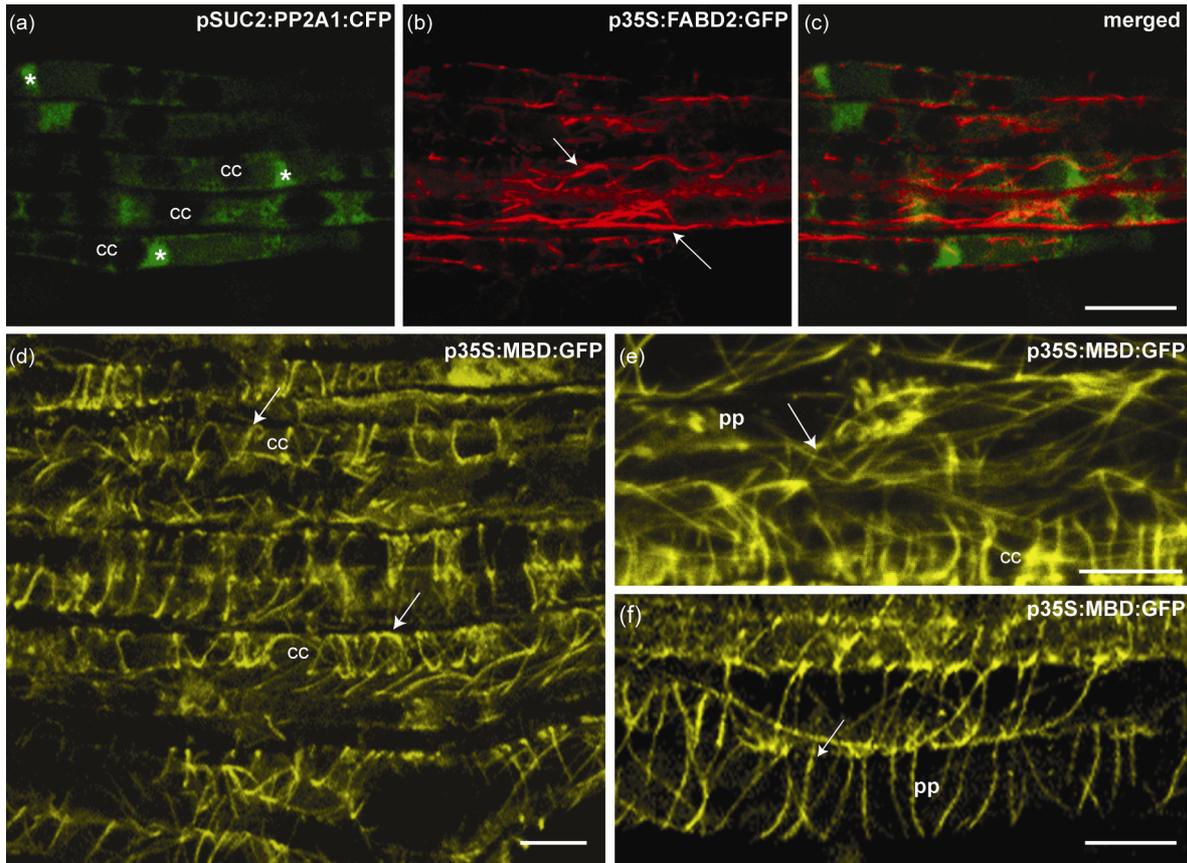
Fluorescent proteins observed on peeled leaves from *pSUC2:PP2-A2:GFP*. Images were obtained with CLSM, with GFP fluorescence in green. PP2-A2:GFP is located in the cytoplasm and the nucleus of CC. No fluorescence was observed in the SE. cc: companion cell. Nu: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m.



### Supplementary Figure S2

#### Organization of the sieve element reticulum in the CCs and in the SEs

Fluorescent proteins observed on leaves from *pSUC2:PP2A1:CFP* x *p35S:ER:GFP* plants. Images were obtained with CLSM, with GFP fluorescence in red and CFP fluorescence in green (false colors). (a) Overview of phloem cells, showing the distribution of the ER in the phloem parenchyma, as a mesh network, and in the companion cells and sieve elements; (b) Details on the ER in CCs, showing the punctate organization of the ER; (c) Details showing the organization of SER in the sieve elements. Cc: companion cell. Se: sieve element. Pp: phloem parenchyma. Scale bar is 10 $\mu$ m in (b), 5 $\mu$ m in (c)

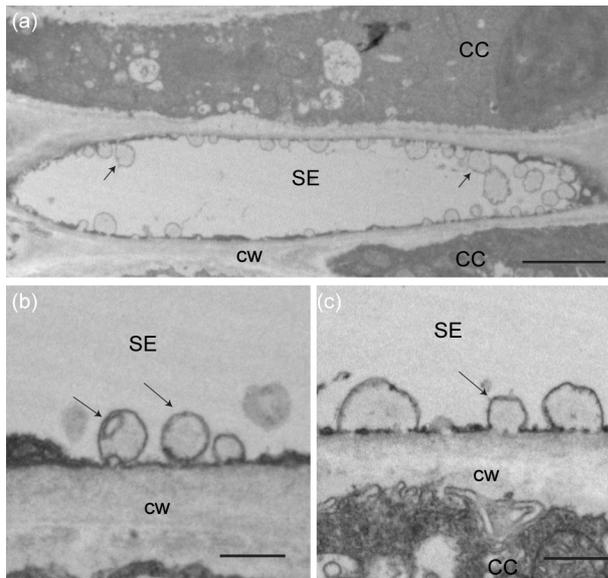


### Supplementary Figure S3

#### Organization of the cytoskeleton in CCs and PPCs

Fluorescent proteins observed on leaves from *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:FABD2:GFP* and *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:GFP: MBD* plants. Images were obtained with CLSM, with GFP fluorescence in red and yellow and CFP fluorescence in green (false colors).

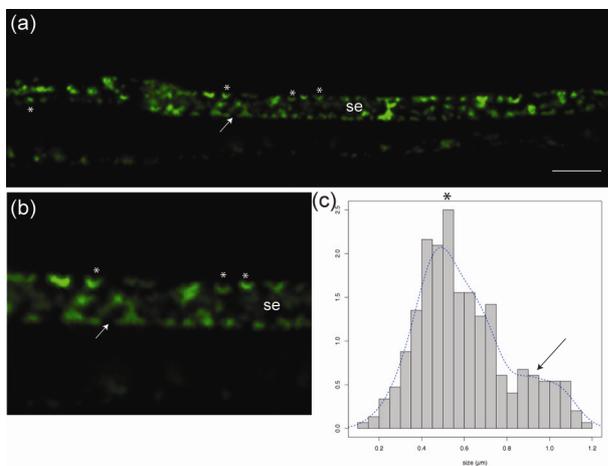
(a)–(c) Live imaging in false colors of a colocalisation of the actin network (in red) and *PP2-A1:CFP* (green) observed in *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *p35S:FABD2:GFP* plants. The organization of the actin network in the CC shows thick actin bundles and thin actin filaments. (d) Overview of the microtubules network in a order II vein. Arrow show different orientation of the cortical microtubules. (e) and (f) Details of the microtubules in CCs and PPCs. cc: companion cell. pp: phloem parenchyma. Stars represent nuclei. Scale bar is 10 µm in (c) and (d), and 5µM in (e) and (f).



### Supplementary Figure S4

#### Vesicles observed by TEM in the SEs

Vesicles observed in the SEs at the periphery of the cell, frequently in close contact with the plasma membrane. (a): overview of a sieve element in TEM. (b) and (c) are details of these vesicles. CC: companion cell. SE: sieve element. CW: cell wall. Scale bar is 2  $\mu\text{m}$  in (a) and 500nm in (b) and (c).



### Supplementary Figure S5

#### Distribution of the PP2-A1:GFP bodies in the SEs

Fluorescent proteins observed on leaves from *pSEOR2:PP2-A1:GFP* plant. Images were obtained with CLSM, with GFP fluorescence in green (false colors).

(a) and (b) Localisation of PP2-A1 around mitochondria in the SE (represented by stars) but also close to organites with the size of plastids (represented with an arrow)

(c) is a density histogram of the size of PP2-A1:GFP bodies in the sieve elements. The distribution is bimodal, with two peaks, one around 500nm, and another around 1 $\mu\text{m}$ .

se: sieve element. Scale bar: 5 $\mu\text{m}$



## ***VI. Conclusions et discussion***

Cette étude du phloème réalisée à l'aide de la microscopie confocale nous a permis de mettre en avant des caractéristiques particulières du phloème chez *Arabidopsis thaliana*. C'est un tissu profond mais néanmoins observable avec un protocole de préparation adapté. Quelques études ont déjà été réalisées chez d'autres espèces, afin de décrire avec précision l'anatomie des tubes criblés, ou des protéines P, les protéines caractéristiques du phloème (Knoblauch *et al.*, 2001 ; Froelich *et al.*, 2011); mais paradoxalement assez peu d'études ont porté sur la description anatomique des cellules compagnes et du parenchyme phloémien *in vivo*. Ici notre étude a porté sur les trois principaux types cellulaires présents dans le phloème et nous a permis d'identifier des critères cytologiques suffisants pour les identifier simplement.

Ce travail nous a aussi permis de préciser la localisation dans le phloème de deux protéines de la famille des PP2: PP2-A1 et PP2-A2. Nous nous sommes focalisés sur PP2-A1, étant donné que c'est la PP2 présente de façon très largement majoritaire dans le phloème (Beneteau, 2008). PP2-A1 est présente sous forme nucléocytoplasmique dans les cellules compagnes, elle semble soluble, mais des analyses plus poussées (BiFC, anisotropie de fluorescence) seraient nécessaires pour déterminer si elle ne forme pas des dimères ou des oligomères dans les cellules compagnes et dans les tubes criblés. Nous avons également observé que dans les lignées exprimant PP2-A1:GFP ou PP2-A2:YFP dans les cellules compagnes que les protéines de fusion n'étaient pas retrouvées dans les tubes criblés, indiquant que les protéines de fusion ne sont pas transportées de cellule à cellule. Or des expériences d'immunolocalisations réalisées précédemment ont montré que PP2-A1 était présente dans les tubes criblés. En revanche dans les lignées exprimant PP2-A1:GFP dans les tubes criblés, on voit cette fois que la protéine est présente sous forme d'amas ancrés à la membrane dans les tubes criblés matures, alors qu'elle est soluble dans un élément criblé en cours de différenciation.

Plusieurs conclusions découlent de ce travail

- la localisation de PP2-A1 varierait selon le type cellulaire
- PP2-A1 peut constituer un marqueur de la maturation des tubes criblés
- On peut visualiser des tubes criblés à différentes étapes de différenciation dans des feuilles matures.

Ces observations dans les plantes dans lesquelles PP2-A1:GFP est produite dans les CC montrent que la protéine est présente dans le noyau et le cytoplasme. Cette observation est

compatible avec un rôle de PP2-A1 dans le transport de molécules du cytosol vers le noyau et réciproquement, dans les cellules compagnes. Un tel transport a déjà été montré pour une autre lectine, la lectine Nictaba chez *Nicotiana tabacum* (Lannoo *et al.*, 2006).

Nous avons mis en évidence plusieurs éléments permettant de reconnaître les cellules du phloème en microscopie confocale. Les cellules compagnes sont des cellules allongées et alignées (figure 44). C'est important car si l'on regarde la répartition des plastes dans les cellules du mésophylle, ceux-ci semblent disposés de façon aléatoire. Cet élément simple, permet de repérer très facilement le phloème dans une feuille et de reconnaître les cellules compagnes. Par ailleurs, l'observation de la présence dans les cellules compagnes de nombreux chloroplastes et de nombreuses mitochondries, alors que c'est un tissu très profond présent dans la plante, indique une capacité photosynthétique et énergétique importante dans ces cellules. Il serait particulièrement intéressant d'étudier plus finement le métabolisme particulier des chloroplastes et des mitochondries dans les CC, de savoir si ceux-ci sont nécessaires au bon fonctionnement de la cellule, et dans quelle mesure la présence de ces organites dans les CC intervient dans le chargement du phloème.

Les mitochondries sont très nombreuses dans les cellules compagnes, c'est aussi une grande différence entre une CC et une cellule du PP. Les mitochondries apparaissent vraiment concentrées dans la cellule, à tel point que très peu de mouvement à l'intérieur de la cellule a été observé. Il serait d'ailleurs intéressant d'évaluer la production de ROS dans les cellules compagnes. Il est possible que la présence de nombreuses mitochondries et la très forte activité métabolique décrite dans les CC engendre un stress oxydatif important.

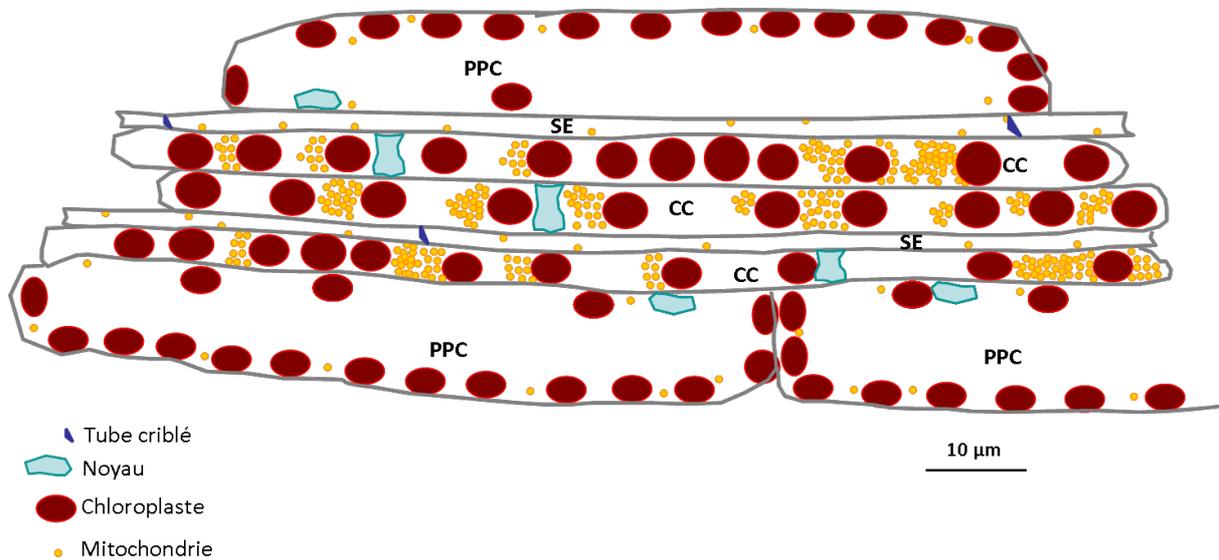
Au niveau du contenu en organites, on constate des différences importantes entre les 3 types cellulaires du phloème chez *Arabidopsis*. L'organisation subcellulaire des cellules de parenchyme phloémien est très proche de celle des cellules de mésophylle. On peut toutefois les distinguer par le fait que les cellules de parenchyme phloémien sont allongées, et que leurs plastes sont de plus petite taille. Elles sont également beaucoup plus petites que les cellules du parenchyme cortical.

Le couple cellule compagne – tube criblé présente de réelles spécificités: le réticulum est présent uniquement collé à la membrane dans les TC (le cas du SER, déjà décrit dans de nombreuses publications (Sjölund, 1997) mais il l'est également dans les cellules compagnes.

Avec la résolution limite possible en CLSM, nous n'avons pas vu de réseau organisé, à la différence de ce que l'on peut observer dans une cellule de PP, par exemple.

Les CC, ainsi que les cellules du PP présentent aussi un cytosquelette bien organisé, nous avons pu voir des filaments d'actine et de tubuline. Dans les CC, les microtubules semblent former des anneaux, ce qui est caractéristique de cellules en cours d'élongation (Cyr., 1994). Dans la littérature, il est généralement admis que les tubes criblés matures ne présentent pas de cytosquelette organisé, et en effet, avec nos marqueurs fluorescents, nous n'avons rien pu observer. Toutefois, nous avons observé à plusieurs reprises que des protéines SEO pouvaient se déplacer dans les tubes criblés, et ce déplacement pouvait avoir lieu aussi bien dans le sens du flux que contre le sens du flux. Leur mouvement était bien plus lent que le flux de masse phloémien. Ceci suggère qu'il existe un mécanisme permettant l'ancrage et/ou le déplacement de macromolécules au sein des tubes criblés. Ceci est d'une réelle importance, car de très nombreux mécanismes de signalisation et de régulation impliquent des molécules circulant dans les tubes criblés. Il pourrait donc y avoir une régulation très fine de ces déplacements de macromolécules, par un système de transport restant encore à mieux caractériser. Quelques pistes existent déjà concernant un tel système de transport de macromolécules:

Par exemple, l'équipe d'Oparka a montré que la protéine de mouvement du CMV pouvait se déplacer dans les tubes criblés sur le SER (Blackman *et al.*, 1999 ; Fitzgibbon *et al.*, 2010). Les images de 3D-SIM montrent très bien le réseau formé par le SER. L'équipe de Knoblauch a également mis en évidence que les protéines SEOR pouvaient former un réseau organisé dans les tubes criblés (Anstead *et al.*, 2012). Nous avons, quant à nous, mis en évidence que PP2-A1 était clairement présente de façon majoritaire collée aux mitochondries, mais aussi en périphérie des tubes criblés et peut être autour des amyloplast. Oparka a déjà émis l'hypothèse que les PP2 pouvaient avoir un rôle d'ancrage dans les tubes criblés (Oparka & Turgeon., 1999; Smith *et al.*, 1987). Il est possible que, lors de la maturation des tubes criblés, comme le réticulum se réorganise (Evert, 1990) PP2-A1 s'associe au réticulum, permettant ainsi soit l'ancrage de celui-ci aux membranes soit la fixation de différents organites (comme les mitochondries) ou des macromolécules (protéines glycosylées, ARN...) participant ainsi au rôle du phloème dans la signalisation. Bien sûr, tout ceci est très spéculatif et nécessiterait des observations supplémentaires de différentes protéines dans les tubes criblés, et si possible des études de colocalisation avec PP2-A1.



**Figure 44: Schéma récapitulatif de l'organisation des 3 types cellulaires du phloème chez *Arabidopsis*.**

Sur ce schéma sont représentés les 3 types cellulaires du phloème d'*Arabidopsis thaliana*, les tubes criblés (SE), les cellules compagnes (CC) et les cellules du parenchyme phloémien. Les principaux organites sont représentés, à savoir les noyaux (carré bleus), les chloroplastes (ronds rouges) et les mitochondries (rond jaunes). Les plages de cribles sont marquées par des triangles bleu foncé. Nous voyons que les chloroplastes sont localisés à la périphérie de la membrane plasmique dans les cellules du parenchyme phloémien, et qu'ils sont alignés dans les cellules compagnes. Cet alignement est dû au fait de leur taille, le diamètre d'un chloroplaste étant proche de celui d'un tube criblé. Un élément caractéristique des tubes criblés est l'absence de chloroplastes, ainsi que la présence de très peu de mitochondries.

En effet, nous avons rencontré de nombreuses contraintes techniques lors de l'observation du phloème. Tout d'abord, nous sommes obligés de réaliser un traitement des échantillons par peeling. Nous avons montré que ce traitement permettait toujours au phloème d'être fonctionnel pour le transport et le chargement de solutés mais il introduit toutefois un biais, le stress provoqué par cette blessure étant difficilement mesurable. De plus, les cellules que nous observons sont petites. Les CC mesurent quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre et demeurent observables, alors que les tubes criblés sont beaucoup plus petits (2-3  $\mu\text{m}$  de diamètre), et souvent se situent dans différents plans focaux. C'est pourquoi il est très difficile de repérer des structures précises dans les tubes criblés, notamment lors de l'utilisation de marqueurs exprimés sous le contrôle d'un promoteur constitutif (*35S*). La fluorescence des cellules alentours (PP et CC) empêche en effet assez souvent de voir précisément la fluorescence émise dans les TC. D'autre part, les structures étant modifiées dans les tubes criblés (amyloplastes, mitochondries modifiées, réticulum endoplasmique des tubes criblés) certains des marqueurs fluorescents usuels ne fonctionnent pas, ou sont difficilement reconnaissables tels que le marqueur de chloroplaste basé sur la localisation de la petite sous unité de la Rubisco, par exemple. C'est pourquoi nous avons été obligés d'avoir recours à d'autres techniques, comme l'utilisation de fluorochromes, ou de constructions basées sur des promoteurs très spécifiques. Pour les colorants, nous avons pu constater que le MitoTracker Red et le DiOC<sub>6</sub> sont efficaces pour observer les cellules du tube criblé. Il serait intéressant d'utiliser d'autres colorants pour étudier les cellules compagnes et les tubes criblés et notamment la différenciation des tubes criblés. Par exemple, on pourrait envisager d'utiliser des sondes marquant les plastides, les vacuoles, le golgi, les peroxisomes, les autophagosomes, ou bien indiquant le pH ou les conditions redox, voir le potentiel de membrane. Le pHrodo<sup>TM</sup> (Molecular Probes) permet d'observer les phagosomes, le CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) permet de visualiser le potentiel redox, le H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) permet de visualiser les formes réactives de l'oxygène.

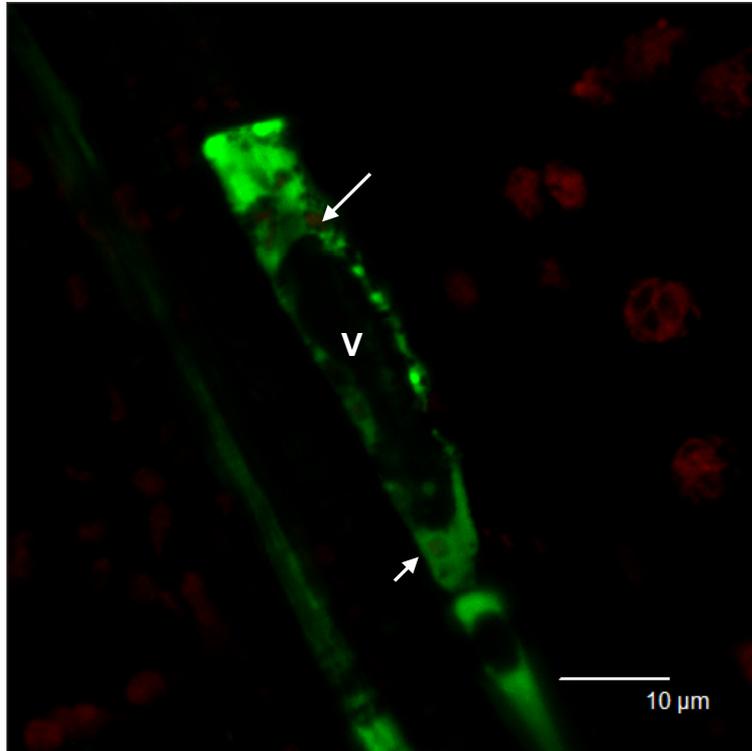
Le choix des promoteurs s'est également révélé un critère important pour réaliser des observations fines, soit des cellules compagnes, soit des tubes criblés. Notamment, le promoteur du gène *SUC2* est un excellent outil pour étudier les cellules compagnes. Il confère aux gènes placés sous son contrôle une expression spécifique, forte et stable. Il est par contre peu exprimé lors des premiers jours de vie de la plante, nos observations montrent qu'il ne s'exprime qu'à partir du 4ème jour dans la racine et dans les cotylédons. Pour étudier les tubes criblés, le promoteur du gène *SEOR2* (*AT3G01670*) nous a été utile, car il s'exprime de

façon très spécifique et précoce dans ces cellules. L'expression précoce de ce promoteur nous a également permis de suivre la maturation des tubes criblés. L'équipe de Knoblauch a étudié le promoteur du gène *SEOR1 (AT3G01680)* (Froelich *et al.*, 2011). Il confère une expression assez précoce dans les tubes criblés, pour suivre ces étapes de maturation.

Nous avons obtenu des observations dans les feuilles des plantes pSEOR2:PP2-A1:GFP, révélant différents stades de différenciation (Figure 45). En revanche, nous n'avons pas réussi à suivre *in vivo* une cellule en cours de différenciation, ce qui serait intéressant pour observer les différents organites des tubes criblés, et leur modification ou ancrage lors de la maturation des TC.

Puisqu'il est possible d'observer des TC en cours de différenciation, il est donc possible en théorie de réaliser de telles observations *in vivo* en réalisant des cinétiques d'acquisition. Il est possible d'utiliser des systèmes de culture particuliers, les micro-ROCs (Microscopy Rhizosphere Chambers, Advanced Science Tools), qui permettent de regarder les racines sans altérer les plantes. (Froelich *et al.*, 2011). On pourrait donc suivre le développement et la différenciation du métaphloème tout au long de la croissance de la racine, ce qui permettrait de suivre en détails la différenciation des tubes criblés.

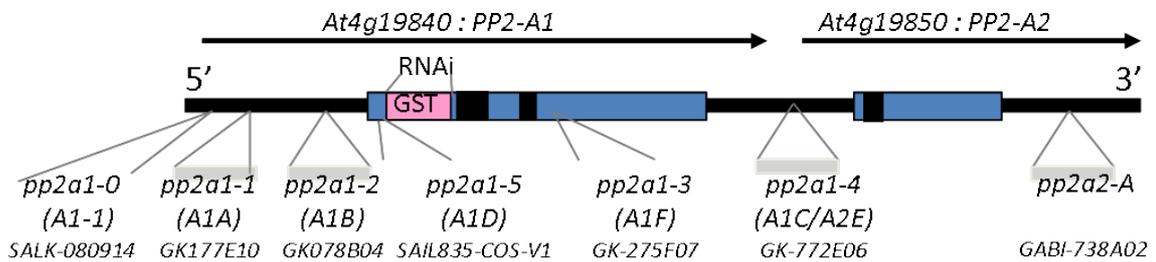
Couplée à des protéines fluorescentes mieux résistantes au photoblanchiment, l'observation de plantes poussant en micro-ROC pourrait permettre de réaliser de tels suivis dans la racine. En ce qui concerne les feuilles, c'est plus compliqué puisque que nous sommes obligé de réaliser un prélèvement pour l'observation. En réalisant suffisamment d'observations il serait aussi envisageable de modéliser l'enchaînement des événements de différenciation et de pouvoir ainsi mieux comprendre comment se mettent en place les tubes criblés à l'échelle de la feuille entière.



**Figure 45: Observation d'un élément criblé en cours de différenciation**

*On peut voir qu'il possède encore des chloroplastes, et une très grosse vacuole. Preuve que la différenciation vient à peine de commencer V: vacuole. Les flèches indiquent la localisation des chloroplastes. En vert: pSEOR2:PP2-A1:GFP. En rouge: autofluorescence des chloroplastes.*

# Chapitre 2



**Figure 46: Représentation schématique des sites d'insertion des mutants disponibles pour PP2-A1 et PP2-A2**

Dans ces mutants les sites d'insertions des T-DNA sont dans le 5'UTR pour *pp2-a1-0*, *pp2-a1-1* et *pp2-a1-2* dans la séquence codante de PP2-A1, pour *pp2-a1-3* et *pp2-a1-5* et dans le 3'UTR pour *pp2-a1-4*.

**Tableau 7: Récapitulatif des lignées d'Arabidopsis existantes, dérégulées pour PP2-A1 ou PP2-A2**

Nom de la lignée	Référence	Description	Phénotype
RNAi7 et RNAi37	Hilson <i>et al.</i> , 1984, Beneteau 2008	RNAi contre PP2-A1	altéré
<i>pp2-a1-0</i>	Salk_080914.54.75 Divol <i>et al.</i> , 2007	Mutant T-DNA	aucun
<i>pp2-a1-1</i>	GK177-E10	Mutant T-DNA	aucun
<i>pp2-a1-2</i>	GK078-B04	Mutant T-DNA	aucun
<i>pp2-a1-3</i>	GK-275-F07	Mutant T-DNA	aucun
<i>pp2-a1-4</i>	GK-772-E06	Mutant T-DNA	aucun
<i>pp2-a1-5</i>	SAIL835-COS-V1 Zhang <i>et al.</i> , 2011-	Mutant T-DNA	Non décrit
<i>p35S:PP2-A2</i>	Delzangles, 2010	Surexprimeur PP2-A2	aucun
<i>p35S:PP2-A1</i>	Delzangles, 2010	Surexprimeur PP2-A1	aucun
<i>PP2-A1OEX</i> ( <i>p35S:PP2-A1</i> )	Zhang <i>et al.</i> 2011	Surexprimeur PP2-A1	Effet sur pucerons
<i>pPP2-A1:PP2-A2</i>	Delzangles, 2010	Surexprimeur PP2-A2	Défaut de phénotype dans une lignée, similaire à celui des RNAi,

# Analyse de mutants dérégulés pour PP2-A1

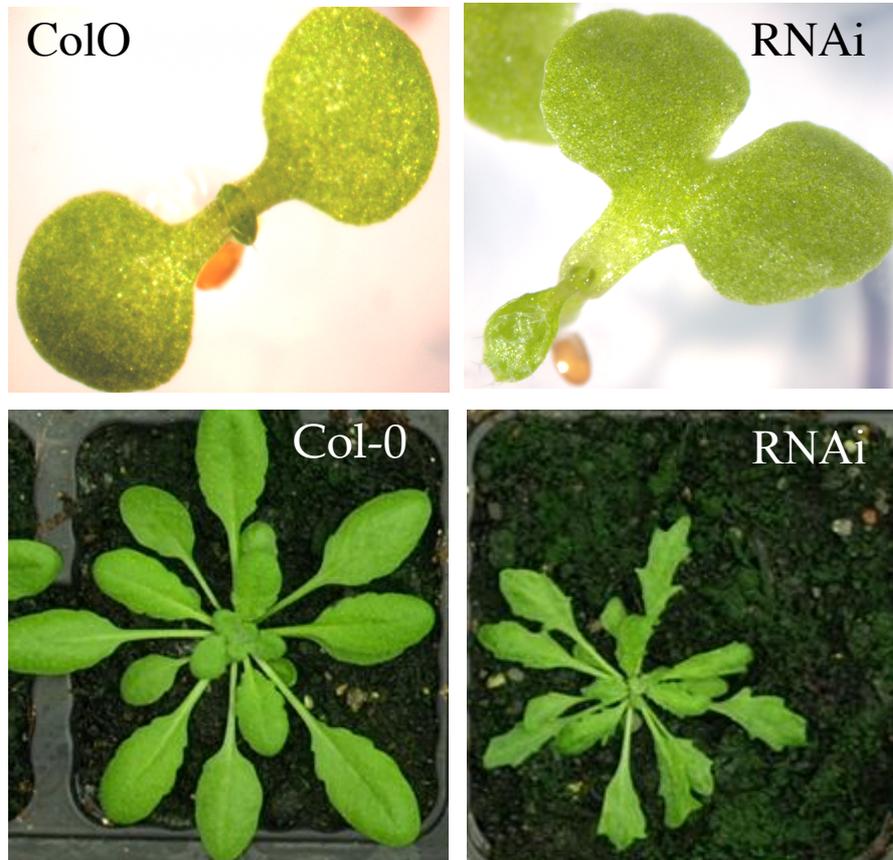
## *I Introduction*

Nous avons vu que PP2-A1 était localisée au niveau du noyau et soluble dans le cytosol des cellules compagnes, et que la protéine pouvait former des agrégats ancrés dans les tubes criblés, et colocalisés au niveau des mitochondries et à proximité du SER. PP2-A2, protéine très proche de PP2-A1, est elle aussi localisée au niveau du noyau et du cytosol des cellules compagnes. Pour comprendre le rôle de *PP2-A1* et *PP2-A2* au sein du phloème, une approche de génétique inverse a été entreprise. Elle consiste à analyser des plantes dérégulées pour l'expression de ces deux gènes, soit par une diminution soit par une augmentation de leur expression.

### **I.1 Les lignées dérégulées pour l'expression de *PP2-A1* et *PP2-A1* déjà disponibles**

#### I.1.1. Mutants d'insertions

Plusieurs mutants d'insertion sont décrits dans les bases de donnée pour *PP2-A1* (par exemple dans *T-DNA express*: [<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>]). Au laboratoire la plupart de ces mutants ont été étudiés et les mutants d'insertion *pp2-a1-0*, *pp2-a1-1*, *pp2-a1-2*, *pp2-a1-3*, *pp2-a1-4*, *pp2-a2-a* ne présentent pas de phénotype altéré par rapport au sauvage (Figure 46 et Tableau 7) et ne présentent pas de diminution significative de l'expression de *PP2-A1* ou *PP2-A2*. Un cas intéressant est celui du mutant *pp2-a1-3*, qui ne présente pas d'altérations de croissance ou de développement, bien que l'expression de *PP2-A1* soit fortement diminuée chez ce mutant. L'insertion du T-DNA dans la séquence codante entraîne probablement la production d'une protéine PP2-A1 tronquée. En revanche l'intégration du T-DNA dans ce gène entraîne également une augmentation de l'expression de *PP2-A2* (Beneteau, 2008). Ces observations suggèrent que *PP2-A2* pourrait avoir un rôle redondant avec *PP2-A1*. Le mutant *pp2-a1-5* est décrit comme un mutant knock-out (Zhang *et al.*, 2011) mais nous ne disposons pas pour l'instant de graines de ce mutant. Aucun mutant présentant une insertion dans la séquence codante de *PP2-A2* n'est disponible dans les bases de données.



**Figure 47: Analyse phénotypique des plantes exprimant un RNAi ciblant PP2-A1 au stade in vitro 4 jours après semis et cultivés en serre à 4 semaines**

*Sur les plantes cultivées in vitro, on constate avec une plus grande fréquence des cotylédons anormaux chez les plantes RNAi que chez le sauvage (Beneteau, 2008). Sur les plantes cultivées en serre et observées 4 semaines après germination, les plantes RNAi sont plus petites, et ses feuilles sont déformées.*

### I.1.2. Lignées RNAi dérégulées pour *PP2-A1*

Le laboratoire dispose également de plusieurs lignées RNAi indépendantes, dérégulées pour *PP2-A1*. Ces lignées ont été générées dans le cadre d'un programme Génoplante (Hilson *et al.*, 2004). Dans celles-ci l'expression de *PP2-A1* est dérégulée par un RNAi ciblant une région spécifique de la séquence de *PP2-A1* (Gene Specific Tag, ou GST ; Figure 46). Julie Beneteau les a analysées (Beneteau, 2008), ces plantes présentent un phénotype fortement altéré par rapport au sauvage, notamment:

- Une fréquence plus élevée de plantules avec un nombre anormal de cotylédons (1, 3 ou 4 cotylédons, ou des cotylédons fusionnés, Figure 47).
- Des problèmes de patron vasculaire, avec des discontinuités dans l'organisation des tissus vasculaires similaires à des mutants comme *monopteros*
- Une croissance réduite par rapport au sauvage
- Des déformations des feuilles (Figure 47)
- Des réductions de fertilité
- Des altérations d'architecture de la hampe florale et de phyllotaxie.

Plusieurs aspects de ce phénotype, notamment les altérations d'architecture et de phyllotaxie, ont été décrits dans des mutants de signalisation de l'auxine. C'est le cas des défauts de morphogenèse foliaire ou de patron vasculaire ressemblent à ceux des mutants *mp* (Wenzel *et al.*, 2007). En revanche les voies de signalisation affectées dans ces lignées RNAi n'ont pas pu être identifiées. Ceci résulte de:

- 1) La pléiotropie du phénotype: il est difficile de distinguer l'effet primaire de la dérégulation de *PP2-A1* des effets secondaires sur le développement de la plante.
- 2) La variabilité phénotypique observée dans ces lignées, résultant d'une activation plus ou moins précoce du RNAi au cours du développement de la plante.
- 3) Le phénotype est tributaire des conditions environnementales en particulier la quantité de lumière et la photopériode.

La dérégulation de *PP2-A1* dans des plantes de ces lignées a été étudiée, soit par Northern blot, soit par PCR quantitative (qPCR) (travaux non publiés, Laurence Bill, Françoise Vilaine). Les résultats de ces expériences ont montré qu'il existait dans les lignées RNAi plusieurs populations d'ARNm tronqués, certaines ayant potentiellement la capacité de coder une protéine tronquée. De plus, il semble que *PP2-A2*, gène qui est situé en tandem répété avec *PP2-A1*, soit plus fortement exprimé, suggérant qu'il pourrait avoir un rôle

redondant avec *PP2-A1*. Sur la base de ces résultats il ne peut pas non plus être exclu un effet de la présence du RNAi sur l'expression d'autres gènes de la famille, le pool des petits ARN secondaires générés par la stratégie de RNAi pouvant cibler les séquences d'autres PP2. Compte tenu des résultats obtenus, les mécanismes moléculaires responsables du phénotype observé chez les plantes RNAi restent à clarifier.

### I.1.3. Lignées surexprimant *PP2-A1* et *PP2-A2*

Au laboratoire, des constructions surexprimant les séquences codantes de *PP2-A1* et *PP2-A2* sous le contrôle d'un promoteur fort constitutif, le promoteur de l'ARN 35S du CaMV, ont également été réalisées, *p35S:PP2-A1* et *p35S:PP2-A2*. Ces constructions ont été transférées dans *Arabidopsis* (Accession Col-0). Plusieurs lignées ont été générées pour chacune de ces constructions. Pour les lignées *p35S:PP2-A2*, plusieurs d'entre elles surexpriment *PP2-A2* avec un facteur d'amplification de 5 à 1000 (Delzangles., 2010). Ces plantes ne présentent pas d'altération de leur phénotype par rapport aux plantes de type sauvage. Pour les lignées *p35S:PP2-A1*, 6 lignées indépendantes ont été testées mais aucune ne présente de surexpression significative de *PP2-A1*. Ces observations sont similaires à celles présentées par Zhang *et al.* (2011), qui décrivent des lignées exprimant de la même façon la séquence codante de *PP2-A1* sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV et présentant une légère augmentation de l'expression, d'un facteur 2.5. Le phénotype de ces lignées n'est pas décrit dans la publication. Ces auteurs ont montré que les plantes surexprimant *PP2-A1* étaient moins colonisées par les pucerons, suggérant que *PP2-A1* aurait un rôle dans la défense des plantes.

Au laboratoire, des lignées exprimant la séquence codante de *PP2-A2* sous le contrôle du promoteur de *PP2-A1* ont également été produites. L'une de ces lignées présente un phénotype ressemblant au phénotype des plantes des lignées RNAi dirigées contre *PP2-A1*. Une hypothèse pour expliquer ce phénotype serait l'induction d'un mécanisme d'inactivation transcriptionnelle par TGS (Transcriptional Gene Silencing) (Vaucheret & Fagard, 2001), agissant soit sur *PP2-A1*, soit sur *PP2-A2*. L'étude de ces lignées n'a pour l'instant pas été poursuivie.

## **I.2 Bilan de l'analyse de ces lignées**

Nous disposons de plusieurs lignées dans lesquelles l'expression de *PP2-A1* et de *PP2-A2* est modulée, cependant aucune n'a pu être exploitée pour déterminer la fonction de ces gènes:

- Les mutants T-DNA ne présentent aucune altération phénotypique.
- Les lignées RNAi présentent un phénotype altéré mais nous ne sommes pas certains que l'apparition de ce phénotype ne résulte que de la dérégulation de *PP2-A1*.
- les lignées surexprimant *PP2-A1* et *PP2-A2* ne présentent pas d'altération de leur phénotype par rapport au sauvage, à l'exception d'une seule lignée *pPP2-A1:PP2-A2*.

## **I.3 Nouvelles stratégies envisagées pour la dérégulation de *PP2-A1* et de *PP2-A2***

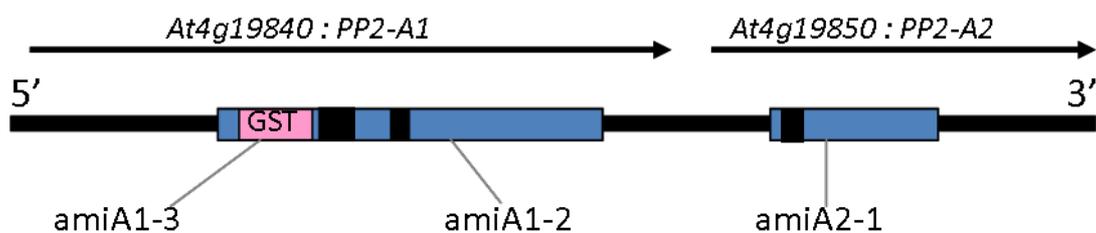
Comme alternative pour déréguler l'expression de ces gènes, nous avons décidé de créer des lignées exprimant des microARN artificiels (amiRNA), qui permettent théoriquement de diminuer l'expression de gènes particuliers de façon très spécifique. L'étude du phénotype et la caractérisation moléculaire des plantes transgéniques générées exprimant des amiRNA dirigés soit contre *PP2-A1* ou *PP2-A2* a été également été menée.

Par ailleurs, dans la première partie de ma thèse, j'ai obtenu des lignées exprimant des fusions traductionnelles de *PP2-A1* ou *PP2-A2* avec une protéine fluorescente CFP ou YFP, sous contrôle d'un promoteur spécifique aux cellules compagnes, le promoteur du gène *SUC2*. Or les plantes issues de deux croisements indépendants des lignées *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *pSUC2:PP2-A2:YFP* présentent une altération de leur phénotype prononcée par rapport aux plantes de type sauvage. Pour compléter ce travail nous avons donc choisi d'analyser en détail le phénotype de ces plantes.

## **II Résultats**

### **II.1 Analyse des lignées dérégulées par des microARN artificiels**

Les microARN artificiels peuvent être utilisés pour diminuer l'expression d'un ou de plusieurs gènes d'intérêt. Ils ont l'avantage d'être très spécifiques, en ciblant une séquence très courte de 21 nucléotides.



**Figure 48:** Représentation schématique de la localisation des séquences ciblées par les microARN artificiels sur PP2-A1 et PP2-A2

**Tableau 8:** Séquences spécifiques de PP2-A1 et PP2-A2 ciblés par les microARN artificiels

MicroARN	Séquence cible	Position
amiPP2-A1-2	TCAAACGTTTTTCAATCCCAC	3 <sup>ème</sup> exon
amiPP2-A1-3	TATCGGTAAAGTTGTCGCCCG	1 <sup>er</sup> exon
amiPP2-A2-1	TTCGTACAAACTGTTGGGACT	1 <sup>er</sup> exon

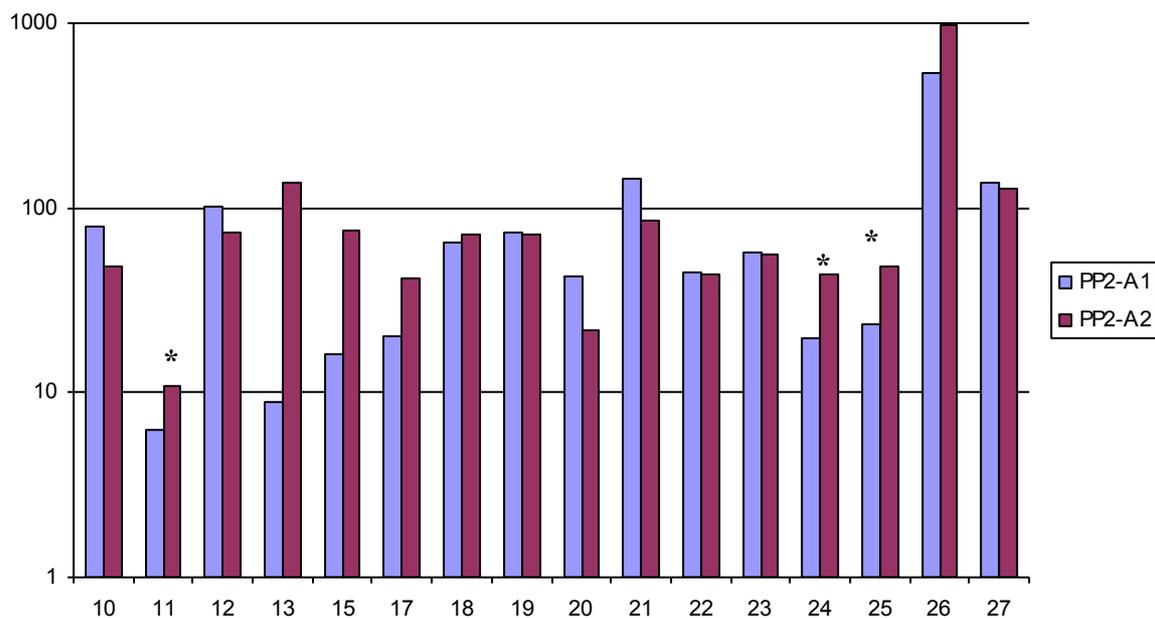
### II.1.1 Principe des techniques de RNAi et de microARN artificiel

L'avantage de la technique des microARN artificiels par rapport à celle de RNAi (Interférence par des ARN) est sa plus grande spécificité. La technique de RNAi consiste à faire produire dans la plante un ARN susceptible de former une structure tige-boucle, comportant un segment d'ARN double brin. La séquence ciblée, généralement de quelques centaines de base, est spécifique (GST ; pour Gene Specific Tag). L'ARN double-brin produit est clivé par la ribonucléase (RNase) DICER DCL4, qui génère une population de petits ARN (siRNA) spécifiques. Ces siRNA déclenchent la dégradation spécifique des séquences homologues par les complexes RISC (RNA-Induced Silencing Complex), notamment la séquence cible endogène. Il a cependant été rapporté que cette méthode produit aussi des siRNA secondaires, qui se propagent de façon transitive sur l'ARNm ciblé et peuvent entraîner la production d'une nouvelle population de siRNA ciblant d'autres ARNm (Vaucheret *et al.*, 2006, Schwab *et al.*, 2006, Ossowski *et al.*, 2008). Néanmoins cette technique est très répandue et a permis d'identifier le rôle d'un grand nombre de gènes chez *Arabidopsis*.

La technique du microARN artificiel, développée par le laboratoire de Detlef Weigel (Schwab *et al.*, 2006) a été développée plus récemment. Elle consiste à faire produire par la plante un microARN artificiel (amiRNA) qui cible une séquence très spécifique du gène d'intérêt de 21 nucléotides. Ce microARN artificiel est clivé par la RNase DICER DCL1 puis reconnu par le complexe RISC associé à la protéine argonaute AGO1. Cette voie ne génère pas de siRNA secondaires, comme c'est le cas du RNAi. Ce mécanisme de dérégulation des gènes est en théorie plus précis que la technique de RNAi (Ossowski *et al.*, 2008).

### II.1.2 Création de microARN artificiels

Nous avons choisi de créer deux microARN artificiels pour *PP2-A1*, et un microARN artificiel pour *PP2-A2*. Nous avons aussi tenté de trouver une séquence pour déréguler les deux gènes simultanément par un microARN unique, mais les deux séquences nucléotidiques de *PP2-A1* et *PP2-A2* se sont révélées trop divergentes (66% d'identité). Les séquences ont été définies en utilisant l'application en ligne WMD3 [<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>]. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour la création d'un



**Figure 49: Niveau d'expression de PP2-A1 et de PP2-A2 dans des plantes des lignées exprimant des micro ARN artificiels spécifiques de PP2-A1 ou de PP2-A2**

Les niveaux d'accumulation des ARNm ont été déterminés par Q-RT-PCR, et quantifiés par rapport à l'accumulation des transcrits du gène rapporteur UBI10 (AT4G05320). En bleu accumulation relative de l'ARN de PP2-A1 et en rose, accumulation relative de l'ARN de PP2-A2. Les plantes présentent différents niveaux de dérégulations pour ces deux gènes, et seules quelques lignées présentent des fortes diminutions de niveau d'expression (lignées 11, 24 et 25) alors qu'elles ne présentent pas d'altérations significatives de leur phénotype. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du niveau d'expression moyen de PP2-A1 et PP2-A2 dans les plantes de type sauvage.

microARN artificiel: la quantité de mésappariements dans le microARN et l'enthalpie libre ( $\Delta G$ ), qui correspond à l'énergie d'hybridation, lors de l'interaction entre le microARN et sa cible ARNm. Pour chaque gène, plusieurs microARN sont proposés, nous avons choisi ceux qui ciblaient des exons. Le microARN artificiel amiPP2-A1-2 cible le début de la région conservée de *PP2-A1*, du codon 448 au codon 468 dans le troisième exon, amiPP2-A1-3 cible une séquence située dans le domaine variable de *PP2-A1*, de la position 157 à la position 177 dans le premier exon et amiPP2-A2-1 cible une séquence située dans la région conservée de *PP2-A2*, de la position 292 à la position 312 dans le second exon (Figure 48; Tableau 8).

### II.1.3 Clonage des microARN artificiels

Après avoir choisi les séquences cibles des gènes, j'ai défini sur le site WMD3 les amorces nucléotidiques pour créer les microARN artificiels spécifique de ces séquences (Voir matériel et méthodes). Les microARN artificiels sont clonés tout d'abord dans un plasmide (pRS300) qui contient un précurseur du microARN mir319a, ce qui permet la production d'un ARN avec une tige boucle reconnue par DCL1. Ces séquences de microARN ont ensuite été clonées dans un vecteur (pH2GW7 ou pK2GW7, Karimi *et al.*, 2002) contenant un promoteur constitutif fort, le promoteur du virus de la mosaïque de chou-fleur 35S (p35S). Nous avons réalisé les clonages dans des vecteurs contenant différents gènes de résistances aux antibiotiques, pour pouvoir également faire des co-transformations (Voir matériel et méthodes & Annexes). Ces vecteurs ont été vérifiés par séquençage.

### II.1.4 Caractérisation phénotypique et moléculaire des lignées amiRNA

Ces constructions ont été transférées dans *Arabidopsis thaliana*, accession Col-0. Pour déréguler de façon simultanée *PP2-A1* et *PP2-A2*, nous avons également réalisé des co-transformations en utilisant un microARN spécifique à *PP2-A1* (*amiPP2-A1-2*) et un microARN spécifique à *PP2-A2* (*amiPP2-A2-1*). Pour chaque construction, au minimum 10 transformants primaires ont été sélectionnés (Tableau 9). Pour toutes les lignées microARN ciblant un seul gène, les plantes ne présentent pas de phénotype différent du sauvage, comme les lignées T-DNA déjà existantes. Dans certaines de ces lignées amiRNA ciblant *PP2-A1*, le niveau d'accumulation du transcrit a été quantifié par qPCR (voir matériel et méthodes ; séquence des amorces). Les premières qPCR réalisées indiquent une diminution de

**Tableau 9: Récapitulatif des lignées microARN artificiel créées**

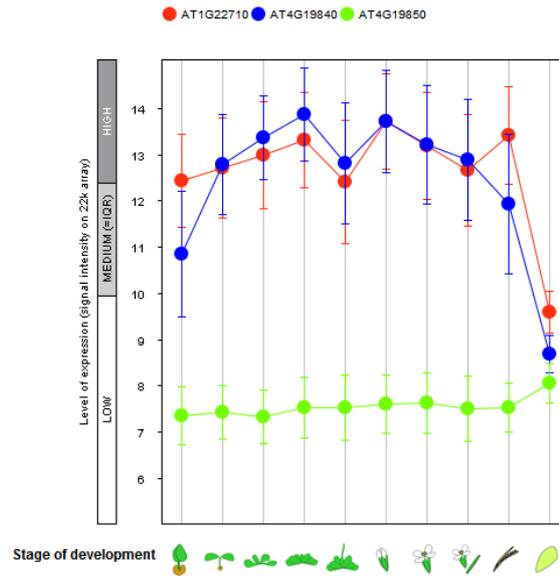
<b>MicroARN artificiel</b>	<b>Gène ciblé</b>	<b>Nombre de transformants primaires</b>	<b>Caractéristiques</b>
amiPP2-A1-2	<i>PP2-A1</i>	11	Pas d'altération du phénotype
amiPP2-A1-3	<i>PP2-A1</i>	39	Pas d'altération du phénotype
amiPP2-A2-1	<i>PP2-A2</i>	12	Pas d'altération du phénotype
amiPP2-A1-2 & amiPP2-A2-1	<i>PP2-A1 et PP2-A2</i>	27	Pas d'altération du phénotype

l'expression de *PP2-A1* pouvant atteindre 80% de diminution par rapport au témoin. Ces données sont à confirmer et à compléter pour l'ensemble des lignées.

Nous avons obtenu au total 27 lignées transformées indépendantes avec des microRNA artificiels ciblant les deux gènes. Le niveau d'expression de *PP2-A1* et de *PP2-A2* a également été déterminé par qPCR sur les descendants. Les résultats préliminaires indiquent une dérégulation forte dans certaines lignées. Trois lignées présentent une diminution de l'expression de ces deux gènes, les lignées 11, 24 et 25 (Figure 49). Les plantes de ces lignées ne présentaient pas d'altération de leur phénotype par rapport aux plantes de type sauvage. Un phénotype de fasciation de la hampe florale était présent sur une des lignées, amiRNA#19 (double amiRNA) mais cette lignée ne présentait qu'une très faible dérégulation pour les deux gènes. Comme c'est la seule lignée qui présentait ce phénotype, nous avons conclu qu'il s'agissait certainement d'un effet indirect dû au site d'insertion de l'un des transgènes.

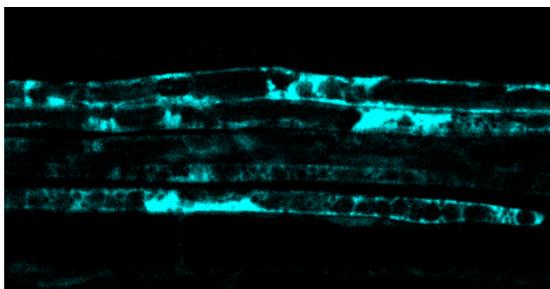
#### II.1.5 Conclusions

Nous avons généré des lignées exprimant des amiRNA dirigés contre *PP2-A1* et *PP2-A2*. Les premières caractérisations moléculaires montrent une diminution de l'expression de ces deux gènes, selon les lignées, mais aucun phénotype différent de celui observé dans le génotype de type sauvage n'a été observé dans les plantes les plus dérégulées pour *PP2-A1* et *PP2-A2*. Malgré le nombre important de lignées obtenues dérégulées pour l'expression de *PP2-A1*, par simple amiRNA, ou dérégulées pour l'expression de *PP2-A1* et *PP2-A2* par deux amiRNA, aucune plante ne présente un phénotype proche de celui des lignées RNAi dirigées contre *PP2-A1*. Ces résultats démontrent que la dérégulation de *PP2-A1*, de *PP2-A2* ou des deux gènes ne provoque pas à elle seule d'altérations de développement ou de croissance. Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'altérations de phénotype observé dans le mutant *PP2-A1-3*, en ce qui concerne la dérégulation de *PP2-A1*. Ils suggèrent également que chez les lignées RNAi, d'autres gènes pourraient être dérégulés, et seraient impliqués dans l'apparition de ce phénotype. Il est aussi possible que le RNAi ne cible qu'une partie de *PP2-A1*, mais qu'une partie de la protéine soit toujours produite, la protéine tronquée résultante pourrait avoir une action délétère sur la plante, par un mécanisme de type dominant négatif.

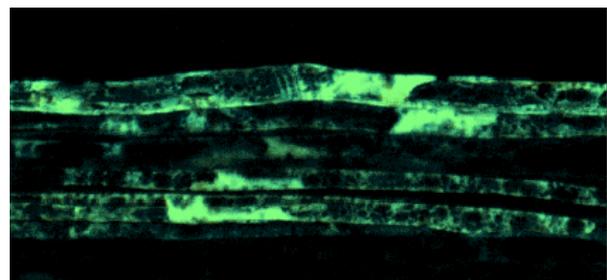


**Figure 50: Niveaux d'expression relatifs de PP2-A1, PP2-A2 et de SUC2 au cours du développement de la plante**

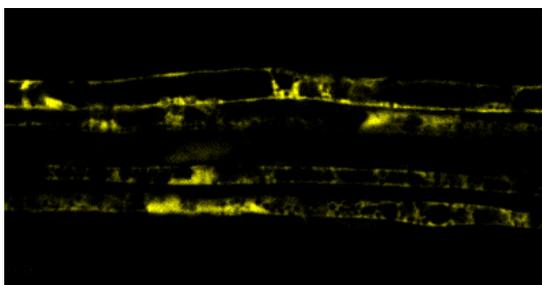
Niveaux d'expression relatifs de PP2-A1 (en bleu), de PP2-A2 (en vert) et de SUC2 (en rouge) selon le stade de développement de la plante. Ces courbes sont extraites des données d'expression disponibles sur Genevestigator [<https://www.genevestigator.com/gv/>] et correspondent à des mesures relatives d'accumulation d'ARNm obtenues dans différents organes prélevés à des stades de croissance particuliers. Les niveaux d'expression sont exprimés sur une échelle logarithmique.



:pSUC2:PP2-A1:CFP



Superposition des deux images



pSUC2:PP2-A2:YFP

**Figure 51: Colocalisation de PP2-A1:CFP et de PP2-A2:YFP dans les cellules compagnes dans des feuilles d'Arabidopsis**

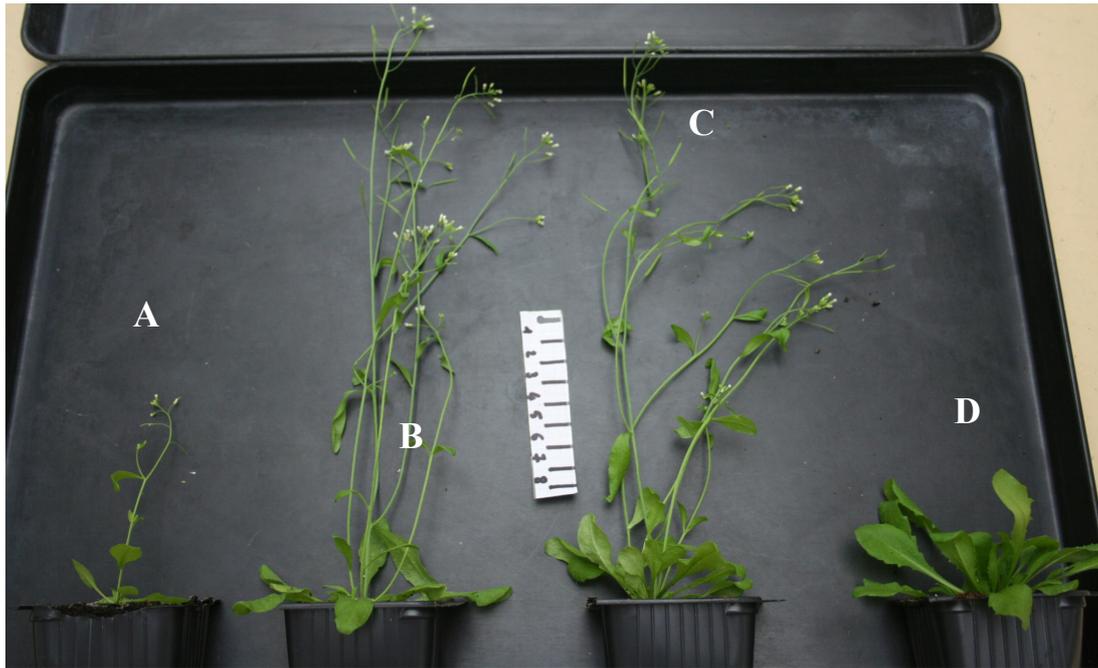
Dans une plante exprimant PP2-A1 fusionnée à la CFP et PP2-A2 fusionnée à l'YFP, on observe que les deux protéines sont localisées dans le noyau et dans le cytosol des cellules compagnes. En superposant les deux images, on observe une colocalisation des deux signaux.

## ***II.2 Analyse des lignées exprimant PP2-A1:CFP et PP2-A2:YFP***

Au laboratoire, nous n'avons pas obtenu de lignées présentant une forte surexpression de *PP2-A1*, même en utilisant des vecteurs d'expression possédant le promoteur fort 35S du CaMV. Dans la littérature, une seule équipe a décrit l'obtention de plantes surexprimant *PP2-A1*, et cela a été réalisé avec ce promoteur 35S (Zhang *et al.*, 2011). Les niveaux d'expression obtenus dans ces lignées ont été toutefois assez faibles (augmentation par un facteur 2,5 de l'accumulation de transcrits de *PP2-A1*). Dans ces plantes, la surexpression de *PP2-A1* entraîne une diminution de la colonisation des plantes par les pucerons. En revanche l'effet de la surexpression de la protéine sur le phénotype de ces plantes n'a pas été décrit. De plus nous n'avons pas pu obtenir ces plantes auprès des auteurs. Il était donc intéressant de déterminer avec le matériel généré dans la première partie de ma thèse si une expression ectopique de *PP2-A1* et de *PP2-A2* dans les cellules compagnes fusionnés à des protéines fluorescentes pouvait modifier le phénotype des plantes, ce qui pourrait nous apporter des informations complémentaires sur le rôle de ces protéines.

### **II.2.1 Origine des croisements**

Lors des études de localisation de protéines phloémienne *PP2-A1* et *PP2-A2*, j'ai créé des lignées exprimant *PP2-A1:CFP* et *PP2-A2:YFP* sous le contrôle du promoteur du gène *SUC2*. Ces lignées ont été obtenues chez *Arabidopsis thaliana* dans l'accession Col-0. Pour ces constructions, les promoteurs *pPP2-A1* et *pPP2-A2* n'ont pas été utilisés pour ne pas induire de co-suppression sur les gènes endogènes. Le gène *SUC2* présente un profil d'expression assez similaire dans les cellules compagnes (Truernit & Sauer, 1995) et comme on peut le voir sur la Figure 50, son niveau d'expression au cours du développement de la plante est très proche de celui du gène *PP2-A1* (Données Genevestigator [<https://www.genevestigator.com/gv/>]). Le promoteur de ce gène permet ainsi d'exprimer dans les cellules compagnes du phloème des protéines d'intérêt. Dans les plantes de lignées *pSUC2:PP2-A1:CFP* et *pSUC2:PP2-A2:YFP* les deux protéines de fusion *PP2-A1:CFP* et *PP2-A2:YFP* sont exprimées dans les cellules compagnes, au niveau du cytosol et du noyau (Figure 51). Des croisements entre ces deux lignées ont été réalisés pour déterminer si les protéines *PP2-A1:CFP* et *PP2-A2:YFP* sont colocalisées dans les cellules compagnes, ce qui est le cas (Figure 51).



**Figure 52: Phénotype des plantes des lignées pSUC2:PP2-A2:YFP et pSUC2:PP2-A1:CFP et de leur croisement, à 6 semaines cultivées en jours longs**  
 En A: pSUC2:PP2-A2:YFP, en B: pSUC2:PP2-A1:CFP, en C: Col-0. en D: croisement entre pSUC2:PP2-A1:CFP x pSUC2:PP2-A2:YFP. La lignée pSUC2:PP2-A1:CFP n'a pas d'altération de son phénotype par rapport à une plante sauvage. La lignée pSUC2:PP2-A2:YFP présente un très léger retard de croissance. Le croisement possède un phénotype très altéré, caractérisé par un retard de floraison et une augmentation importante de la taille de la rosette.



**Figure 53: Comparaison de plantes de type sauvage et du croisement SUR12 de 27 jours, cultivées en jours longs**  
 Col-0 (à gauche) et SUR12 (à droite) observées à 27 jours. A ce stade, aucune plante issue du croisement SUR12 ne présente de hampe florale, ces plantes montrent un plus grand nombre de feuilles, plus grandes, par rapport aux plantes de type sauvage.

## II.2.2 Phénotype des plantes des lignées *pSUC2A1:CFP* et *pSUC2A2:YFP*

Nous disposons de 10 lignées indépendantes exprimant *pSUC2:PP2-A1:GFP*, 15 lignées exprimant *pSUC2:PP2-A1:CFP*, et 8 lignées exprimant *pSUC2:GFP:PP2-A1*. Aucune de ces lignées ne présente d'altération de phénotype, elles ont toutes le phénotype de plantes de type sauvage. Nous disposons également de 2 lignées indépendantes exprimant *pSUC2:PP2-A2:YFP*. La première lignée présente également un phénotype sauvage, alors que la seconde lignée possède un léger retard de croissance (Figure 52). Le phénotype des croisements *pSUC2:PP2-A1:CFP* x *pSUC2:PP2-A2:YFP* est fortement altéré (Figure 52).

## II.2.3 Analyse du phénotype du croisement *PP2-A1:CFP* x *PP2-A2:YFP*

Les plantes issues de ce croisement présentent un phénotype général d'augmentation de biomasse. C'est la première fois que nous observons un tel phénotype chez des lignées ou expression de *PP2-A1* et *PP2-A2* fusionnés à des protéines fluorescentes. Deux croisements indépendants ont été réalisés avec 2 lignées exprimant *pSUC2:PP2-A1:CFP* et une lignée exprimant *pSUC2:PP2-A2:YFP*.

### II.2.3.1 Description générale

Pour plus de simplicité le croisement des lignées *pSUC2:PP2-A1:CFP* et *pSUC2:PP2-A1:YFP* sera désigné par la suite « SUR12 », puisqu'il permet à la fois une expression de *PP2-A1* fusionné à la CFP et *PP2-A2* fusionné à la YFP. Le phénotype est observé sur les plantes F1, et sur leur descendance, en particulier les plantes sélectionnées comme des homozygotes pour les deux marqueurs. Des plantes double-homozygotes ont été utilisées pour une caractérisation plus précise, dans différentes conditions de culture, soit en serre, pour les études en jours longs soit en chambre de culture pour les études en jours courts.

Les plantes du croisement SUR12 présentent un plus grand nombre de feuilles que les plantes témoins (Col-0) et celles-ci sont plus grandes (Figures 53 à 56), que ce soit en jours longs ou en jours courts. Nous n'avons pas pu quantifier avec précision le nombre de feuilles surnuméraires ou la taille de ces feuilles.



**Figure 54: Comparaison de la taille de plantes de type sauvage et du croisement SUR12, à 8 semaines cultivées en jours longs**

*Plante de type sauvage (Col-0) à gauche et du croisement SUR12 à droite âgées de 8 semaines. Les plantes du croisement SUR12 présentent plus de feuilles que les plantes de type sauvage, et le nombre de hampe florale est réduit.*



**Figure 55: Analyse de la taille et de la forme des feuilles de Col-0 et du croisement SUR12 de plantes cultivées en conditions de jours longs**

*Taille des feuilles de plantes de type sauvage (à gauche) et du croisement SUR12 (à droite). Plantes âgées de 6 semaines et cultivées en jours longs. Le limbe foliaire et le pétiole des feuilles de SUR12 sont plus grands. Ces feuilles sont également plus dentelées que celles du témoin.*

Les feuilles de ces plantes sont également plus dentelées, comme on peut l'observer sur la Figure 55. Ce phénotype se met en place progressivement au cours du développement de la plante et devient de plus en plus prononcé. A 18 jours après semis, on ne voit encore que très peu de différence au niveau de la taille des plantes et dans le nombre de feuilles entre les plantes témoins et les plantes issues du croisement SUR12 (Figure 57). Celles-ci présentent une rosette de taille plus importante par rapport au sauvage, ce qui s'explique par le plus grand nombre de feuilles et la plus grande taille de celles-ci (Figure 57).

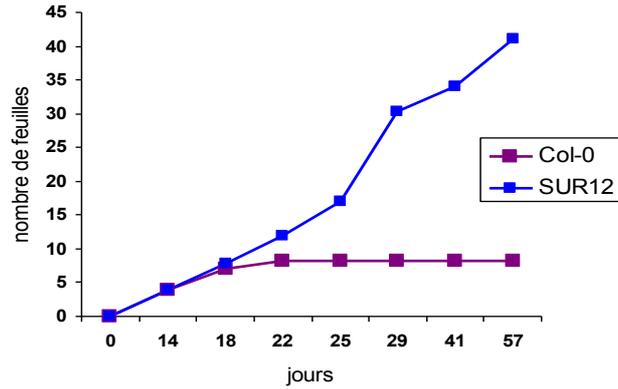
Ces plantes présentent également une floraison plus tardive en jours longs par rapport aux plantes de type sauvage, avec des retards de floraison allant de quelques jours à quelques semaines (Figure 58). Le nombre de hampes florales par plante apparaît plus réduit que pour les plantes de type sauvage, mais le diamètre de ces hampes est fortement augmenté, en moyenne par un facteur 3 (Figure 59). Nous avons aussi observé des fleurs plus grosses chez ces plantes. Dans le cas de SUR12, comme sa floraison est retardée, il y a émergence de feuilles surnuméraires. De plus, ces plantes continuent à produire des feuilles même après l'induction de la floraison. Une analyse préliminaire montre que les plantes du croisement SUR12 produisent plus de graines. Les graines du croisement SUR12 et du témoin mesurent la même taille, mais leur poids n'a pas été comparé. Des observations en serre en jours longs ont montré que le système racinaire de ces plantes est également plus développé. Des analyses plus précises restent à réaliser pour quantifier ces résultats.

Nous avons également suivi le développement de plantes SUR12 et de Col-0 en jours courts, (photopériode de 8h de jour). Dans ces conditions, le phénotype des plantes SUR12 est moins marqué qu'en jours longs par rapport à Col-0, mais les plantes sont aussi plus grandes. Ceci s'explique en partie par le fait que les plantes SUR12 mettent plus de temps à fleurir, favorisant l'émergence de nouvelles feuilles.

### II.2.3.2 Effet sur la biomasse

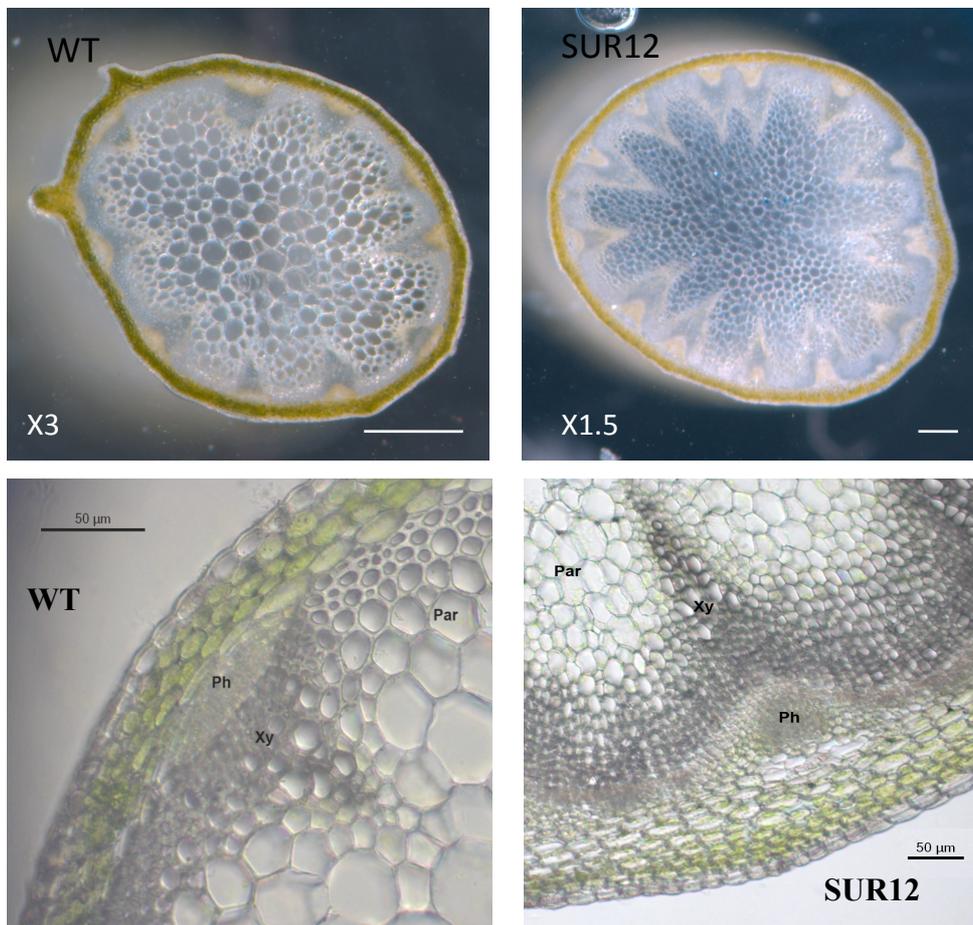
Nous avons fait des mesures de poids frais sur les plantes ayant poussé en jours courts pendant 8 semaines. Nos mesures montrent que les plantes du croisement SUR12 ont une biomasse plus importante que les plantes de type sauvage. En jours courts, les plantes du croisement SUR12 produisent également plus de feuilles que le témoin, et elles les produisent plus vite (Figure 56).





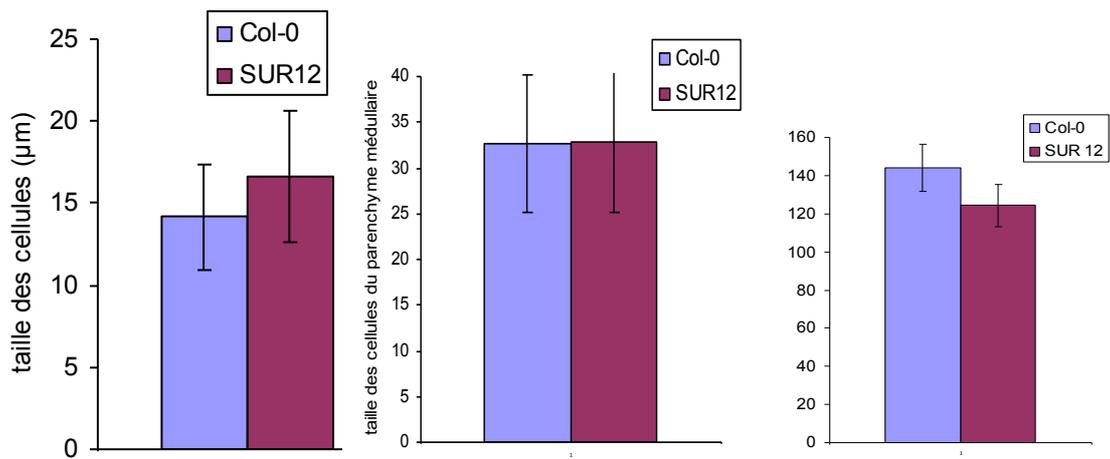
**Figure 58: Nombre de feuilles de rosette chez les plantes du croisement SUR12 et de type sauvage au cours de leur développement**

Le nombre de feuilles chez les plantes de type sauvage n'augmente plus après floraison, à 22 jours, alors qu'il ne cesse d'augmenter chez SUR12, même après émergence d'une hampe florale. La conséquence est que les plantes SUR12 ont un nombre de feuille beaucoup plus important Plantes cultivées en jours longs.



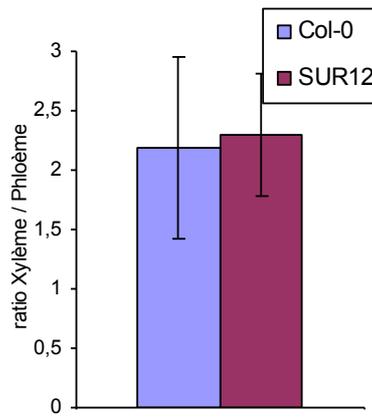
**Figure 59: Observation à la loupe binoculaire et en microscopie optique des coupes transversales de hampe florale de plantes sauvage et de plantes issues du croisement SUR12**

En haut à gauche: Coupe sur un plante de type sauvage et à droite sur un plante d'une lignée SUR12. On voit que les plantes SUR12 ont une hampe beaucoup plus large, et un plus grand nombre de pôles vasculaires. Barre d'échelle: 300  $\mu$ m. Attention, sur cette Figure, les grossissements sont très différents. En bas à gauche: coupe sur une plante de type sauvage (Col-0) et à droite: coupe sur une plante SUR12. On voit que le phloème et le xylème ont des surfaces plus importantes chez SUR12. Ph: phloème, Xy: xylème, Par: parenchyme médullaire (images Nelly Wolff).



**Figure 60: Mesure de la taille des cellules de xylème et de parenchyme médullaire chez les plantes de type sauvage et du croisement SUR12 et mesure du nombre de cellule par mm<sup>2</sup> dans l'épiderme de feuille**

La différence de taille n'est pas significative pour les deux types de cellules. Pour le xylème: n=68 chez Col-0 et n=72 pour SUR12. Pour le parenchyme médullaire, n=92 pour col-0, n=85 pour SUR12. Les deux lignées Col-0 et le croisement SUR12 présentent un nombre de cellules épidermiques similaire. n=8 pour les plantes de type sauvage (Col-0), n=13 pour les plantes du croisement SUR12.



**Figure 61: Ratio de la surface xylème / phloème**

Ces mesures ont été faites en déterminant les surfaces moyennes de xylème et de phloème sur le premier entrenœud à la base de la hampe florale N=16 pour les plantes de type sauvage (Col-0), n=19 pour les plantes du croisement SUR 12. Plantes âgées de 6 semaines

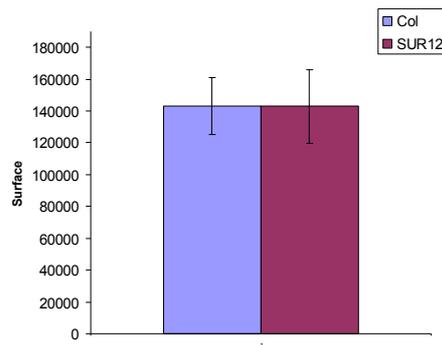
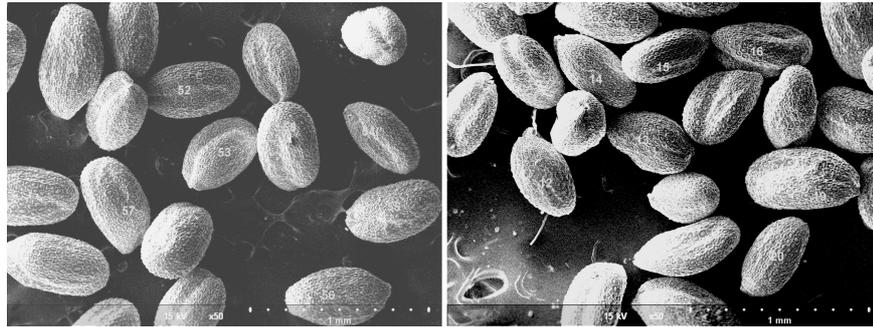
### II.2.3.3 Effet sur la dimension des cellules dans différents organes

Les plantes sont un diamètre plus important, soit parce que les cellules peuvent être plus grandes, soit parce qu'elles sont plus nombreuses. Avec l'aide de Nelly Wolff, nous avons mesuré la taille des cellules, dans différents types cellulaires, au niveau de coupes transversales de hampes florales et dans l'épiderme de feuilles de rosette. Les mesures sur hampes florales ont été réalisées sur la hampe principale à un stade de développement bien précis, correspondant à une longueur de 20 cm environ. Les coupes transversales ont été réalisées sur le premier entrenoeud, à 5 cm de la rosette. Les morceaux de hampes ont été inclus dans de l'agarose 8%, puis coupés avec un vibratome. Des coupes de 80 µm ont été faites. Les photos ont été réalisées sur un microscope Nikon Microphot FxA (Figure 59). Les images ont ensuite été traitées avec ImageJ (Schneider *et al.*, 2012), puis les données ont été traitées dans Excel 2003. Sur ces coupes, nous avons mesuré le diamètre de cellules des vaisseaux du xylème et des cellules de parenchyme médullaire (Figure 60).

Pour les mesures de cellules d'épiderme, des feuilles de rosette de plantes âgées de 28 jours ont été prélevées, puis un petit morceau de la feuille a été découpé puis observé en MEB (MEB de paillasse, Hirox SH-1500). A ce stade, les plantes de type sauvage commencent à être induites à fleur, alors que les plantes du croisement SUR12 n'étaient pas induites à fleur. Les images ont été analysées avec imageJ et les données traitées avec Excel 2003. Sur ces feuilles, nous avons mesuré la taille des cellules épidermiques (Figure 60)

Ces mesures ont montré que l'ensemble des cellules mesurées sont de même taille pour les plantes SUR12 et les plantes de type sauvage. Seuls les vaisseaux du xylème montrent un diamètre légèrement supérieur, mais la différence mesurée n'est pas statistiquement significatif. Les cellules de parenchyme ne présentent pas non plus de différences. Pour les cellules de l'épiderme, aucune différence significative n'a pu être observée (Figure 60).

Puisque dans le croisement SUR12, les gènes *PP2-A1* et *PP2-A2* sont dérégulés dans les cellules du phloème, nous avons également mesuré dans la hampe florale les surfaces respectives des pôles de xylème et de phloème, et nous avons calculé le ratio surface du xylème/ surface du phloème, dans des plantes de type sauvage et dans des plantes du croisement SUR12 (Figure 61). Nous n'avons pas trouvé de différence significative dans les deux cas, ce qui signifie que le développement des pôles de tissus vasculaires se fait



**Figure 62: Observation de graines de type sauvage et du croisement SUR12 en microscopie électronique à balayage et mesure de la taille de leurs graines**

Les graines ont été observées au MEB. Pour les mesures de taille de graine, la plus grande section des graines ainsi que la surface ont été mesurées. Nous n'avons pas vu de différence de taille entre les graines de plantes de type sauvage et les plantes du croisement SUR12. Pour les graines de type sauvage (Col-0):  $n=73$ , pour les graines du surexprimeur SUR12:  $n=85$ . Valeurs données en  $\mu\text{m}^2$ . Image réalisée avec un MEB de paillasse. X50 (Images Nelly Wolff).

**Tableau 10: Bilan des croisements réalisés entre des lignées surexprimant PP2-A1 et PP2-A2**

Parent 1	Parent 2	Phénotype des plantes F1
<i>p35S:PP2-A1</i>	<i>pSUC2:PP2-A2:YFP</i>	Aucun phénotype
<i>p35S:PP2-A2</i>	<i>p35S:PP2-A1</i>	Aucun phénotype
<i>p35S:PP2-A2</i>	<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i>	Aucun phénotype
<i>pPP2-A1:PP2-A2</i>	<i>pSUC2:PP2-A1:CFP</i>	Aucun phénotype

normalement. Les pôles vasculaires sont plus développés chez le croisement SUR12, ce qui reflète surtout l'augmentation du diamètre de la hampe florale.

#### II.2.3.4: Dimensions des graines

Nous avons mesuré les dimensions des graines produites par les plantes du croisement SUR12 et comparé celles-ci aux graines de plante sauvage Col-0. Nous avons réalisé une mesure de la surface des graines, sur des photos acquises en microscopie à balayage (MEB, HIROX SH-1500) et traité les images avec le logiciel ImageJ. Nous n'avons pas constaté de différences significatives entre les graines du témoin et les graines issues du croisement (Figure 62). Nous n'avons pas encore réalisé les mesures de poids de 1000 graines, ce qui permettrait de déterminer si le remplissage de la graine est affecté.

#### II.2.4 Analyse d'autres croisements

Afin de déterminer si la surexpression de *PP2-A1* et de *PP2-A2* est à l'origine du phénotype que nous observons chez le croisement SUR12, nous avons réalisé de nouveaux croisements sur d'autres lignées surexprimant ces gènes. En effet, dans le cas de SUR12, les plantes produisent les deux protéines fusionnées à des marqueurs fluorescents. Nous avons donc cherché:

- 1) à reproduire ce phénotype avec d'autres croisements exprimant des copies supplémentaires de *PP2-A1* et de *PP2-A2* de façon ubiquitaire dans la plante (utilisation d'un promoteur constitutif fort);
- 2) à déterminer si ce phénotype dépend de la présence de l'étiquette fluorescence CFP ou YFP;
- 3) à déterminer si le phénotype résulte de la surexpression de l'une ou l'autre de ces protéines uniquement dans les cellules compagnes.

Nous avons récemment réalisé de nouveaux croisements en utilisant différentes combinaisons avec les plantes dont nous disposons, i.e. des plantes surexprimant de façon constitutive *PP2-A1* ou *PP2-A2* et des plantes exprimant dans les cellules compagnes *PP2-A1* ou *PP2-A2* avec une protéine fluorescente (Tableau 10). Pour l'instant avec les combinaisons déjà obtenues, nous n'avons pas pu reproduire le phénotype des plantes SUR12. D'autres

croisements sont envisagés, notamment des croisements où *PP2-A1* et *PP2-A2* sont exprimés dans les cellules compagnes sans fusion avec des protéines fluorescentes.

## II.2.5 Conclusions

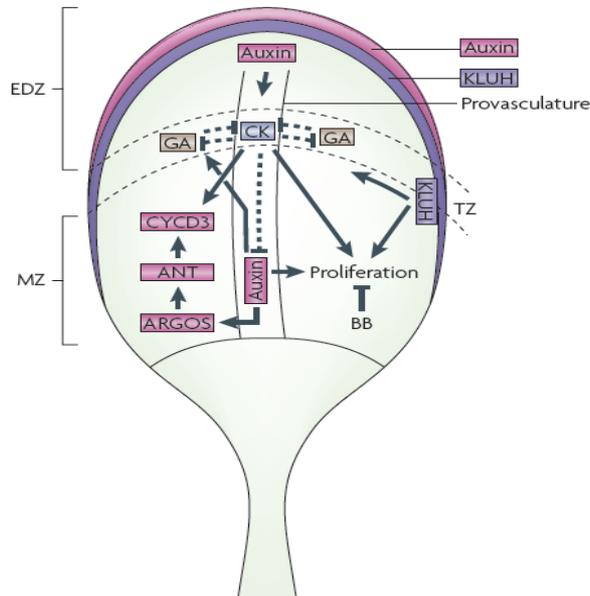
Nous avons analysé des plantes issues d'un croisement entre des plantes exprimant dans les cellules compagnes les protéines PP2-A1 et PP2-A2 fusionnées à des protéines fluorescentes. Les plantes mères, homozygotes, utilisées pour ce croisement, ne présentent pas de phénotype, alors que leur descendance possède un phénotype modifié par rapport aux plantes de type sauvage. Les plantes sont plus grosses, ont une biomasse augmentée, et l'augmentation de taille de ces plantes ne résulte pas d'une augmentation de la taille des cellules mais d'une augmentation du nombre de cellules dans tous les organes examinés. Elles possèdent également une floraison retardée en condition de jours longs par rapport au sauvage. Ces plantes sont en cours de caractérisation au niveau moléculaire, pour déterminer si dans ces plantes les gènes *PP2-A1* et *PP2-A2* sont dérégulés. Ce phénotype n'a pas encore été reproduit dans d'autres croisements avec des lignées surexprimant les protéines PP2-A1 et PP2-A2 sans fusion avec des protéines fluorescentes. Une des hypothèses pour expliquer le phénotype de ces plantes, est que chez les plantes du croisement SUR12 le niveau d'expression de *PP2-A2* est très fortement augmenté par rapport à une plante sauvage, entraînant une modification du ratio PP2-A1/PP2-A2 dans ces plantes, ce qui pourrait modifier les interactions entre ces protéines et avec d'éventuels partenaires.

### ***III Discussion***

Pour déterminer la fonction de *PP2-A1* et de *PP2-A2* dans la plante, j'ai tout d'abord produit et analysé des microARN artificiels diminuant le niveau d'expression de *PP2-A1* ou *PP2-A2 in planta*. Les lignées produisant les deux microARN artificiels ciblant *PP2-A1* et les lignées produisant un microARN artificiel ciblant *PP2-A2* ne présentaient pas d'altérations de leur phénotype. Nous avons vu que le microARN artificiel amiPP2-A1-2 réduit le niveau d'expression de *PP2-A1*, et que le microARN artificiel amiPP2-A2-1 réduit le niveau d'expression de *PP2-A2*. Les mutants d'insertion existant ne présentent pas non plus d'altération de leur phénotype. Ces résultats sont cohérents avec l'observation de l'absence de modifications de phénotype observées dans les lignées amiRNA ciblant *PP2-A1*. De même, nous n'observons pas de phénotype pour les lignées amiRNA ciblant *PP2-A2*, pour lesquelles il n'existe aucun mutant d'insertion.

J'ai également créé des lignées produisant simultanément deux microARN artificiels qui diminuent le niveau d'expression à la fois de *PP2-A1* et de *PP2-A2*. Nous n'avons pas non plus observé de phénotype altéré chez ces plantes. Dans le mutant d'insertion *pp2-a1-3* (également dénommé A1F), notre hypothèse était que l'absence de défauts de phénotype résultait de la surexpression de *PP2-A2*, qui complèterait ainsi la réduction de l'expression de *PP2-A1*. L'absence de défauts de phénotype observé dans les lignées amiRNA dérégulant à la fois *PP2-A1* et *PP2-A2* montrent que ce n'est pas forcément le cas, puisque dans ces lignées *PP2-A1* et *PP2-A2* ont une expression plus faible que chez les plantes de type sauvage. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions introduire le microARN ciblant *PP2-A2* dans les mutants d'insertions *pp2-a1-3*, dans lesquelles le niveau d'expression de *PP2-A1* est déjà réduit. Si nous n'observons pas de phénotype, cela confirmera que dans ce mutant il n'y a pas de complémentarité fonctionnelle de *PP2-A1* par *PP2-A2*.

Les plantes dérégulées par des microARN artificiels dirigés contre *PP2-A1* et *PP2-A2* ne montrent pas de défaut majeur de croissance ou de développement, ce qui pose évidemment la question du rôle de ces gènes dans le phloème. Néanmoins, il est possible que l'absence de transcrits de ces gènes puisse avoir un impact en cas de stress, comme par exemple une attaque par des pucerons. En effet, l'équipe de Dong a montré que des surexpresses de *PP2-A1*, étaient moins colonisés par les pucerons (Zhang *et al.*, 2011). Les



**Figure 63: Schéma présentant un scénario pour le mode d'action de la voie de signalisation ARGOS/ANT/CYCD3**

Dans ce modèle, l'auxine transportée depuis la zone de différenciation (EDZ) vers le pétiole, régule positivement la voie ARGOS / ANT / CYCD3. CYCD3 ; cycline D3, ANT: aintegumenta. MZ: zone méristématique ; EDZ: zone d'élongation et de différenciation. TZ: zone de transition CK: cytokinine. GA: Gibbérelline (D'après Wolters & Jurgens., 2009). Ce modèle rend compte de l'observation de lignées surexprimant ANT ou ARGOS (références) et dans lesquelles l'activité de CYCD3, un gène intervenant dans le cycle cellulaire, est fortement induite dans la feuille, produisant une forte augmentation des divisions cellulaires et une biomasse accrue.

mêmes tests pourraient être réalisés sur les plantes dérégulées par microARN artificiels pour voir si on confirme cet effet sur les pucerons. Si on observait une plus grande colonisation des plantes par les pucerons, cela confirmerait un rôle de *PP2-A1* dans la défense des plantes en réponse à un stress biotique.

*PP2-A1* et *PP2-A2* appartiennent à une famille multigénique comprenant 31 membres (Dinant *et al.*, 2003). On ne peut pas exclure qu'il y ait une redondance fonctionnelle avec d'autres membres de cette famille. Nos résultats suggèrent en effet que l'absence de l'une ou l'autre des protéines *PP2-A1* et *PP2-A2* n'est pas suffisante pour perturber le développement. Ceci pourrait expliquer pourquoi aucune altération phénotypique n'est observée ni dans les lignées exprimant des amiRNA et dans les mutants d'insertion. En revanche, ces observations n'expliquent pas le phénotype obtenu dans les lignées RNAi. C'est pourquoi l'analyse du niveau d'expression des autres gènes de la famille des PP2 semble nécessaire pour comprendre le phénotype observé, bien que une hypothèse alternative serait que la production dans ces lignées de protéines tronquées ayant un effet dominant négatif

Les lignées surexprimant *PP2-A1* ou *PP2-A2* (*p35S:PP2-A1*, *p35S:PP2-A2* et *pPPP2-A1:PP2-A2*) ne présentent pas ou peu de défaut de phénotype comparé à celui observé dans les plantes de type sauvage, seule une lignée *pSUC2:PP2-A2:YFP* présente un retard de croissance. En revanche dans le croisement entre les lignées exprimant *pSUC2:PP2-A1:CFP* et *pSUC2:PP2-A2:YFP* dans les cellules compagnes, nous avons observé une modification du phénotype caractérisée par une augmentation de la biomasse, un retard de floraison, et une augmentation du nombre de cellules. Or ces plantes ne présentent pas de problèmes de développement: les organes ne sont pas déformés, ils sont simplement plus gros.

Pour expliquer le phénotype observé dans le croisement *pSUC2:PP2-A1:CFP* et *pSUC2:PP2-A2:YFP*, on peut formuler plusieurs hypothèses:

- 1) L'expression ectopique de *PP2-A1* et de *PP2-A2* par le promoteur du gène *SUC2* entraînerait localement une surexpression de ces deux gènes, et aurait un effet sur la production de ces deux protéines dans les cellules compagnes. Ceci pourrait modifier le ratio *PP2-A1/PP2-A2* dans ces cellules. Sur le site Genevestigator, les niveaux d'expression relatifs de *PP2-A1* et *SUC2* semblent similaires, alors que le niveau d'expression de *PP2-A2* est beaucoup plus faible, indiquant que le niveau d'expression de *PP2-A2* est potentiellement plus affecté que celui de *PP2-A1*. Des études réalisées *in vitro* montrent que *PP2-A1* peut former des oligomères (Beneteau., 2008; Douville., 2010) et ont suggéré que *PP2-A1* et *PP2-*

A2 pouvaient former des hétéro-oligomères. Si les deux protéines, une modification du ratio PP2-A1/PP2-A2 pourrait entraîner des modifications dans les interactions entre des oligomères de PP2-A1 et de PP2-A2 et des partenaires protéiques. On sait en effet que PP2-A1 interagit avec une dizaine de protéines de la sève (Beneteau *et al.*, 2010), et possède un site de fixation putatif aux ARN (Beneteau., 2008). Si PP2-A1 , ou PP2-A2, interviennent bien dans le transport de protéines entre les cellules compagnes et les tubes criblés, on peut aussi formuler l'hypothèse que les partenaires protéiques de ces PP2 ne sont pas transportés correctement entre les cellules compagnes et les tubes criblés.

2) L'ajout de marqueurs fluorescents (CFP et YFP) pourrait aussi empêcher le transport des cellules compagnes vers les tubes criblés de PP2-A1 et PP2-A2. On observe en effet en microscopie confocale que dans ces lignées, PP2-A1:CFP et PP2-A2:YFP sont majoritairement localisées dans les cellules compagnes lorsqu'elles sont exprimées avec le promoteur *SUC2* qui est spécifique des cellules compagnes. Si les protéines avec lesquelles elles interagissent sont localisées dans les cellules criblés (protéines circulantes ou ancrées) alors, l'interaction entre les PP2 et ces protéines ne pourrait pas se faire, puisqu'une fraction importante de PP2-A1 et PP2-A2 sont retenues dans les cellules compagnes. Il est aussi possible que PP2-A1:CFP ou PP2-A2:YFP interagissent avec les protéines PP2-A1 et PP2-A2 endogènes, interférant avec leur transport des cellules compagnes vers les cellules criblées, et inhibant leur fonction dans les cellules criblées.

3) L'ajout d'un marqueur fluorescent CFP ou YFP pourrait aussi empêcher des modifications post-traductionnelles des PP2. Comme on ne retrouve ni PP2-A1 ni PP2-A2 dans les exsudats de sèves, les protéines doivent être ancrées dans les tubes criblés (Batailler *et al.*, 2012), même si le mécanisme d'ancrage n'est pas connu. Si ces protéines sont modifiées par ajout d'ancres GPI, ce qui semble prédit pour PP2-A1 sur le site internet ARAMEMNON [<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>] alors cette perte de modification post traductionnelle pourrait perturber l'ancrage de PP2-A1 dans les tubes criblés, ce qui pourrait par exemple diminuer les interactions avec leurs partenaires potentiels (Beneteau *et al.*, 2010).

Afin de valider l'une ou l'autre de ces hypothèses, nous avons réalisé des nouveaux croisements entre des lignées surexprimant *PP2-A1* et *PP2-A2*. Dans les croisements réalisés jusqu'à présent, nous n'observons pas de phénotype similaire à celui observé dans les plantes SUR12. Ces croisements suggèrent que la seule modification du ratio de PP2-A1/PP2-A2 n'entraîne pas l'apparition de ce phénotype modifié. Ces conclusions préliminaires sont à confirmer par l'analyse de nouveaux croisements, notamment des croisements où *PP2-A1* et

*PP2-A2* sont exprimés dans les cellules compagnes sans fusion avec des protéines fluorescentes.

Il pourrait également être intéressant de confirmer une interaction entre *PP2-A1* et *PP2-A2* dans les cellules compagnes *in vivo*, par exemple en réalisant des expériences de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC) (Marion *et al.*, 2008).

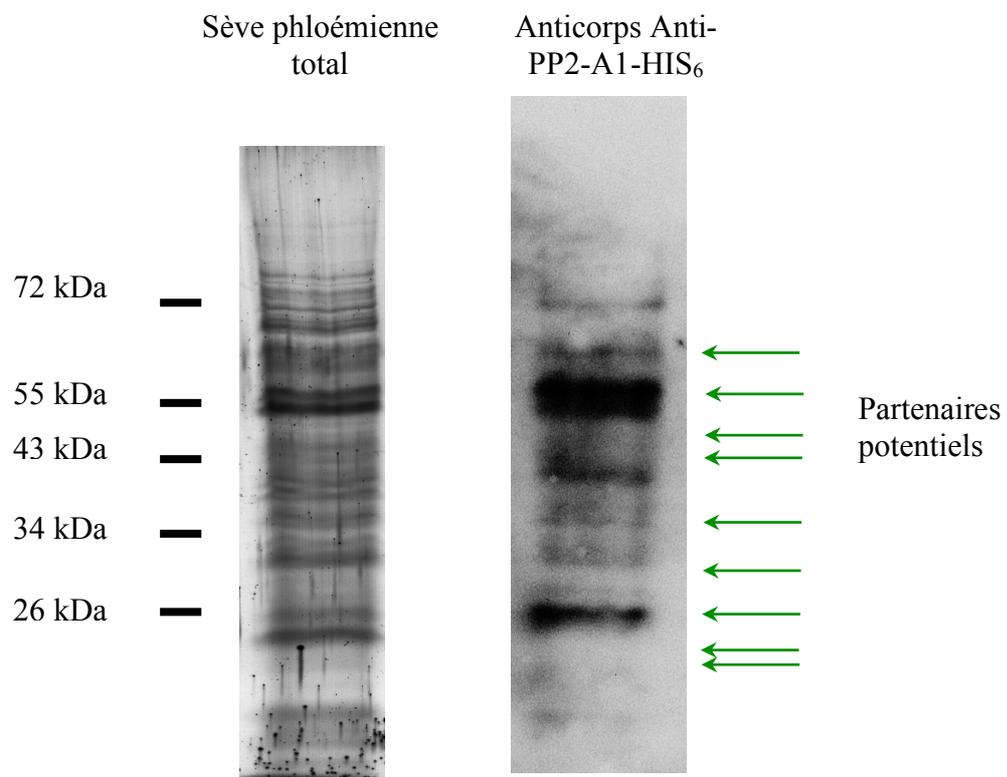
Dans la littérature, il existe très peu de mutants présentant un tel phénotype. Les deux principaux exemples décrits à ce jour portent sur des lignées surexprimant *AINTEGUMENTA* (*ANT*) (Mizukami *et al.*, 2000) et *ARGOS* (Hu *et al.*, 2003). *ARGOS* (*Auxin Regulated Gene controlling Organ Size*) est un gène régulé par l'auxine. Il régule positivement et maintient l'expression d'*ANT* (Hu *et al.*, 2003). Le gène *ANT* code pour un facteur de transcription qui s'exprime dans les cellules de feuilles en division et dans lesquelles il agit sur le cycle cellulaire en contrôlant la durée d'expression de la cycline D3;1. Cette cycline est impliquée dans le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (Mizukami *et al.*, 2000). Les plantes surexprimant *AINTEGUMENTA* possèdent un phénotype très différent des plantes de type sauvage, les plantes sont plus grosses, possèdent des organes floraux plus importants (Krizek *et al.*, 1999), possèdent plus de feuilles, et celles-ci sont plus grandes (Mizukami *et al.*, 2000), sans augmentation de la taille des cellules. Les lignées surexprimant le gène *ARGOS* possèdent également des feuilles et des fleurs plus grandes, mais toujours avec des cellules de même taille que les plantes de type sauvage (Hu *et al.*, 2003). L'augmentation de taille des organes est due à une augmentation du nombre de cellules, résultant d'une activité méristématique accrue résultant d'une activation de la cycline D3 plus importante dans la zone de division. Un modèle pour le mécanisme d'action pour la voie de signalisation *ANT/ARGOS/CYCD3* est présenté sur la Figure 63. Dans ce modèle, l'auxine, ou des macromolécules impliquées dans la signalisation auxinique (protéines, ARN), sont transportés dans les tissus vasculaires, pour réguler l'activité d'*ARGOS*, qui régule à son tour l'activité d'*ANT* dans les feuilles (Wolters & Jurgens., 2009). Or il a été montré que AXR1, protéine impliquée dans la signalisation de l'auxine et elle-même impliquée dans la régulation d'*ARGOS*, est présente dans la sève phloémienne (Lin *et al.*, 2009). D'autre part, en regardant le patron d'expression d'*ARGOS* dans les bases de données [<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>] il apparaît que ce gène est très fortement exprimé dans le métaphloème, en particulier dans les racines. Ces éléments suggèrent une implication du phloème dans cette voie de signalisation.

Les problèmes de discontinuité du système vasculaire, de morphogenèse foliaire ou d'architecture de la hampe florale des mutants RNAi pour *PP2-A1* (Beneteau 2008) suggèrent

aussi des problèmes de signalisation de l'auxine. Bien que les phénotypes soient très différents, l'analyse des croisements entre les lignées exprimant *pSUC2:PP2-A1:CFP* et *pSUC2:PP2-A2:YFP* suggèrent aussi un effet sur une voie de signalisation de l'auxine, qui recrute les protéines ARGOS et AINTEGUMENTA, ARGOS étant régulée par un signal auxinique. L'étude approfondie de l'implication des PP2 dans la voie de signalisation de l'auxine reste encore à réaliser, mais pourrait apporter des éléments intéressants sur la régulation d'un signal hormonal à longue distance dans la plante.

Chez *Cucurbita maxima*, il a également été publié que la protéine CbmPP2 interagit avec de très nombreux ARNm, parmi lesquels les ARNm de facteurs de transcription de réponse à l'auxine, comme les IAA (Ham *et al.*, 2009, données disponibles en matériels supplémentaires). Il est donc possible que les PP2 interviennent dans le transport de ces ARN d'IAA dans le phloème. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions rechercher des interactions de PP2-A1 et PP2-A2 avec des ARNm d'IAA en réalisant des expériences de RIP-ChIP (RNA Binding Protein ImmunoPrecipitation ; Schimtz-LinneWeber *et al.*, 2005), d'autant plus qu'une publication récente a montré que des ARN d'IAA pouvaient être transportés à longue distance (Notaguchi *et al.*, 2012). Ceci pourrait permettre d'établir un lien entre PP2-A1 et la signalisation auxinique à longue distance via le phloème, qui pourrait être suggérée par nos données.

# Chapitre 3



**Figure 64: Recherche des partenaires de PP2-A1 par Far Western Blot**

*Des expériences de Far Western blot ont été réalisées sur des protéines de sève phloémienne, et révélées avec la protéine recombinante PP2-A1-HIS<sub>6</sub>. L'interaction entre PP2-A1 et des partenaires de la sève a été révélée avec des anticorps dirigés contre PP2-A1-HIS<sub>6</sub>. (Anticorps anti-HIS). Cette expérience montre que dans un extrait de sève phloémienne, une dizaine de protéines interagissent potentiellement avec PP2-A1. Image Françoise Vilaine (Beneteau et al., 2010).*

## ***Résultats complémentaires: recherche de partenaires de PP2-A1 et PP2-A2 et production de protéines recombinantes***

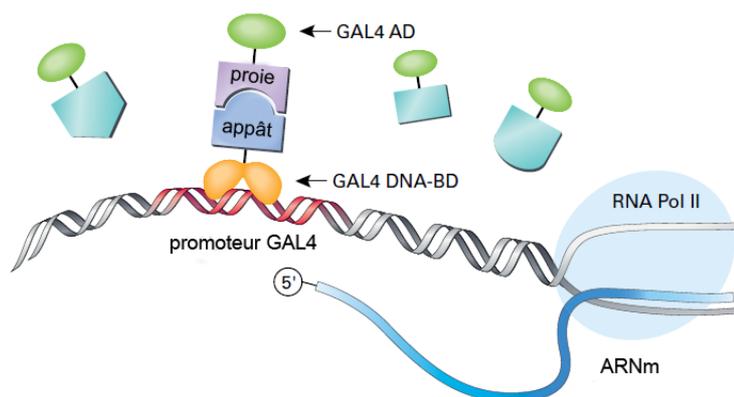
Une de nos hypothèses de travail sur le rôle des protéines PP2 est qu'elles pourraient intervenir dans le shuttling de protéines, notamment depuis les cellules compagnes vers les tubes criblés, facilitant le transport de protéines entre ces cellules. Nous avons voulu déterminer quels étaient les partenaires de PP2-A1 et de PP2-A2, pour étayer l'hypothèse d'un rôle de ces deux protéines dans le transport intra- ou intercellulaire de partenaires protéiques. Des recherches d'interactions entre des ARN et les PP2 ont déjà été réalisées pour les protéines PP2 de melon et de courge (Gomez & Pallás, 2005; Ham *et al.*, 2009), et ont démontré des interactions avec différentes classes d'ARN. En ce qui concerne les partenaires protéiques, peu d'informations sont disponibles.

Il a été décrit chez la courge que CbmPP2, qui est l'une des protéines les plus abondantes de la sève phloémienne, est capable de se dimériser, et de former des liaisons covalentes avec PP1 (Read & Northcote., 1983, Smith *et al.*, 1987). Chez *Arabidopsis* les expériences réalisées *in vitro* avec des protéines recombinantes PP2-A1-HIS<sub>6</sub> et PP2-A2-HIS<sub>6</sub> (Beneteau., 2008 ; Douville., 2010) ont montré que PP2-A1 pouvait s'auto-associer et que PP2-A2 possédait également la capacité de former des oligomères. Des expériences de Far Western blot, réalisées au laboratoire par Françoise Vilaine (Beneteau *et al.*, 2010) ont démontré que PP2-A1 pouvait interagir avec une dizaine de protéines de la sève phloémienne (Figure 64).

### ***I Objectifs***

Nos objectifs sont:

- de trouver des partenaires protéiques de PP2-A1 et de PP2-A2. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de criblage double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, en utilisant une banque d'ADNc spécifique de cellules compagnes. C'est une approche qui présente l'avantage d'être, à priori, facile à mettre en œuvre pour une première recherche de partenaire, les interactions avec des partenaires éventuels devant être vérifiées ultérieurement par une autre méthode, comme par exemple de la Co-immunoprécipitation (co-IP) avec un anticorps spécifique.



**Figure 65: Principe du système double hybride chez la levure**

La protéine appât est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4, et la protéine proie est fusionnée au domaine d'activation de GAL4. La transcription de gènes rapporteurs ne peut se réaliser que lors d'une interaction entre l'appât et la proie. L'expression de ces gènes rapporteurs va permettre aux levures de se développer sur des milieux appauvris en nutriments. (Manuel Clontech, 2009)

**Tableau 11: Marqueurs de sélection utilisés dans le système Gold 'Yeast Two-Hybrid' de Clontech**

Gène	Rôle
<i>AUR1</i>	Résistance à l'auréobasidine A. Ce gène est inactif en l'absence d'interaction protéique. Ce système permet l'élimination du bruit de fond et une réduction significative des faux positifs.
<i>ADE2</i>	Marqueur d'auxotrophie. Permet aux levures de croître sur milieu appauvri en adénine
<i>HIS3</i>	Marqueur d'auxotrophie. Permet aux levures de croître sur milieu appauvri en histidine
<i>MEL1</i>	$\alpha$ -galactosidase. Permet l'identification des clones positifs par des tests blanc-bleu en présence d' $X \alpha$ Gal dans le milieu
<i>TRP1</i>	Marqueur d'auxotrophie. Permet aux levures de croître sur milieu appauvri en tryptophane
<i>LEU2</i>	Marqueur d'auxotrophie. Permet aux levures de croître sur milieu appauvri en leucine

- de produire des domaines particuliers des protéines PP2-A1 et PP2-A2 chez *E. coli*, pour pouvoir disposer de protéines recombinantes pour des études de structure. Des protéines recombinantes entières ont déjà été produites (Beneteau, 2008 ; Douville, 2010) mais les essais de cristallisation ont pour l'instant étaient infructueux. La production de domaines a été choisie car elle peut permettre d'améliorer la solubilité des protéines recombinantes et de résoudre les difficultés de cristallisation des protéines récalcitrantes.

## ***II Recherche de partenaires protéiques de PP2-A1 et PP2-A2***

En collaboration avec Sylvaine Boissinot (équipe ViVe, Transmission des Polérovirus, responsable V. Brault) nous avons réalisé à l'INRA de Colmar des expériences de criblage double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, afin de trouver des partenaires protéiques à PP2-A1 et PP2-A2. Nous avons également réalisé des tests d'association entre PP2-A1 et PP2-A2 et d'auto-association, pour vérifier d'éventuelles homodimérisations.

### **II.1 Clonage de PP2-A1 et PP2-A2 dans les vecteurs de levures**

Le criblage double hybride fonctionne selon le principe appât-proie (Figure 65). Pour le mettre en place nous avons utilisé le système double hybride MATCHMAKER™ Gold 'Yeast Two-Hybrid' de Clontech, qui fonctionne sur la base du système de référence GAL4, avec une souche de levure appropriée (Y2H Gold) et des vecteurs faciles d'utilisation, les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 (cartes en annexe, figures 73 & 74). La protéine GAL4 est un activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme du galactose de la levure, qui possède deux domaines: un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation de la transcription. La protéine-appât est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4, et la protéine-proie est fusionnée au domaine d'activation de la transcription de GAL4. Lors de l'interaction dans le noyau entre la protéine-appât et la protéine-proie, il y a l'activation de 4 promoteurs qui vont déclencher la transcription de 4 gènes rapporteurs: *AURI*, *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* intégrés de manière stable dans le génome de la souche de levure (Tableau 11). Ces gènes rapporteurs permettent à la souche de levure Y2H Gold de se développer sur des milieux appauvris en nutriments comme l'histidine ou l'adénine. Les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 portent aussi comme gènes rapporteurs, respectivement *LEU2* et *TRP1* (Tableau 11). On utilise généralement la protéine dont on recherche des partenaires, par exemple PP2-A1 ou

PP2-A2, comme appât. Comme proies, il existe de nombreuses banques d'ADNc d'*Arabidopsis* utilisables. Nous avons utilisé une banque d'ADNc de cellules compagnes d'*Arabidopsis*, réalisée et disponible à l'INRA de Colmar dans l'équipe ViVe. En effet, comme le phloème est un tissu peu représenté dans la plante, il semblait plus intéressant d'utiliser une banque d'ADNc spécifique des cellules du phloème plutôt qu'une banque d'ADNc générale. Cette banque d'ADNc a été réalisée à partir d'ARNm purifiés de cellules compagnes, isolées par tri cellulaire de plantes exprimant la GFP spécifiquement dans les cellules compagnes, *pSUC2:GFP* (Ivashikina *et al.*, 2003). Les ADNc correspondants ont été clonés dans le vecteur pGADT7 (Clontech), qui possède le site d'activation de la transcription de GAL4, pour que les protéines correspondantes soient produites comme proie dans le système double hybride. Dans la mesure où le clonage des ADNc n'est pas orienté, et l'insertion dans le vecteur ne restitue la phase de lecture que dans 1/3 des cas, nous estimons qu'un sixième seulement des clones de cette banque ont la capacité de coder une protéine.

Pour cette étude, nous disposions également comme proie des vecteurs pGADT7-PP2-A1 et pGADT7-PP2-A2, construits par Sylvaine Boissinot, dans lesquels sont clonées les séquences codantes de *PP2-A1* et *PP2-A2*, ceci afin de rechercher *in vivo* des autoassociations entre ces protéines. Le vecteur pGADT7 possède le gène *LEU2*, qui permet aux levures de croître sur un milieu appauvri en leucine. Il possède les origines de répllication pUC et 2 $\mu$  ori pour pouvoir se répliquer dans *E. coli* et *S. cerevisiae*. Pour la sélection en bactéries, ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline. Pour s'assurer que les protéines vont être localisées dans le noyau, une séquence NLS (signal de localisation nucléaire) a été clonée en amont de la séquence GAL4 AD.

Comme appât, j'ai cloné *PP2-A1* et *PP2-A2* dans les vecteurs de levure pGBKT7 (Clontech) permettant la fusion de la protéine d'intérêt au site de liaison à l'ADN de GAL4. Ce vecteur possède le gène *TRP1*, qui permet aux levures de croître sur un milieu appauvri en tryptophane. Il possède les origines de répllication pUC et 2 $\mu$  ori, ce qui lui permet de se répliquer respectivement dans *E. coli* et *S. cerevisiae*, et ainsi de le manipuler dans *E. coli* pour réaliser les clonages, et dans *S. cerevisiae* pour réaliser le criblage double hybride. Pour la sélection en bactéries, ce plasmide possède le gène de résistance à la kanamycine.

Ce clonage a été réalisé en utilisant les fragments d'ADNc présents dans les vecteurs pGAD-PP2-A1 et pGAD-PP2-A2 et contenant la séquence codante de *PP2-A1* et *PP2-A2*. Pour *PP2-A1*, le plasmide pGAD-PP2-A1 a été digéré par *NdeI* et *EcoRI*. Le vecteur

pGBKT7 a subi une digestion enzymatique aux sites *NdeI* et *EcoRI* puis une déphosphorylation et la séquence codante de *PP2-A1* a été clonée dans le vecteur pGBKT7 par ligation. Pour *PP2-A2*, le plasmide pGAD-*PP2-A2* a été digéré par *NdeI* et *BamHI*. Le vecteur pGBKT7 a subi une digestion enzymatique aux sites *NdeI* et *BamHI* puis une déphosphorylation, et la séquence codante de *PP2-A2* a été clonée dans le vecteur pGBKT7. Dans les deux cas, nous nous sommes assurés par séquençage que la séquence codante de *PP2-A1* et de *PP2-A2* était bien insérée dans le vecteur en phase avec la séquence codante du domaine d'activation de GAL4. Ces clonages ont été réalisés dans la souche bactérienne DH10B, de génotype: F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL  $\Delta$ lacX74  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 araD139  $\Delta$ (ara,leu)7697 mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\lambda$ -. Les transformations ont été réalisées par électroporation: 5 $\mu$ L de bactéries DH10B électrocompétentes (InVitrogen) ont été dilués dans 35 $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O, auxquels ont été ajoutés 1  $\mu$ L de plasmide (500ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>). L'électroporation a été réalisée à 1.8 kV. Les bactéries ont été reprises dans 900mL de milieu LB, puis mises à 37°C sous agitation pendant 1h, avant d'être étalées sur un milieu LB contenant l'antibiotique de sélection (Kanamycine 50mg.L<sup>-1</sup> pour le pGBKT7, Ampicilline 100mg.L<sup>-1</sup> pour pGAD).

## II.2 Réalisation du criblage double hybride

La souche de *S. cerevisiae* Y2H Gold (Clontech) de génotype MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-Gal1<sub>TATA</sub>-His3, GAL2<sub>UAS</sub>-Gal2<sub>TATA</sub>-Ade2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-Mel1<sub>TATA</sub> AUR1-C MEL1, a été utilisée pour réaliser le criblage double hybride (Manuel d'utilisation du système Matchmaker<sup>TM</sup> Gold Y2H)

La sélection des clones de levure se fait suivant les cas sur des milieux sans Adénine, Histidine, Tryptophane et Leucine. Le milieu de base correspond à un milieu SD Base (Selective Dropout), supplémenté en éléments nutritifs essentiels requis. Ainsi:

- Un milieu SD-L contient tous les éléments nécessaires pour la culture de la levure sauf la leucine, que la levure doit produire pour croître (besoin de la présence du vecteur pGADT7),
- Un milieu SD-T contient tous les éléments nécessaires pour la culture de la levure sauf le tryptophane, que la levure doit produire pour croître (besoin de la présence du vecteur pGBKT7),

**Tableau 12: Bilan des tests double hybride pour rechercher des partenaires de PP2-A1 et PP2-A2**

<b>Proie utilisée</b>	<b>Appât utilisé</b>	<b>Souche</b>	<b>Milieu de sélection</b>	<b>Nombre de clones</b>
ADNc CC	PP2-A1	Y2Hgold	SD-AHTL	Aucun.
ADNc CC	PP2-A2	Y2Hgold	SD-AHTL	Aucun
PP2-A1	PP2-A1	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	3 (max pour le test)
PP2-A2	PP2-A1	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	Aucun
PP2-A2	PP2-A2	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	Aucun
PP2-A1	PP2-A2	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	Aucun
Vecteur vide	PP2-A1	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	Aucun
Vecteur vide	PP2-A2	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	Aucun
PP2-A1	Vecteur vide	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	Aucun
PP2-A2	Vecteur vide	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	Aucun
pGADT7T	pGBKT7p53	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	3 (max pour le test)
pGADlam	pGBKT7p53	Y2Hgold	SD-AHTL+Aur A	3 (max pour le test)

- Un milieu SD-TL contient tous les éléments nécessaires pour la culture de la levure sauf la leucine et le tryptophane, que la levure doit produire pour croître (besoin de la présence des vecteurs pGBKT7 et pGADT7),

- Un milieu SD-HTL contient tous les éléments nécessaires pour la culture de la levure sauf la leucine, le tryptophane et l'histidine, que la levure devra produire pour croître (besoin de la présence des vecteurs pGBKT7 et pGADT7, et activation du promoteur *GAL4* pour la synthèse du gène rapporteur *HIS3*),

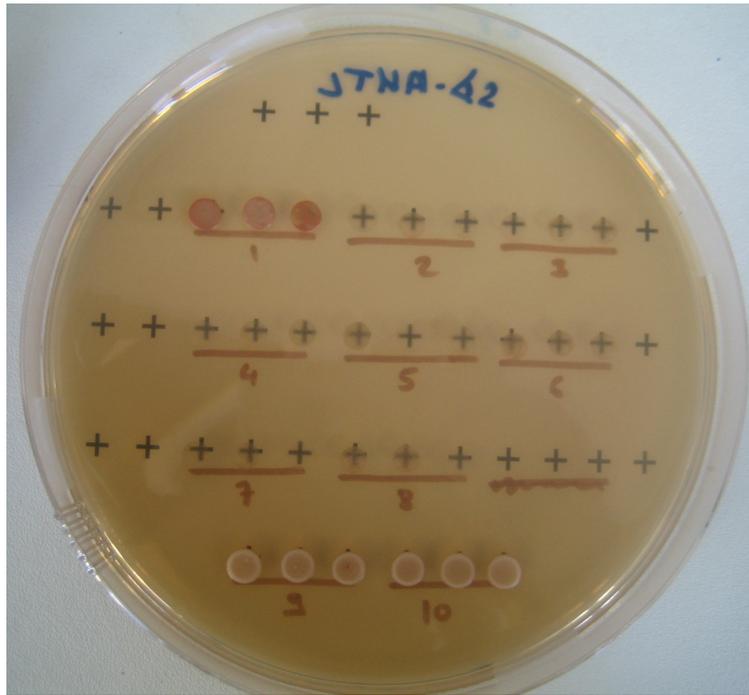
- Un milieu SD-AHTL contient tous les éléments nécessaires pour la culture de la levure sauf la leucine, le tryptophane, l'histidine et l'adénine, que la levure doit produire pour croître (besoin de la présence des vecteurs pGBKT7 et pGADT7 et activation du promoteur *GAL4* pour la synthèse des gènes rapporteurs *HIS3* et *ADE2*),

- Un milieu SD-AHTL+auréobasidine A contient tous les éléments nécessaires pour la culture de la levure sauf la leucine, le tryptophane, l'histidine et l'adénine, que la levure doit produire pour croître (besoin de la présence des vecteurs pGBKT7 et pGADT7 et activation du promoteur *GAL4* pour la synthèse des gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2* et *AURI*).

La culture de levure se fait en milieu liquide YPD. C'est un milieu nutritif riche, qui permet la culture des souches de levure. Pour le criblage double hybride, les levures préalablement transformées avec le vecteur pGBKT7-PP2-A1 ou pGBKT7-PP2-A2, pour l'expression comme appât de PP2-A1 ou PP2-A2, sont mises à pousser dans le milieu YPD à 28°C jusqu'à atteindre une DO comprise entre 0,3 et 0,4 (environ 4h).

Le protocole utilisé a été mis au point par Sylvaine Boissinot, dans l'équipe ViVe à l'INRA de Colmar.

La transformation avec le vecteur proie contenant la banque d'ADNc de cellules compagnes se fait par choc thermique en présence de PEG et d'acétate de lithium. Les levures transformées sont mises à décanter la nuit à 4°C, puis sont étalées sur milieu solide SD-AHTL, avant d'être mises à incubées à 28°C pendant 5 jours. Seules les levures dans lesquelles il y a activation du promoteur *GAL4* via l'interaction entre l'appât (PP2-A1 ou PP2-A2) et une proie (une protéine partenaire) peuvent croître, suite à l'activation des gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2* et *AURI*.



**Figure 66: Résultats des tests d'auto-association de PP2-A1 et PP2-A2.**

1: Cotransformation avec PP2-A1/PP2-A1. 2: Cotransformation avec PP2-A1/PP2-A2. 3: Cotransformation avec PP2-A1/pGKT7. Cotransformation avec 4: PP2-A2/PP2-A1. 5: Cotransformation avec PP2-A2/PP2-A2. 6: Cotransformation avec PP2-A2/pGKT7. 7: Cotransformation avec pGADT7/PP2-A1. 8: Cotransformation avec pGADT7/PP2-A2. 9: Cotransformation avec pGADT7T/pGBKp53. 10: Cotransformation avec pGADlam/pGBKp53. 3,6,7,8 sont les contrôles négatifs, 9 et 10 sont les contrôles positifs. pGADT7T est un plasmide PDADT7 contenant l'ADNc de l'antigène SV40, utilisé comme contrôle positif. pGBKp53 contient la protéine p53, utilisé comme contrôle positif. pGADlam est également un vecteur servant de contrôle positif. pGBKT7 et PGADT7 sont des vecteurs vides, utilisés comme contrôle négatif lors des tests 3, 6, 7 et 8. Seule l'interaction PP2-A1/PP2-A1 donne un résultat positif.

Avant de réaliser le criblage double hybride, nous nous sommes assurés que les protéines appâts et proies seules ne déclenchaient pas d'auto-activation, c'est-à-dire ne permettaient pas d'induire, en l'absence d'interaction protéine-protéine, l'expression des gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2* et *AURI*, ce qui se produit notamment quand les protéines possèdent des sites d'interaction à l'ADN. Les levures ont donc été transformées avec l'un ou l'autre des vecteurs permettant l'expression des protéines PP2 comme appât ou comme proie. Dans cette expérience, aucun vecteur n'a permis aux levures transformées de croître sur le milieu le plus sélectif (SD – AHTL), permettant de vérifier l'absence d'auto-activation du système. Nous avons ensuite réalisé le criblage en utilisant le milieu de sélection SD-AHTL.

Nous avons réalisé 2 criblages double hybride, en utilisant comme appât soit *PP2-A1* soit *PP2-A2* clonés dans le vecteur pGBKT7. Comme proie, nous avons utilisé la banque d'ADNc de cellules compagnes clonée dans le vecteur pGDADT7. Pour ce criblage 250 µg de vecteur appât ont été utilisés.

Pour vérifier si le criblage double hybride avait fonctionné, nous avons estimé le nombre de transformants. Pour cela nous avons prélevé un aliquot de nos levures transformées, et nous avons réalisé des dilutions successives, puis nous avons mis en culture ces dilutions sur le milieu SD-TL, sur lequel seules les levures possédant les deux vecteurs peuvent croître (présence des gènes *TRP1* et *LEU2*).

Pour chaque construction le nombre de doubles transformants a été estimé à environ 500 000. Tous les transformants ont été étalés, et cultivés à 30°C pendant 6 jours. Dans ces conditions nous n'avons obtenu aucune colonie sur milieu sélectif SD-AHTL (Tableau 12). Cette méthode ne nous a donc pas permis de trouver de partenaires pour PP2-A1 ou PP2-A2.

Plusieurs causes sont possibles:

- La transformation n'a pas fonctionné. Cette hypothèse est exclue puisque nous avons vérifié que les deux vecteurs étaient bien présents dans les levures.
- Il n'y a pas de partenaires dans la banque d'ADNc. Or nos tests de dilution ont montré que 500 000 transformants avaient été étalés sur boîtes.
- Le repliement des protéines appât se fait mal, et les protéines PP2-A1 ou PP2-A2 ne sont pas fonctionnelles en ce qui concerne l'interaction avec des partenaires.
- Une autre possibilité est que PP2-A1 et PP2-A2 s'auto-assemblent dans la levure.

Cette dernière hypothèse nous semble plausible puisqu'il a déjà été montré *in vitro* l'autoassociation de PP2-A1 et PP2-A2 avec des protéines recombinantes, par Julie Beneteau (Beneteau, 2008). En effet, si des oligomères de PP2-A1 ou de PP2-A2 se forment, les interactions avec d'éventuels partenaires ne pourront plus se faire, donnant donc un résultat de type faux négatif. Pour tester cette hypothèse, nous avons donc réalisé avec PP2-A1 et si PP2-A2 des tests d'auto-association *in vivo* dans la levure.

### **II.3 Réalisation des tests d'auto-association de PP2-A1 et PP2-A2**

Nous avons réalisé des tests d'auto-association entre:

- PP2-A1 comme appât et proie
- PP2-A2 comme appât et proie
- PP2-A1 appât et PP2-A2 proie
- PP2-A2 appât et PP2-A1 proie

La souche de levure Y2HGold a été co-transformée simultanément avec les deux vecteurs. Les résultats présentés sur la Figure 66 montrent que par cette technique nous pouvons confirmer l'auto-association de PP2-A1 (colonies poussant en rouge). En revanche nous n'avons pas observé de colonies pour les autres tests d'association, suggérant qu'il n'y a pas d'interactions dans ces conditions entre PP2-A1 et PP2-A2, et pas d'auto-association de PP2-A2. Cette différence de comportement est étonnante car PP2-A2 est assez similaire à PP2-A1, elle possède 66% d'homologie de séquence avec PP2-A1. Il est donc possible que PP2-A2 ne soit pas traduite correctement dans ce système, cependant le séquençage des vecteurs nous a permis de confirmer que la séquence codante était correcte.

Nous avons aussi vérifié l'auto-association de PP2-A1 en se plaçant dans les conditions du criblage double hybride avec la bande d'ADNc, qui diffèrent des conditions d'auto-association, puisque que les vecteurs appâts et proie sont ajoutés en deux temps. La souche de levure est d'abord transformée avec le vecteur appât, ce qui permet à la protéine de fusion GAL4BD-PP2 d'être traduite et transportée dans le noyau. Puis cette souche est à nouveau transformée avec le vecteur proie, permettant à la protéine de fusion GAL4AD-protéine d'être produite puis transportée dans le noyau dans lequel elle pourra interagir avec GAL4BD-PP2. Nous avons donc réalisé successivement deux transformations, la première avec PP2-A1 comme appât, et la seconde avec PP2-A1 comme proie. Dans ces conditions, nous n'avons pas vu de colonies apparaître sur le milieu le plus sélectif, alors que les

contrôles ou un aliquot de la transformation mises en culture sur un milieu SD-TL montrent bien qu'il y a des levures qui ont incorporé le deuxième plasmide (contrôle sur milieu sélectif). Nous en déduisons que l'auto-association de PP2-A1 est un évènement très précoce, qui doit conduire à la formation d'oligomères stables, empêchant l'interaction secondaire avec de nouvelles protéines en système hétérologue, et que dans les conditions de criblage double hybride habituelles il n'est donc pas possible de trouver des partenaires.

## II.4 Conclusion

L'approche double hybride n'a pas permis d'identifier des partenaires de PP2-A1 ou de PP2-A2 en utilisant comme proie des protéines représentant une population d'ADNc de cellule compagne. Ces résultats nous ont tout d'abord surpris car nous nous attendions à mettre au moins en évidence leurs associations avec elles-mêmes, notamment dans le cas de PP2-A1, cette protéine étant capable de dimérisation. Puisque *PP2-A1* est un des gènes les plus transcrits dans les cellules compagnes (Mustroph *et al.*, 2009), nous nous attendions en effet à ce que la séquence de *PP2-A1* soit représentée dans cette banque. Or les tests d'auto-association, simultanés, montrent que la polymérisation de PP2-A1 est très forte et très rapide et que dans ce système il n'est pas possible de trouver de partenaires. Dans le cas de la transformation en deux étapes, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'auto-assemblage de PP2-A1, ce qui suggère que l'auto-association est trop rapide pour que l'appât reste disponible pour une interaction avec les proies. Toutefois, la présence de PP2-A1 dans la banque d'ADNc n'a pas été testée en amont de la réalisation du criblage double hybride.

Pour PP2-A2, nous n'avons pas vu d'interaction dans aucune des conditions, ce qui pourrait indiquer que la protéine est soit mal repliée lors de sa synthèse, ou qu'elle n'interagisse pas avec elle-même *in vivo*.

Le résultat intéressant de ce travail est cependant que grâce aux tests d'association chez la levure nous avons confirmé la très forte auto-association *in vivo* de PP2-A1 dans un système hétérologue, ce qui corrobore les résultats obtenus *in vitro* avec des protéines PP2-A1-HIS<sub>6</sub> recombinantes dans l'équipe de Denis Renard, à l'INRA de Nantes (Beneteau, 2008 et Douville, 2010).



### ***III Production de protéines PP2-A1 et PP2-A2 tronquées recombinantes***

Les expériences menées *in vitro* sur PP2-A1 et PP2-A2 sur des protéines recombinantes ont montré que ces protéines forment des oligomères (Beneteau, 2008; Douville 2010). En regardant les homologies de séquences avec les banques de données de protéines, nous observons un domaine relativement conservé dans la partie centrale et C-terminale des protéines PP2, présentant des homologies avec des domaines de fixation aux sucres, de type CBM (Carbohydrate Binding Module) (Beneteau *et al.*, 2010). Par analogie avec les CBM déjà cristallisés (Beneteau *et al.*, 2010), il a été proposé que ce domaine puisse aussi intervenir dans l'oligomérisation des PP2. Pour analyser la structure de ces protéines, des expériences de diffusion de la lumière aux petits angles – ou SAXS (« Small-angle X-ray scattering ») - ainsi que des tentatives de cristallisation des protéines recombinantes PP2-A1-HIS<sub>6</sub> et PP2-A2-HIS<sub>6</sub> ont été réalisées en collaboration avec les équipes de Denis Renard (Laboratoire BIA, INRA de Nantes) et de Pierre Briozzo (IJPB, INRA de Versailles). A ce jour, aucune de ces expériences n'a permis de résoudre la structure de ces PP2, ce qui pourrait résulter des problèmes de solubilité de ces protéines *in vitro*, mais également de la propension de PP2-A1 de former des oligomères de tailles différentes en solution. Une stratégie alternative pour l'étude de la structure de protéines peu solubles est de tenter de cristalliser des domaines de cette protéine

Les prédictions de structure des PP2 montrent une organisation en différents domaines ; les domaines central et C-terminale sont organisés en feuillets  $\beta$ , pouvant constituer le domaine CBM et lectine, et le domaine de fixation aux ARN prédit dans la région N-terminale (Beneteau *et al.*, 2010), qui est prédit comme peu structuré. Pour caractériser la structure de ces différents domaines, nous avons décidé de produire chez *E. coli* des protéines recombinantes tronquées et de les purifier, dans la perspective de mener des analyses structurales par SAXS ou par cristallographie (collaboration avec Denis Renard, unité BIA INRA de Nantes et Pierre Briozzo, IJPB, INRA de Versailles). Dans ce projet de collaboration, j'ai pris en charge la construction des vecteurs, et nos collaborateurs ont accepté de prendre en charge la production et la purification de protéines recombinantes et les analyses structurales, si les protéines produites sont solubles et peuvent cristalliser.



L'objectif est de réaliser les constructions pour l'expression chez *E. coli* de protéines PP2-A1 et PP2-A2 dont les extensions N-terminales ont été supprimées, afin:

- 1) de déterminer si l'expression de protéines tronquées améliore leur solubilité
- 2) de faire des essais de cristallisation et des analyses de diffusion de la lumière sur des protéines en solution,
- 3) de déterminer si les domaines central et C-terminal sont responsables de l'oligomérisation des protéines PP2.

### **III.1 Clonage des formes tronquées de PP2-A1 et PP2-A2**

J'ai réalisé des constructions correspondant à des versions tronquées de PP2-A1 (Figure 67) et PP2-A2 (Figure 68) dans un vecteur d'expression pET-9a modifié (Novagen), qui permet la production de protéines recombinantes chez *E. coli* (Voir carte en Annexe).

Dans le vecteur pET-9a la cassette d'expression est inductible à l'IPTG, ce qui permet en absence d'IPTG de bloquer la production de protéine recombinante, qui n'est induite que lorsque les bactéries se sont suffisamment répliquées dans le milieu de culture. Ce système est particulièrement intéressant dans le cas où l'expression des protéines recombinantes est toxique pour les bactéries.

Pour PP2-A1, la protéine tronquée est dépourvue de l'extrémité N-terminale et correspond à une protéine de 120 acides aminés au lieu de 234. Pour PP2-A2, la protéine tronquée est dépourvue également de son extrémité N-terminale et correspond à une protéine de 111 acides aminés au lieu de 143. A la fin de chaque séquence protéique tronquée nous avons rajouté à son extrémité C-terminale une étiquette de 6 histidines, pour permettre la purification des protéines recombinantes, après production dans *E. coli*, sur une colonne d'affinité de Nickel. Nous avons également rajouté une méthionine au début de chaque séquence tronquée pour permettre l'initiation de la traduction. Le vecteur utilisé est un dérivé de pET-9a, modifié, par l'ajout d'un site de restriction *NotI*. J'ai amplifié par PCR la séquence codante de *PP2-A1* et de *PP2-A2* à partir de plasmides existants au laboratoire, respectivement pET9-PP2-A1 et pET9-PP2-A2 (Beneteau, 2008), en utilisant les amorces décrites dans le Tableau 13. L'amplification par PCR introduit les sites de restriction *NdeI* en 5' et *NotI* en 3', pour orienter le clonage dans le vecteur pET-9a modifié.

Les fragments ont été d'abord clonés dans des vecteurs pCR II TOPO (© InVitrogen ; voir Annexe), avant de réaliser les digestions enzymatiques par *NdeI* et *NotI*. Les clones ont

**Tableau 13: Description des amorces utilisées pour réaliser les clonages de protéines tronquées**

Oligonucléotide	Séquence
A1tron + pET9	5'-GCC <b>CATATG</b> GCTGTGGGATTGAAAAACGTTTG-3'
A2tron + pET9	5'-GCC <b>CATATG</b> GTTGCAAAGATGGAACGAG-3'
PP2tron – pET9	5'-GAA <b>GCGGCCGCT</b> CAGTGGTGGTGGTGGTG-3'
A1 N-terminale FW pGEX	5'-GAC <b>CCCGGG</b> ATGTTTAGAAACCAAGAC-3'
A1 N-terminale RV pGEX	5'-GAC <b>CCCGGG</b> TTACGTGATGTCGAGCCAAC-3'
A1 C-terminale FW pGEX	5'-GAC <b>CCCGGG</b> ATGGCTGTGGGATTGAAAAAC-3'
A1 C-terminale RV pGEX	5'-GAC <b>CCCGGG</b> TTACTGTTTGGGACGAATTGC-3'

*En rouge: les sites de restrictions utilisés pour réaliser les clonages des séquences codantes en système bactérien.*

**Tableau 14: Plasmides disponibles pour la production de protéines recombinantes PP2-A1 et PP2-A2 chez *E. coli***

Plasmide	Références	Résistance	Promoteur*	Etiquette
pET9-PP2-A1	Beneteau, 2008 Douville, 2010	Kanamycine	Promoteur T7	HIS <sub>6</sub>
pET9-PP2-A2	Beneteau, 2008 Douville, 2010	Kanamycine	Promoteur T7	HIS <sub>6</sub>
pET9-PP2-A1tron	ce travail	Kanamycine	Promoteur T7	HIS <sub>6</sub>
pET9-PP2-A2tron	ce travail	Kanamycine	Promoteur T7	HIS <sub>6</sub>
pGEX-PP2-A1C-term	ce travail	Ampicilline	Promoteur tac	GST
pGEX-PP2-A1N-term	ce travail	Ampicilline	Promoteur tac	GST

été vérifiés à ce stade par séquençage. Après digestion enzymatique de vecteur pET-9a modifié et des inserts par *NdeI* et *NotI*, nous avons réalisé une ligation, pour la production des vecteurs d'expression pET9-PP2-A1tron et pET9-PP2-A2tron.

Toutes ces étapes ont été réalisées dans la souche de bactérie de *E. coli* DH10B, de génotype F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL  $\Delta$ lacX74  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 araD139  $\Delta$ (ara,leu)7697 mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\lambda$ -.

Pour la production de protéines recombinantes avec ces vecteurs (Tableau 14), les vecteurs d'expression ont été introduits dans la souche TUNER (EMD Millipore), de génotype F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lacY1, utilisée par Julie Beneteau (Beneteau., 2008). Cette souche avait permis la production des formes non tronquées de PP2-A1 et PP2-A2 chez *E. coli* avec de bons rendements, de l'ordre de 100mg.L<sup>-1</sup>.

Pour tenter de résoudre les problèmes de solubilité précédemment observés avec les protéines recombinantes PP2, j'ai également réalisé pour PP2-A1 deux constructions dans un vecteur de type pGEX permettant de créer des protéines tronquées fusionnées à la GST (Glutathion S Transférase), la GST permettant de solubiliser les protéines (Smith & Johnson., 1988). Pour de telles protéines de fusion, les purifications se font sur une colonne d'affinité Glutathion-Sepharose. Dans ce cas, la stratégie de clonage a été un peu différente de celle utilisée dans les vecteurs pET9a. L'une des constructions réalisées porte la première moitié N-terminale de la protéine, qui correspond à une protéine de 127 acides aminés (14.59 kDa), alors que la seconde porte la seconde moitié – centrale et C-terminale – avec 119 acides aminés (13.38 kDa). Le vecteur utilisé pour la production de protéines tronquées avec GST est le vecteur pGEX 3X (GE Healthcare, Life Science, voir annexe). Pour cloner les séquences codantes tronquées de PP2-A1, les séquences ont été amplifiées en ajoutant un site *SmaI* aux extrémités 3' et 5', le vecteur pGEX 3X possédant également un site de restriction *SmaI*. Les séquences tronquées de *PP2-A1* ont dans un premier temps été clonées dans pCR II TOPO (© Invitrogen), puis digérées par *SmaI*. Le vecteur pGEX 3X a été également digéré par cette enzyme, puis déphosphorylé. Après ligation, le séquençage de plusieurs clones a été nécessaire pour identifier pour chaque construction au moins un clone portant la séquence codante clonée dans le bon sens de lecture. Les vecteurs pGEX créés ont ensuite été introduits par électroporation dans la souche bactérienne TUNER et utilisés pour la production de protéines recombinantes.

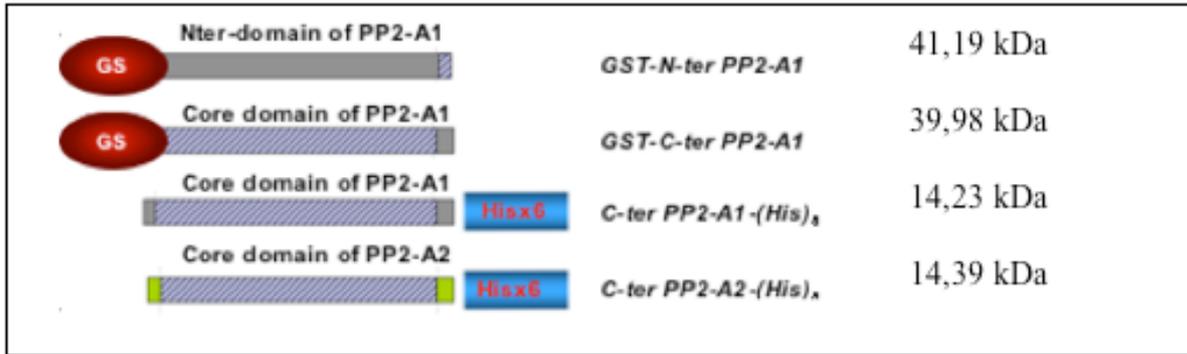


Figure 69 : Schéma récapitulatif présentant les différentes protéines recombinantes réalisées

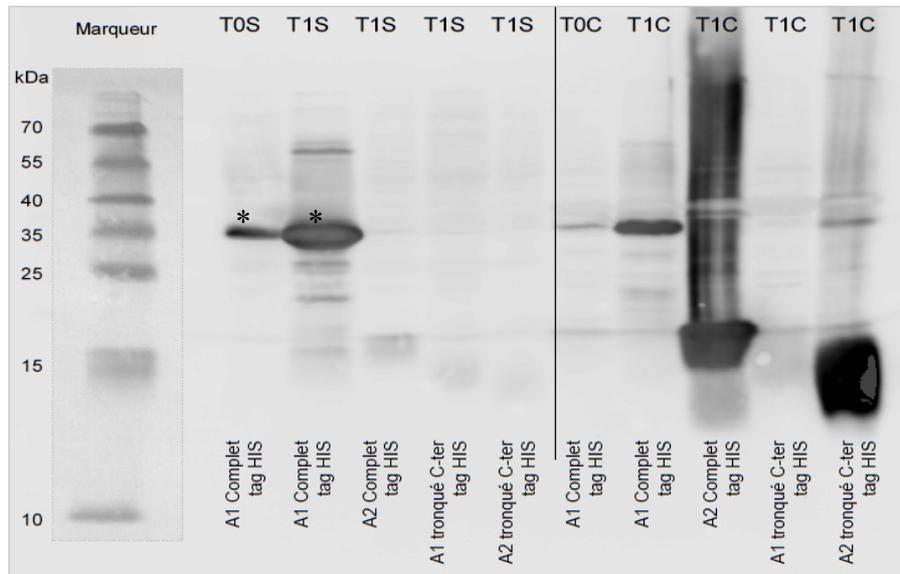


Figure 70: Résultats de production des formes tronquées de PP2-A1 et PP2-A2 avec un tag histidine

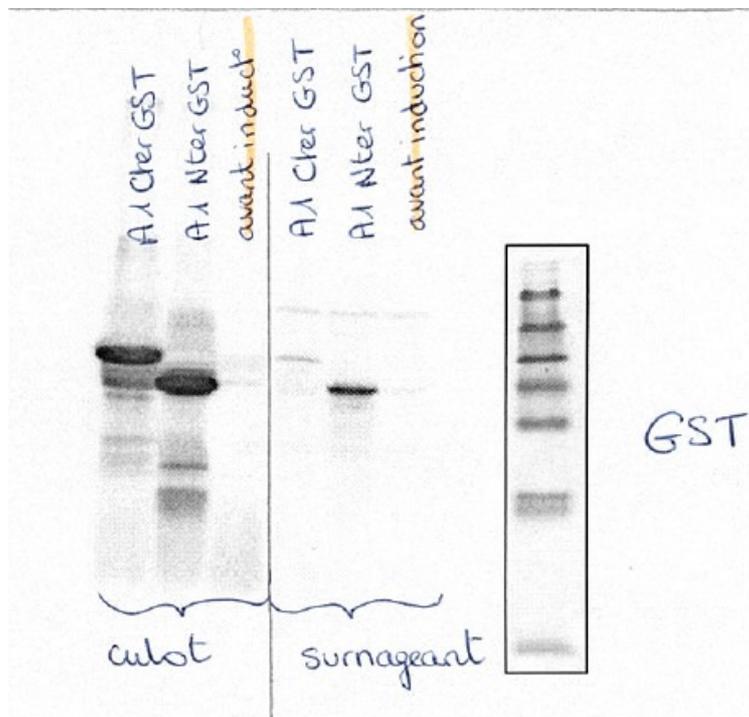
Sur ce Western blot, on voit que PP2-A1-HIS<sub>6</sub> se retrouve bien dans la phase soluble (S), alors que PP2-A2-HIS<sub>6</sub> est elle beaucoup moins soluble. La forme tronquée de PP2-A2-His<sub>6</sub> est principalement dans la fraction insoluble (culot). La forme tronquée de PP2-A1-His<sub>6</sub> est présente dans les fractions solubles et insolubles (culot), mais en très faible quantité). Le temps T0 correspond à un prélèvement avant induction, le temps T1 correspond à un prélèvement à la fin de l'induction. Anticorps utilisé: anticorps anti Histidine. (S): soluble, (C): culot. \*: protéine recombinante Photo Emilie Perrin, INRA de Nantes

### **III.2 Production de protéines recombinantes**

Les tests de production ont été réalisés par Emilie Perrin et Véronique Sole à l'INRA de Nantes, dans l'équipe de Denis Renard. Les bactéries ont été mises en culture à 20°C pendant 16h. L'induction à l'IPTG a été réalisée pendant 3h à 37°C. Le tampon d'extraction utilisé est le suivant: Tris 50mM pH8 NaCl 200mM Triton X-100 0,1%, suivi d'une lyse par choc thermique (alternance bain d'azote liquide / bain à 37°C). Après la lyse, un traitement à la DNase et à la RNase a été effectué, et la fraction soluble séparée du culot par centrifugation. Les culots sont aussi resuspendus dans le tampon d'extraction en présence d'urée 6M avant dépôt sur gel SDS-PAGE. La production de PP2-A1 et de PP2-A2 de pleine longueur (vecteurs créés par Julie Beneteau) et sous forme tronquées a montré qu'on retrouvait majoritairement PP2-A1 dans la fraction soluble, alors que PP2-A2 ou sa formes tronquée sont retrouvées dans le culot (fraction insoluble) (Figure 69). De même, on retrouve dans la fraction soluble une faible quantité des formes tronquées de PP2-A1-GST (Figure 70).

### **III.3 Conclusion**

Les constructions que nous avons réalisées semblent fonctionnelles puisqu'elles permettent bien de produire des protéines recombinantes chez *E. coli*. Seules les constructions pour l'expression de PP2-A1 complète et ses versions tronquées fusionnées avec la GST apparaissent solubles; toutes les autres versions tronquées ainsi que toutes les constructions pour l'expression de PP2-A2 ne sont pas solubles. Des essais de solubilisation supplémentaires avec différents tampons de lyse, avec ou sans sel, et à différents pH (8 et 3) ont été réalisés à Nantes, en réalisant la culture bactérienne à 20°C. Concernant la production de la protéine PP2-A2, la forme complète ainsi que la forme tronquée ont toujours été retrouvées dans la fraction insoluble. Par contre, un tampon de lyse à pH 3 en présence de NaCl a permis de retrouver la forme complète de A2 dans la fraction soluble. Pour PP2-A1, la production à 20°C n'a pas permis d'améliorer la solubilité de la protéine. Ces résultats sont cependant très encourageants et incitent à réaliser de nouveaux tests des conditions d'extraction de ces protéines et de tenter la purification sur colonne d'affinité.



**Figure 71: Production en système hétérologue de PP2-A1 tronquée fusionnée à la GST**

Sur ce Western blot, on voit qu'une faible proportion de PP2-A1 tronquée se retrouve dans la fraction soluble (Surnageant) par rapport à la fraction insoluble (Culot). Anticorps utilisé: anticorps anti GST. Echelle: 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70 kDa Photo Emilie Perrin, INRA de Nantes

## ***IV Discussion***

Il existe peu d'informations dans la littérature concernant les partenaires protéiques des protéines PP2. En utilisant le système du double hybride dans la levure, nous avons cherché à identifier des partenaires protéiques de PP2-A1 et de PP2-A2. Lors de ces expériences, nous avons observé que PP2-A1 pouvait s'auto-associer *in vivo* dans un système hétérologue. Néanmoins cette étude ne nous a pas permis d'identifier des partenaires protéiques. Au vu de la forte auto-association de PP2-A1, il est possible que le système de criblage double hybride ne soit pas le meilleur pour identifier des partenaires protéiques. En effet, les tests que nous avons réalisés montrent que PP2-A1 est capable d'activer le rapporteur GAL4 en cas d'auto-association, mais uniquement dans des conditions de co-transformations, et non pas dans les conditions d'un criblage d'une banque d'ADNc par double hybride. Si nous voulons poursuivre la recherche des partenaires par la technique du double hybride, nous pourrions par exemple tenter une approche différente, en utilisant non pas les protéines entières PP2-A1 et PP2-A2, mais des domaines particuliers de ces protéines, comme par exemple le domaine N-terminale de PP2-A1.

Cependant d'autres techniques existent pour identifier des partenaires, et pourraient être adaptées pour PP2-A1 et PP2-A2. Par exemple la technique de Far Western Blot, qui a permis de démontrer des interactions entre PP2-A1 et des protéines de sève (Beneteau *et al.*, 2010) pourrait être utilisée. Il serait possible de refaire à nouveau cette expérience de Far Western Blot sur un gel 2D, et d'isoler les bandes correspondant aux protéines interagissant avec PP2-A1, puis de les analyser par spectrométrie de masse. La vérification de l'interaction pourrait alors se réaliser en Complémentation Bimoléculaire de Fluorescence (BiFC) *in vivo* directement chez *Arabidopsis*. Il existe un protocole de transformation d'épiderme de cotylédon permettant de vérifier ce type d'interaction directement chez *Arabidopsis* (Marion *et al.*, 2008).

Dans la littérature, on trouve des exemples d'interaction entre les PP2 et des ARN (Gómez *et al.*, 2005 ; Ham *et al.*, 2009). Il existe un seul cas décrit, celui de la protéine NICTABA qui est une lectine que l'on retrouve spécifiquement chez le tabac. A la différence des PP2, c'est une lectine très peu présente dans la plante, et induite en présence de jasmonate (Lannoo *et al.*, 2007), dans les cellules d'épiderme et de mésophylle. Cette lectine reconnaît aussi les motifs sucres comme le N-Acétyl-Glucosamine, et il a été montré qu'elle présentait

une localisation nucléocytoplasmique (Lannoo *et al.*, 2006), comme nous l'avons établi pour PP2-A1. Des expériences de « pull down » réalisées récemment chez le tabac ont montré que cette protéine pouvait interagir avec des histones (Schouppe *et al.*, 2011). C'est le seul exemple connu décrivant des partenaires protéiques pour une lectine appartenant à la famille des PP2. Des expériences de pull-down pourraient donc également être tentées pour PP2-A1 et PP2-A2. Si comme dans le cas de NICTABA, PP2-A1 interagissait avec des protéines nucléaires, cela étayerait l'hypothèse d'un rôle de PP2-A1 dans le shuttling nucléocytoplasmique dans les cellules compagnes.

Pour la production de protéines recombinantes, à partir des premiers essais de production de protéines recombinantes réalisés par nos collaborateurs à Nantes, nous n'avons pas amélioré significativement la solubilité de ces protéines, ce qui constitue encore une limitation pour des analyses physicochimiques et structurales des formes complètes. L'ajout de la GST en fusion avec différents domaines de PP2-A1 permet de produire des formes tronquées qui sont solubles et qui pourraient donc être utilisées dans des analyses structurales pour les deux domaines produits. Ce matériel pourrait également être utilisé pour déterminer quel domaine est responsable des propriétés de lectine, de dimérisation et de liaison à l'ARN. Ce matériel ouvre donc des perspectives tout à fait intéressantes pour la suite des analyses structurales et pour l'analyse biochimiques des propriétés de cette protéine.

En revanche, la forme tronquée de PP2-A2 s'avère aussi insoluble que la forme entière. Pour produire ces protéines recombinantes, il serait peut être nécessaire d'utiliser un autre système de production hétérologue, par exemple dans la levure, ou dans d'autres organismes, comme les cellules de plantes, dans l'hypothèse où les problèmes d'insolubilité résulteraient d'une mauvaise conformation de la protéine en système bactérien. Ceci constitue un préalable pour déterminer si PP2-A2 présente également des propriétés de lectine, ou de liaison à l'ARN.

# **Discussion générale**

A l'issue de ma thèse, nous avons pu acquérir des connaissances nouvelles sur l'organisation subcellulaire des cellules du phloème *in vivo* et sur la localisation précise de PP2-A1 dans les tubes criblés et les cellules compagnes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la protéine était localisée dans le noyau et dans le cytosol des cellules compagnes, alors qu'elle est localisée autour des mitochondries et certainement également autour des plastides dans les tubes criblés. L'étude de croisements entre des lignées dans lesquelles des fusions traductionnelles de PP2-A1 et PP2-A2 sont exprimés dans les cellules compagnes nous a donné des pistes quant à un rôle pour ces protéines dans la régulation d'une des voies de signalisation de l'auxine. Enfin, des tests d'interaction chez la levure nous ont permis de confirmer l'auto-association de PP2-A1.

Plusieurs questions se posent encore. L'étude de plantes des lignées exprimant des microARN artificiels dérégulant spécifiquement *PP2-A1* ou *PP2-A2* n'a pas permis de confirmer les altérations phénotypiques observées chez des lignées existantes dans lesquelles l'expression de *PP2-A1* est dérégulée par RNAi. En ce qui concerne les lignées dérégulées par des microARN artificiels, nous ne sommes pas en mesure de relier le niveau de dérégulation de ces deux gènes à des altérations phénotypiques des plantes par rapport à des plantes sauvages. Par comparaison avec les résultats obtenus dans les plantes des lignées RNAi, nous ne pouvons donc pas confirmer que *PP2-A1* est le seul gène affecté justifiant du phénotype des plantes des lignées RNAi. Dans les plantes RNAi, il est possible qu'une protéine tronquée PP2-A1 soit encore produite, et que cette protéine tronquée puisse interférer avec d'autres partenaires, entraînant le phénotype très pléiotrope que l'on observe. D'autre part, le mécanisme de RNAi conduit à la synthèse de petits ARN secondaires, pouvant cibler et déclencher la dérégulation de gènes autres que le gène cible. Au final, nous ne pouvons toujours pas déterminer quels sont les gènes dérégulés dans les plantes RNAi qui sont responsables du phénotype observé.

Nous avons également étudié des plantes issues de croisement dans lesquelles *PP2-A1* et *PP2-A2* fusionnés à des protéines fluorescentes étaient exprimés de façon ectopique dans les cellules compagnes. Ces plantes présentent une augmentation de la taille des organes et une augmentation de la biomasse. Ce phénotype a été uniquement décrit chez certaines lignées dans lesquelles des gènes impliqués dans une voie de signalisation précise de l'auxine sont surexprimés (Mizukami *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2003). Il nous faut encore comprendre par quel mécanisme PP2-A1 et PP2-A2 pourraient intervenir dans cette voie de signalisation.

Lors de nos observations en microscopie confocale, nous nous sommes astreints à regarder uniquement des tissus *in vivo*, avec le minimum de manipulation pour limiter les artefacts de préparation. En effet, c'est une des principales contraintes lors de l'observation du phloème ; le tissu étant difficilement accessible, il faut souvent fixer les échantillons par des procédés physico-chimiques pouvant altérer la structure même des tissus. La microscopie confocale nous permet d'observer les échantillons avec un minimum de préparation, dans de l'eau. Dans ce cas, nous sommes obligés de peler la feuille pour accéder au phloème et limiter la diffusion de la fluorescence, mais nos expériences de marquage au 5-6 CFDA ont permis de déterminer que lors du pelage des feuilles, ni le chargement, ni le transport au sein du phloème n'étaient bloqués. Nous en avons donc conclu que le phloème était encore fonctionnel après le traitement appliqué aux échantillons pour nos observations.

Au début de ces travaux, les seules observations de phloème réalisées en microscopie confocale sur des feuilles concernaient principalement des espèces comme *Vicia faba* (Knoblauch *et al.*, 1998 ; Knoblauch *et al.*, 2001), et se concentraient sur l'observation des cellules criblés. Il n'y avait que très peu d'études montrant l'organisation des cellules compagnes (Martens *et al.*, 2006). Des observations de phloème avaient été faites chez *Arabidopsis* sur les racines (Stadler *et al.*, 2005; Thompson & Wolniak., 2008), ou sur les tiges (Chisholm *et al.*, 2001, Thompson & Wolniak., 2008) mais aucune observations n'avaient été réalisées sur le phloème de feuilles d'*Arabidopsis*. Nous avons décidé de nous intéresser aux feuilles, principalement aux feuilles sources, car ce sont dans celles-ci que se fait le chargement en métabolites et en macromolécules, qui jouent un rôle important dans la physiologie de la plante et son développement.

En réalisant les premières observations de phloème nous nous sommes aperçus que les cellules compagnes étaient très différentes des autres types cellulaires présents dans d'autres tissus, et qu'il était difficile de reconnaître et d'identifier les organites à l'intérieur de celles-ci. C'est pourquoi nous avons entrepris de réaliser une cartographie de ces cellules, afin de mieux comprendre leur organisation. Nous avons pu ainsi déterminer un certain nombre de caractéristiques spécifiques aux cellules du phloème: la petite taille des chloroplastes dans les CC et dans le parenchyme phloémien, la grande quantité de mitochondries dans les CC, la présence de plusieurs vacuoles au sein des CC. Ces observations sont cohérentes avec des observations d'ultrastructure beaucoup plus anciennes réalisées en microscopie électronique à

transmission. Elles permettent de proposer des critères distinctifs *in vivo* pour reconnaître les cellules compagnes, les cellules de parenchyme phloémien et *in fine* les cellules criblées. Nous avons pu aussi observer le cytosquelette des CC et du parenchyme phloémien et prédire selon l'organisation des microtubules, différents stades d'élongation des cellules du phloème. Ces observations de l'organisation du phloème nous ont permis de localiser par la suite des protéines d'intérêt, dont PP2-A1.

Les expériences d'immunolocalisation de PP2-A1 réalisées sur des échantillons fixés de feuille avaient montré que la protéine était présente sous forme d'agrégats au niveau des cellules criblés (Batailler *et al.*, 2012). Au cours de ma thèse, j'ai pu montrer que la localisation de PP2-A1 était différente dans les cellules compagnes et dans les tubes criblés. Dans les cellules compagnes, PP2-A1 est localisée au niveau du noyau et dans le cytoplasme, ce qui est cohérent avec un rôle de cette protéine dans le transport nucléocytoplasmique de macromolécules. Au niveau des cellules criblées matures, la protéine est présente en périphérie de ces cellules, et nous avons pu montrer qu'elle était localisée autour des mitochondries et certainement également autour des plastides. Un rôle possible de PP2-A1 serait d'ancrer les organites dans les tubes criblés matures. En effet, ces organites doivent être fixés à la membrane pour ne pas être emportés avec le flux de masse de la sève phloémienne. En microscopie électronique à transmission, on distingue des structures présentes dans le réticulum et dont la nature reste encore à définir (Ehlers *et al.*, 2000). Il est possible que ces structures servent à l'accrochage des organites dans les tubes criblés. L'hypothèse que les PP2 pourraient servir de protéine d'ancrage a déjà été évoquée précédemment (Oparka & Turgeon, 1999). De façon étonnante, en utilisant un promoteur spécifique des cellules compagnes, nous ne détectons pas la protéine PP2-A1 fusionnée à la GFP dans les tubes criblés. Il est possible que la GFP empêche la protéine d'être transportée de cellule à cellule, ou bien que les PP2 forment des oligomères trop gros pour passer par les plasmodesmes. Il serait envisageable de réaliser des Western blots sur les plantes exprimant ces protéines de fusion avec un anticorps dirigé contre la GFP, pour voir si on retrouve des complexes de tailles différentes. Ceci confirmerait l'auto-association de ces protéines *in planta*. Nous constatons également que PP2-A1 peut être présente sous différentes formes dans les tubes criblés selon leur état de différenciation. La protéine est soluble dans les tubes criblés non mature, et forme des agrégats dans les tubes criblés matures. Ce changement de conformation pourrait être lié à des modifications de l'environnement cellulaire, comme le pH, ou le potentiel redox. Il est

possible que PP2-A1 n'interagisse pas avec les mêmes protéines dans les tubes criblés matures et immatures.

Une limite à l'observation du phloème en microscopie confocale est que nous ne disposons que d'un nombre restreint de promoteurs spécifiques dans les cellules compagnes et les cellules criblés. En effet, dans ces tissus l'utilisation d'un promoteur constitutif comme le promoteur 35S de la mosaïque du chou fleur ne permet pas de réaliser des acquisitions assez fines dans un type cellulaire précis. Il est très difficile d'observer des protéines fluorescentes dans les tubes criblés, cellules très petites de seulement 1 ou 2  $\mu\text{m}$  de diamètre, en particulier quand les cellules alentours accumulent également ce marqueur fluorescent en grande quantité. Le promoteur du gène *SUC2* est un bon outil pour la visualisation des cellules compagnes, il a déjà été largement utilisé pour réaliser des études sur le phloème (Stadler *et al.*, 2005). Le promoteur du gène *SEOR2* est intéressant car il permet une expression restreinte dans les tubes criblés, et une expression très précoce dans les tubes criblés immature. Il nous manque donc un promoteur spécifique du parenchyme phloémien.

Il nous manque également pour observer les cellules du phloème certains marqueurs spécifiques d'organites. Les tubes criblés différenciés possèdent des plastes modifiés, qui sont souvent des amyloplast. Nous n'avons pas trouvé pour l'instant de marqueur fluorescent adressé aux amyloplast nous permettant de les visualiser dans les cellules criblées différenciées. Un tel marqueur serait utile pour confirmer la localisation de PP2-A1 autour des plastes de TC. Les mitochondries sont aussi différentes, et nous n'avons pas réussi à les visualiser dans les tubes criblés à l'aide d'une protéine fusionnée à une GFP. Nos observations de tubes criblés sont donc incomplètes. Ainsi, nous ne sommes pas capables à ce jour de définir quelles sont les vésicules marquées par la protéine de fusion GFP:RTM2 dans les tubes criblés différenciés, ni les structures auxquelles est associée RTM1:GFP. Nous observons des vésicules similaires en microscopie électronique à transmission, mais leur identité et leur rôle dans le phloème restent inexpliqués à ce jour. Il pourrait être intéressant de trouver des marqueurs nous permettant de visualiser les endosomes et les vésicules trans-golgiennes, qui pourraient correspondre à ces vésicules de nature inconnue.

Les PP2 sont des protéines présentes chez de nombreuses angiospermes. Certaines d'entre elles, comme CbmPP2, ou Cmmlec17 possèdent des capacités d'interaction avec les ARN (Gomez *et al.*, 2005). Il serait intéressant de tester les capacités de liaison à l'ARN pour PP2-A1 et PP2-A2, ce qui nous permettrait de confirmer le rôle de cette protéine dans les mécanismes de régulation au sein du phloème. Nous devons ensuite déterminer si ces

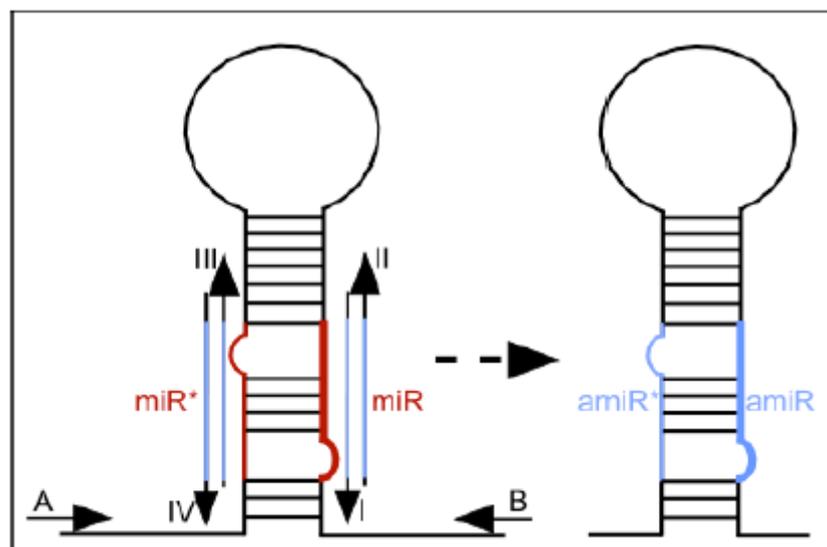
protéines interviennent dans les échanges d'information de cellule à cellule, des CC vers les TC, ou bien si elles interviennent dans le transport à longue distance au sein du phloème. De même, mises à part les interactions décrites entre PP2 et PP1 chez *C. maxima* (Read & Northcote, 1983, Smith *et al.*, 1987), il n'existe pas de partenaires protéiques connus pour les PP2 exprimées dans le phloème. NICTABA, une lectine de tabac peut se lier à des protéines nucléaires (Schoupe *et al.*, 2011). Mais cette lectine n'est pas présente de façon constitutive dans la plante, il est donc possible qu'elle n'intervienne que dans un mécanisme particulier chez le tabac, alors que les PP2 que nous avons étudiées sont des protéines présentes tout au long du développement de la plante.

Nous avons montré que PP2-A1 pouvait s'auto-associer dans la levure, confirmant les résultats obtenus précédemment *in vitro* (Beneteau., 2008). Nous n'avons pas pu identifier de partenaires protéiques pour PP2-A1 par la technique du double hybride. Pour identifier des partenaires, d'autres approches existent. Nous disposons d'anticorps spécifiques dirigés contre PP2-A1 et PP2-A2. Nous pourrions donc réaliser des expériences de co-immunoprécipitation en utilisant ces anticorps.

Les expériences réalisées lors de cette thèse nous ont permis de mieux décrire l'organisation subcellulaire des cellules du phloème. La localisation de la protéine PP2-A1 conforte l'hypothèse d'un éventuel rôle de navette dans le transport nucléocytoplasmique. Il reste cependant à identifier les partenaires protéiques ou ARN ciblés par PP2-A1 pour ce transport. Il semble que PP2-A2 présente la même localisation, et puisse donc intervenir également dans un tel processus dit de « shuttling ». Nous avons également mis en place des outils pour faciliter l'observation du phloème d'*Arabidopsis thaliana*. L'étude de plantes issues de croisements nous a permis de proposer des hypothèses nouvelles quant au rôle des PP2 dans la voie de signalisation de l'auxine.

Le phloème est donc un tissu bien plus singulier qu'il n'y paraît. Un complexe de deux cellules seulement va être au cœur de toutes les communications cellulaires et va intégrer les signaux de tous types: sucres, protéines, ARN, ions, ondes électriques... par des mécanismes qui restent encore largement à élucider.

# **Compléments de Matériels et méthodes**



**Figure 72: Position des amorces utilisées pour cloner les microARN artificiels**  
Ce produit est cloné dans le vecteur PRS300. (Schwab *et al.*, 2005 ; Schawb *et al.*, 2006)

**Tableau 15: Oligonucléotides utilisés pour le clonage des microARN artificiels**

Description	Séquence (dans le sens (5'-3'))
Primer I miPP2-A1-2	GATCAAACGTTTTTCAATCCCCTCTCTCTTTTGTATTCC
Primer II miPP2-A1-2	GAGTGGGATTGAAAAACGTTTGATCAAAGAGAATCAATGA
Primer III miPP2-A1-2	GAGTAGGATTGAAAATCGTTTGTTTCACAGGTCGTGATATG
Primer IV miPP2-A1-2	GAACAAACGATTTTCAATCCTACTCTACATATATATTCT
Primer I miPP2-A1-3	GATATCGGTAAAGTTGTCGCCCGTCTCTCTTTTGTATTCC
Primer II miPP2-A1-3	GACGGGCGACAACCTTACCAGATATCAAAGAGAATCAATGA
Primer III miPP2-A1-3	GACGAGCGACAACCTTAACCGATTTTCACAGGTCGTGATATG
Primer IV miPP2-A1-3	GAAATCGGTAAAGTTGTCGCTCGTCTACATATATATTCT
Primer I miPP2-A2-1	GATTCGTACAAACTGTTGGGACTTCTCTCTTTTGTATTCC
Primer II miPP2-A2-1	GAAGTCCCAACAGTTTGTACGAATCAAAGAGAATCAATGA
Primer III miPP2-A2-1	GAAATCCCAACAGTATGTACGTATCACAGGTCGTGATATG
Primer IV miPP2-A2-1	GATACGTACATACTGTTGGGATTTCTACATATATATTCT
Primer A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
Primer B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
Primer Gateway sens	GCCCCCCTCGAGGTCGACG
Primer Gateway anti-sens	GAGCGGCCGCCACCGCGGTG
Primer séquençage sens	CACACGCTCGGACGCATAT
Primer séquençage anti-sens	GGGATCCACTAGTTCTAGAG

## ***I Clonage des microARN artificiels***

Les microARN artificiels ont été clonés en suivant le protocole décrit par le site WMD3. L'objectif de ce clonage est de remplacer le microARN présent dans le plasmide servant de matrice (pRS300, contenant le mi319a Schwab *et al.*, 2006, Ossowski Stephan, Fitz Joffrey, Schwab Rebecca, Riester Markus and Weigel Detlef, communication personnelle, <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) par des PCR successives. Cette opération se réalise en plusieurs étapes. Dans un premier temps, on réalise une PCR (a) entre les amorces A et IV, puis (b) entre les amorces I et B et (c) entre les amorces II et III. Ces trois PCR permettent de produire 3 fragments de la structure tige boucle du microARN, en ayant remplacé la séquence du microARN par le microARN d'intérêt. Une quatrième PCR utilisant les amorces A et B et les trois fragments précédemment produits permet de reconstituer la structure tige boucle complète (Figure 71). Les PCR (a) (b) et (c) ont été réalisées de la façon suivante dans un volume de réaction de 20  $\mu$ L: 2,5 $\mu$ L de tampon Pfx 10X (InVitrogen), 1 $\mu$ L dNTP (10 mM), 1,5  $\mu$ L de chaque amorce (10  $\mu$ M), 1 $\mu$ L de plasmide dilué 100X (1ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 0,75  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub> 50mM, 0,5  $\mu$ L de Pfx (1U), 16,25  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O. Les conditions de PCR sont les suivantes: 95°C pendant 2 minutes, puis 35 cycles avec: 95°C pendant 30', 55°C pendant 30', 68°C pendant 40' ; et une étape finale à 68°C pendant 7 minutes. Pour la PCR (d), elle est réalisée dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ L: 2,5 $\mu$ L de tampon Pfx 10X (InVitrogen), 1 $\mu$ L dNTP (10 mM), 1,5  $\mu$ L des amorces A et B (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L de produit PCR (a), 0,5  $\mu$ L de produit PCR (b), 0,5  $\mu$ L de produit PCR (c), 0,75  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub> 50mM, 0,5  $\mu$ L de Pfx (1U), 15,75  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O. Les conditions de PCR sont les suivantes: 95°C pendant 2 minutes, puis 35 cycles avec: 95°C pendant 30', 55°C pendant 30', 68°C pendant 50'. (Thermocycler Eppendorf 2700). Ces cycles sont suivis d'une étape finale à 68°C pendant 7 minutes. Le produit PCR d'environ 500 pb est visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande est prélevée et purifiée à l'aide du Kit NucleoSpin ® (Macherey-Nagel). Pour être cloné dans un vecteur pTOPO PCR II, le microARN artificiel créé doit avoir un nucléotide A libre au niveau des extrémités 5' et 3' (TA Cloning). Une étape de plus est donc nécessaire pour ajouter aux extrémités du produit PCR un dATP: 2,5 $\mu$ L de tampon Taq 10X (InVitrogen), 0,75 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 0,75 $\mu$ L dATP (10mM), 5  $\mu$ L de produit PCR purifié, 0,5 $\mu$ L de Taq polymérase (5U) (inVitrogen), 15,5 $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O à 72°C pendant 7 minutes. Après cette étape, le produit PCR est cloné dans le vecteur TOPO PCR II (InVitrogen). Les 3 microARN artificiels ont été séquencés à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 15).

**Tableau 16: Vecteurs d'expression utilisés pour réaliser les microARN artificiels**

<b>MicroARN</b>	<b>Vecteur de destination utilisé</b>	<b>Marqueur de résistance dans la plante</b>
miPP2-A1-2	pH2GW7	Hygromycine
miPP2-A1-3	pK2GW7	Kanamycine
miPP2-A2-1	pK2GW7	Kanamycine

*Ces vecteurs permettent d'exprimer des gènes sous contrôle d'un promoteur 35S. (Karimi et al., 2002)*

**Tableau 17: Oligonucléotides utilisés en qPCR**

<b>Jeu d'Amorces</b>	<b>N° d'Accession</b>	<b>Oligonucléotide Sens</b>	<b>Oligonucléotide Anti-sens</b>	<b>Taille Tm(°C)</b>
PP2-A1	At4g19840	5'-CTCACTCCGGGGA TTG TTTA-3'	5'-GGACGAATT GCAACACCTTT-3'	290pb 84 à 84.4
PP2-A2	At4g19850	5'-CATGGGCAG AGTCTCAAACA-3'	5'-TCCACCCACTT GTTCCTTTC-3'	301pb 83.3 à 83.4
UBI	At1g27450	5'-GAGACATTTTG CGTGGGATT-3'	5'-CGGGGATTTTA AGTGGAACA-3'	123pb 78.7 à 79.4
APT	At4g05320	5'-CGTGGTGGTTTC TAAATCTCGT-3'	5'-GATTATACAAGG CCCCAAACA-3'	100pb 78.2 à 78.4

Pour les qRT PCR, les gènes UBI et APT sont utilisés comme gènes de référence.

Une fois le microARN cloné dans le vecteur pTOPO, il a été réamplifié avec les séquences Gateway® attB1 et attB2 pour pouvoir transférer le microARN dans les plasmides d'entrée et de destination. Les microARN ont été clonés dans le vecteur d'entrée pDONR207 Gateway®, avant d'être mis dans les vecteurs de destination (Tableau 17), qui sont les vecteurs d'expression comportant le promoteur 35S du CaMV en amont des sites de recombinaison, pour une expression constitutive des microARN dans la plante.

## **II. Q RT PCR**

Les analyses par RT-PCR quantitatives (Q RT PCR) ont été réalisées avec un Mastercycler®ep realplex (Eppendorf). La quantification de l'ADN est réalisée *via* une sonde fluorescente, le « SYBR® Green », sonde se fixant à l'ADN double brin. Le mélange réactionnel pour qPCR d'Eurogentec utilisé contient: la Taq ADN polymérase « Meteor », du MgCl<sub>2</sub> (4mM), le « SYBR® Green I », un colorant passif de référence ROX, des stabilisateurs et des dNTP (dont dUTP). Les qPCR sont réalisées dans des plaques « Frame Star® 96 puits » (4titude).

Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil ; une fois que la quantité de fluorescence dépasse ce seuil on obtient un numéro de cycle appelé Ct ou cycle seuil. Cette valeur est déterminée au cours de la phase exponentielle d'amplification des échantillons et correspond au nombre de cycles de PCR nécessaire pour atteindre ce seuil. La quantification relative du niveau d'expression se fait en comparant le Ct d'un gène d'intérêt au Ct d'un gène de référence, gène dont le niveau d'expression n'est pas influencé par les conditions expérimentales. Le calcul de l'accumulation relative est déterminé par l'équation:  $(1 / 2^{-\Delta Ct}) \times 100$ . Les réactions de qPCR sont réalisées dans un volume de 20µL avec pour chaque échantillon: l'ADNc (4µL), 2µL de Mix « SYBR® Green », 1µL de l'oligonucléotide sens (0,5mM), 1µL de l'oligonucléotide anti-sens (0,5mM), et 12µL d'H<sub>2</sub>O. Les amorces utilisées sont décrites en Tableau 16. La réaction a lieu dans les conditions suivantes: 5 min à 95°C puis 40 cycles avec 5s à 95°C, 15s à 55°C puis 20s à 70°C. Cette quantification est suivie d'un cycle permettant de calculer les courbes de fusion pour chaque réaction: 15s à 95°C, 15s à 60°C, 20 min avec une augmentation graduelle de 0,1°C de 60°C à 95°C puis 15s à 95°C. Les courbes de fusion permettent de calculer les températures de fusion (T<sub>m</sub>). Les T<sub>m</sub> permettent de vérifier la spécificité des amorces utilisées, de mettre en évidence la formation de dimères d'amorces ou la présence de plusieurs amplicons.

**Tableau 18: Caractéristiques des vecteurs utilisés lors de la thèse**

Nom	Référence	Usage	Marqueur de résistance	Nature
pH2GW7	Karimi <i>et al.</i> , 2002	Surexpression (Promoteur 35S du CaMV)	Hygromycine	Vecteur d'expression binaire, dans la plante
pK2GW7	Karimi <i>et al.</i> , 2002	Surexpression (Promoteur 35S du CaMV)	Kanamycine	Vecteur d'expression binaire, dans la plante
pGADT7	Clontech	Criblage double hybride	Ampicilline	Vecteur d'expression de protéine, dans la levure
pGBKT7	Clontech	Criblage double hybride	Kanamycine	Vecteur d'expression de protéine, dans la levure
pGKGWG	Zhong <i>et al.</i> , 2008	Fusion traductionnelle avec la GFP	Kanamycine	Vecteur d'expression binaire, dans la plante
pGBGWC	Zhong <i>et al.</i> , 2008	Fusion traductionnelle avec Cerulean (CFP)	Basta	Vecteur d'expression binaire, dans la plante
pGKGWY	Zhong <i>et al.</i> , 2008	Fusion traductionnelle avec Venus (YFP)	Kanamycine	Vecteur d'expression binaire, dans la plante
pMDC140	Laurent Ogé	Fusion traductionnelle avec mCherry	Hygromycine	Vecteur d'expression binaire, dans la plante
pMDC107	Curtis & Grossnikaus, 2003	Fusion transcriptionnelle avec la GFP	Hygromycine	Vecteur d'expression binaire, dans la plante
pGWB1	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007	Fusion traductionnelle avec la GFP	Hygromycin, Kanamycine	Vecteur d'expression binaire, dans la plante
pET9	Novagen	Expression de protéines recombinantes	Kanamycine	Vecteur d'expression dans <i>E. coli</i>
pGEX 3X	GE Healthcare (Life Science)	Expression de protéines recombinantes fusionnées à la GST	Ampicilline	Vecteur d'expression dans <i>E. coli</i>
PCR II TOPO	InVitrogen	Clonage de séquences codantes	Kanamycine	Vecteur de clonage de produits PCR

*Ces vecteurs ont été utilisés pour réaliser les constructions nécessaires pour: le criblage double hybride, l'expression de protéines de fusion à un marqueur fluorescent, la surexpression d'une protéine, la production de protéines recombinantes.*

### ***III. Protocoles usuels pour réaliser les clonages***

#### **III.1 Digestion par des enzymes de restriction**

Nous avons réalisé de nombreuses digestions enzymatiques pour réaliser les constructions. Les enzymes sont à utiliser avec le tampon correspondant. Pour la digestion de 2µg d'ADN plasmidique (4µL) dans un volume réactionnel final de 20 µL, nous utilisons typiquement 2µL de tampon 10X, 13µL d'H<sub>2</sub>O, et 1µL d'enzyme de restriction. Pour les double-digestions, le tampon utilisé correspond au tampon pour lequel le pourcentage d'activité est le plus important pour les deux enzymes. La digestion se fait à 37°C pendant 1h. L'inactivation des enzymes de restriction se fait à température élevée, selon les enzymes, de 65 à 80°C pendant 15 minutes, au bain marie.

#### **III.2 Déphosphorylation des plasmides**

Dans le cas de ligation avec des sites de restrictions uniques (exemple de la ligation *Sma*I réalisée pour le clonage des séquences codant les régions N-terminale et C-terminale de PP2-A1 dans le vecteur pGEX), une étape de déphosphorylation est nécessaire, pour éviter que le plasmide ne se referme sur lui-même. Après digestion, 1µL de phosphatase alcaline BAP (Bacterial alkaline phosphatase, Invitrogen ©) est ajouté, puis le mélange réactionnel est incubé au bain marie pendant 1h à 65°C. Une étape de purification par un traitement phénol/chloroforme est nécessaire pour inactiver et retirer la BAP.

#### **III.3 Ligation entre un insert et un plasmide**

Les ligations ont été réalisées selon le protocole fourni, dans un volume réactionnel final de 20 µL. 4µL de tampon de ligation 5X Invitrogen© auquel on ajoute 3µL d'insert (100ng.µL<sup>-1</sup>) et 1µL de vecteur déphosphorylé (200ng.mL<sup>-1</sup>). Nous rajoutons 1µL de ligase T4 (Invitrogen ©), et 11µL d'H<sub>2</sub>O. Le mélange réactionnel est incubé à 16°C sur la nuit. 2µl de milieu de réaction (1/10) sont utilisés pour transformer des bactéries électrocompétentes DH10B par électroporation (1.25kV, appareil MicroPulser, Bio-Rad).

#### ***IV. Conditions de culture des plantes***

Les plantes ont été cultivées en jours courts en chambre de culture ou en jours longs en serre.

Pour les cultures en jours longs (16h de lumière 23°C, 8h de nuit 18°C), les plantes ont été semées sur terreau (Tref substrates) et arrosées avec de la solution nutritive Plant Prod (Fertil).

Pour les cultures en jours courts, les conditions étaient les suivantes: 8h de lumière à 23°C et 16h de nuit à 18°C, avec une intensité lumineuse contrôlée de  $150\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ .

Les différentes lignées utilisées exprimant des marqueurs étaient dans l'accession Columbia, à l'exception des lignées *pRTM1:RTM1:GFP* et *pRTM1:GFP:RTM1* qui étaient de l'accession C24.

#### ***V. Matériels***

##### **V.1 Matériel végétal**

Toutes les transformations ont été réalisées sur *Arabidopsis thaliana*, dans l'accession Col-0. Les transformations ont été réalisées par la méthode d'immersion des fleurs (Cloug & Bent, 1998).

## V.2 Souches de bactéries et de levures

**Tableau 19: Caractéristiques des souches de levure et de bactérie utilisées**

Souche	Usage	Référence	Génotype
<i>E. coli</i> DH10B	Clonage	InVitrogen	F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-
<i>E. coli</i> TUNER	Expression de protéines recombinantes	EMD Millipore	F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lacY1
<i>S. cerevisiae</i> Y2HGold	Criblage double hybride	Clontech	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3- 200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS- Gal1TATA-His3, GAL2UAS-Gal2TATA-Ade2, URA3::MEL1UAS-Mel1TATA AUR1-C MEL1
<i>A. tumefaciens</i> C58 PMP90	Transformation stable de plantes	Koncz & Schell, 1986	



# **Références Bibliographiques**

- Allen, A.K.** (1979). A lectin from the exudate of the fruit of the vegetable marrow (*Cucurbita pepo*) that has a specificity for beta-1,4-linked N-acetylglucosamine oligosaccharides. *Biochem J* **183**, 133-137.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Anstead, J.A., Froelich, D.R., Knoblauch, M., and Thompson, G.A.** (2012). *Arabidopsis* P-protein filament formation requires both *AtSEOR1* and *AtSEOR2*. *Plant Cell Physiol* **53**, 1033-1042.
- Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., and Sakakibara, H.** (2005). Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *Plant Cell* **17**, 1801-1814.
- Balachandran, S., Xiang, Y., Schobert, C., Thompson, G.A., and Lucas, W.J.** (1997). Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14150-14155.
- Banerjee, A.K., Chatterjee, M., Yu, Y., Suh, S.G., Miller, W.A., and Hannapel, D.J.** (2006). Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *Plant Cell* **18**, 3443-3457.
- Banerjee, A.K., Lin, T., and Hannapel, D.J.** (2009). Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism. *Plant Physiol* **151**, 1831-1843.
- Barratt, D.H., Kolling, K., Graf, A., Pike, M., Calder, G., Findlay, K., Zeeman, S.C., and Smith, A.M.** (2011). Callose synthase *GSL7* is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **155**, 328-341.
- Batailler, B., Lemaitre, T., Vilaine, F., Sanchez, C., Renard, D., Cayla, T., Beneteau, J., and Dinant, S.** (2012). Soluble and filamentous proteins in *Arabidopsis* sieve elements. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1258-1273.
- Bauby, H., Divol, F., Truernit, E., Grandjean, O., and Palauqui, J.C.** (2007). Protophloem differentiation in early *Arabidopsis thaliana* development. *Plant Cell Physiol* **48**, 97-109.
- Behnke, H.D.** (1991). Nondispersive protein bodies in sieve elements: A survey and review of their origin, distribution and taxonomic significance. *IAWA Bulletin* **12**, 143-175.
- Beneteau, J.** (2008). Structure et fonction des protéines phloémiennes II (PP2) chez *Arabidopsis thaliana*. In Ecole doctorale "Sciences du végétal: du gène à l'écosystème" (Paris Sud XI).
- Beneteau, J., Renard, D., Marche, L., Douville, E., Lavenant, L., Rahbe, Y., Dupont, D., Vilaine, F., and Dinant, S.** (2010). Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **153**, 1345-1361.
- Beyenbach, J., Weber, C., and Kleinig, H.** (1974). Sieve-tube proteins from *Cucurbita maxima*. *Planta* **119**, 113-124.
- Blackman, L.M., Boevink, P., Cruz, S.S., Palukaitis, P., and Oparka, K.J.** (1998). The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *nicotiana clevelandii*. *Plant Cell* **10**, 525-538.

- Bonke, M., Thitamadee, S., Mahonen, A.P., Hauser, M.T., and Helariutta, Y.** (2003). *APL* regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 181-186.
- Bostwick, D.E., and Thompson, G.A.** (1993). Nucleotide sequence of a pumpkin phloem lectin cDNA. *Plant Physiol* **102**, 693-694.
- Bryan, A.C., Obaidi, A., Wierzba, M., and Tax, F.E.** (2011). XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM1, a leucine-rich repeat receptor-like kinase required for stem growth and vascular development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **235**, 111-122.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D.** (2002). The *Arabidopsis* *TONNEAU2* gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**, 833-845.
- Cano-Delgado, A., Lee, J.Y., and Demura, T.** (2010). Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 605-637.
- Capel, J., Jarillo, J.A., Salinas, J., and Martinez-Zapater, J.M.** (1997). Two homologous low-temperature-inducible genes from *Arabidopsis* encode highly hydrophobic proteins. *Plant Physiol* **115**, 569-576.
- Carlsbecker, A., and Helariutta, Y.** (2005). Phloem and xylem specification: pieces of the puzzle emerge. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 512-517.
- Chen, H., Rosin, F.M., Prat, S., and Hannapel, D.J.** (2003). Interacting transcription factors from the three-amino acid loop extension superclass regulate tuber formation. *Plant Physiol* **132**, 1391-1404.
- Chen, L.Q., Qu, X.Q., Hou, B.H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., and Frommer, W.B.** (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207-211.
- Chisholm, S.T., Parra, M.A., Anderberg, R.J., and Carrington, J.C.** (2001). *Arabidopsis* *RTM1* and *RTM2* genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiol* **127**, 1667-1675.
- Clark, A.M., Jacobsen, K.R., Bostwick, D.E., Dannenhoffer, J.M., Skaggs, M.I., and Thompson, G.A.** (1997). Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, phloem protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. *Plant J* **12**, 49-61.
- Clough, S. and Bent, A.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **16**, 735-743.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030-1033.
- Cosson, P., Sofer, L., Schurdi-Levraud, V., and Revers, F.** (2010b). A member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology (MATH) domain-containing protein is involved in restriction of long distance movement of plant viruses. *Plant Signal Behav* **5**, 1321-1323.
- Cosson, P., Sofer, L., Le, Q.H., Leger, V., Schurdi-Levraud, V., Whitham, S.A., Yamamoto, M.L., Gopalan, S., Le Gall, O., Candresse, T., Carrington, J.C., and Revers, F.** (2010a). *RTM3*, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein. *Plant Physiol* **154**, 222-232.
- Crawford, K.M., and Zambryski, P.C.** (1999). Phloem transport: Are you chaperoned? *Curr Biol* **9**, R281-285.

- Cronshaw, J., and Esau, K.** (1967). Tubular and fibrillar components of mature and differentiating sieve elements. *J Cell Biol* **34**, 801-815.
- Cronshaw, J., and Esau, K.** (1968). P protein in the phloem of Cucurbita. II. The P protein of mature sieve elements. *J Cell Biol* **38**, 292-303.
- Cronshaw, J., and Esau, K.** (1968). P protein in the phloem of Cucurbita. I. The development of P-protein bodies. *J Cell Biol* **38**, 25-39.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**, 462-469.
- Cyr, R.J.** (1994). Microtubules in plant morphogenesis: role of the cortical array. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 153-180.
- Dannenhoffer, J.M., Schulz, A., Skaggs, M.I., Bostwick, D.E., and Thompson, G.A.** (1997). Expression of the phloem lectin is developmentally linked to vascular differentiation in cucurbits. *Planta* **201**, 405-414.
- Delzangles, J.C.** (2010). Caractérisation de gènes *PP2-A1* et *PP2-A2* codant les protéines phloémiennes II (PP2) chez *Arabidopsis thaliana*. In Master 1 Sciences et Technologie (Paris Sud XI).
- Dinant, S., Clark, A.M., Zhu, Y., Vilaine, F., Palauqui, J.C., Kusiak, C., and Thompson, G.A.** (2003). Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. *Plant Physiol* **131**, 114-128.
- Dinant, S.** (2008). [Phloem, transport between organs and long-distance signalling]. *C R Biol* **331**, 334-346.
- Dinant, S., and Lemoine, R.** (2010). The phloem pathway: New issues and old debates. *C R Biol* **333**, 307-319.
- Dinant, S., and Lucas, W.J.** (2012). Sieve elements: puzzling activities deciphered through proteomics studies. In *Phloem* (Wiley-Blackwell), pp. 155-185.
- Divol, F., Vilaine, F., Thibivilliers, S., Kusiak, C., Sauge, M.H., and Dinant, S.** (2007). Involvement of the xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases encoded by celery *XTH1* and *Arabidopsis XTH33* in the phloem response to aphids. *Plant, Cell & Environment* **30**, 187-201.
- Douville, E.** (2010). Structure, assemblage et comportement hydrodynamique d'AtPP2-A1 et AtPP2-A2 chez *Arabidopsis thaliana*. In UFR sciences et techniques (Université de Nantes).
- Ehlers, K., Knoblauch, M., and Bel, A.J.E.** (2000). Ultrastructural features of well-preserved and injured sieve elements: Minute clamps keep the phloem transport conduits free for mass flow. *Protoplasma* **214**, 80-92.
- Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q., Gerentes, D., Perez, P., and Smyth, D.R.** (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155-168.
- Ernst, A.M., Jekat, S.B., Zielonka, S., Muller, B., Neumann, U., Ruping, B., Twyman, R.M., Krzyzanek, V., Pruffer, D., and Noll, G.A.** (2012). *Sieve element occlusion (SEO)* genes encode structural phloem proteins involved in wound sealing of the phloem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E1980-1989.
- Esau, K., and Cheadle, V.I.** (1958). Wall thickening in sieve elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**, 546-553.
- Esau, K., and Cheadle, V.I.** (1961). An evaluation of studies on ultrastructure of sieve plates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**, 1716-1726.
- Esau, K.** (1965). Fixation images of sieve element plastids in Beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**, 429-437.

- Esau, K., and Cronshaw, J.** (1967). Tubular components in cells of healthy and tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana*. *Virology* **33**, 26-35.
- Esau, K., and Cronshaw, J.** (1968). Endoplasmic reticulum in the sieve element of *Cucurbita*. *J Ultrastruct Res* **23**, 1-14.
- Esau, K.** (1969). The phloem. *Encyclopedia of plant anatomy*. (Berlin-Stuttgart: Gebrüder Borntraeger).
- Evert, R., Eschrich, W., and Eichhorn, S.** (1972). P-protein distribution in mature sieve elements of *Cucurbita maxima*. *Planta* **109**, 193-210.
- Evert, J.M.** (1990). Dicotyledons. In *Sieve Elements. comparative structure, induction and development*, Springer-Verlag, ed (Berlin), pp. 103-137.
- Fan, S.C., Lin, C.S., Hsu, P.K., Lin, S.H., and Tsay, Y.F.** (2009). The *Arabidopsis* nitrate transporter *NRT1.7*, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *Plant Cell* **21**, 2750-2761.
- Fisher, D.B., and Oparka, K.J.** (1996). Post-phloem transport: principles and problems. *J Exp Bot* **47 Spec No**, 1141-1154.
- Fitzgibbon, J., Bell, K., King, E., and Oparka, K.** (2010). Super-resolution imaging of plasmodesmata using three-dimensional structured illumination microscopy. *Plant Physiol* **153**, 1453-1463.
- Froelich, D.R., Mullendore, D.L., Jensen, K.H., Ross-Elliott, T.J., Anstead, J.A., Thompson, G.A., Pelissier, H.C., and Knoblauch, M.** (2011). Phloem ultrastructure and pressure flow: Sieve-Element-Occlusion-Related agglomerations do not affect translocation. *Plant Cell* **23**, 4428-4445.
- Furch, A.C., van Bel, A.J., Fricker, M.D., Felle, H.H., Fuchs, M., and Hafke, J.B.** (2009). Sieve element Ca<sup>2+</sup> channels as relay stations between remote stimuli and sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *Plant Cell* **21**, 2118-2132.
- Gajdanowicz, P., Michard, E., Sandmann, M., Rocha, M., Correa, L.G., Ramirez-Aguilar, S.J., Gomez-Porrás, J.L., Gonzalez, W., Thibaud, J.B., van Dongen, J.T., and Dreyer, I.** (2010). Potassium (K<sup>+</sup>) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 864-869.
- Golecki, B., Schulz, A., Carstens-Behrens, U., and Kollmann, R.** (1998). Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of *Cucurbitaceae*. *Planta* **206**, 630-640.
- Golecki, B., Schulz, A., and Thompson, G.A.** (1999). Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell* **11**, 127-140.
- Gómez, G., and Pallás, V.** (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex *in vivo* with Hop stunt viroid RNA. *J Virol* **78**, 10104-10110.
- Gómez, G., Torres, H., and Pallás, V.** (2005). Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J* **41**, 107-116.
- Guelette, B.S., Benning, U.F., and Hoffmann-Benning, S.** (2012). Identification of lipids and lipid-binding proteins in phloem exudates from *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **63**, 3603-3616.
- Hafke, J.B., van Amerongen, J.K., Kelling, F., Furch, A.C., Gaupels, F., and van Bel, A.J.** (2005). Thermodynamic battle for photosynthate acquisition between sieve tubes and adjoining parenchyma in transport phloem. *Plant Physiol* **138**, 1527-1537.
- Ham, B.K., Brandon, J.L., Xoconostle-Cazares, B., Ringgold, V., Lough, T.J., and Lucas, W.J.** (2009). A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *Plant Cell* **21**, 197-215.

- Harris, W.R., Sammons, R.D., and Grabiak, R.C.** (2012). A speciation model of essential trace metal ions in phloem. *J Inorg Biochem* **116C**, 140-150.
- Hart, G.W., Housley, M.P., and Slawson, C.** (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446**, 1017-1022.
- Hartig, T.** (1837). Vergleichende Untersuchungen über die Organisation des Stammes der einheimischen Waldbäume. *Jahresb. Fortschr. Forstwiss. und Forestl. Naturk.* **1**, 125-168.
- Hartig, T.** (1854). Ueber die Querscheidewände zwischen den einzelnen Glidern der Siebröhren in *Cucurbita pepo* Bot. Z. **12**, 51-54.
- Haywood, V., Yu, T.S., Huang, N.C., and Lucas, W.J.** (2005). Phloem long-distance trafficking of *GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE* RNA regulates leaf development. *Plant J* **42**, 49-68.
- Hilson, P., Allemeersch, J., Altmann, T., Aubourg, S., Avon, A., Beynon, J., Bhalerao, R.P., Bitton, F., Caboche, M., Cannoot, B., Chardakov, V., Cognet-Holliger, C., Colot, V., Crowe, M., Darimont, C., Durinck, S., Eickhoff, H., de Longevialle, A.F., Farmer, E.E., Grant, M., Kuiper, M.T., Lehrach, H., Leon, C., Leyva, A., Lundeberg, J., Lurin, C., Moreau, Y., Nietfeld, W., Paz-Ares, J., Reymond, P., Rouze, P., Sandberg, G., Segura, M.D., Serizet, C., Tabrett, A., Taconnat, L., Thareau, V., Van Hummelen, P., Vercruyssen, S., Vuylsteke, M., Weingartner, M., Weisbeek, P.J., Wirta, V., Wittink, F.R., Zabeau, M., and Small, I.** (2004). Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res* **14**, 2176-2189.
- Hoad, G.V.** (1995). Transport of hormones in the phloem of higher plants. *Plant Growth Regulation* **16**, 173-182.
- Hoffmann-Thoma, G., van Bel, A.J., and Ehlers, K.** (2001). Ultrastructure of minor-vein phloem and assimilate export in summer and winter leaves of the symplasmically loading evergreens *Ajuga reptans* L., *Aucuba japonica* Thunb., and *Hedera helix* L. *Planta* **212**, 231-242.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P.** (2008). Genevestigator V3: A reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* **2008**.
- Hu, Y., Xie, Q., and Chua, N.H.** (2003). The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *Plant Cell* **15**, 1951-1961.
- Hu, Y., Poh, H.M., and Chua, N.H.** (2006). The *Arabidopsis* *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth. *Plant J* **47**, 1-9.
- Hu, P., Shimoji, S., and Hart, G.W.** (2010). Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Lett* **584**, 2526-2538.
- Ingram, P., Dettmer, J., Helariutta, Y., and Malamy, J.E.** (2011). *Arabidopsis* *Lateral Root Development 3* is essential for early phloem development and function, and hence for normal root system development. *Plant J* **68**, 455-467.
- Issad, T.** (2010). [O-GlcNAc glycosylation and regulation of cell signaling]. *Med Sci (Paris)* **26**, 753-759.
- Ivashikina, N., Deeken, R., Ache, P., Kranz, E., Pommerrenig, B., Sauer, N., and Hedrich, R.** (2003). Isolation of *AtSUC2* promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *Plant J* **36**, 931-945.
- Jekat, S., Ernst, A., Zielonka, S., Noll, G., and Pruffer, D.** (2012). Interactions among tobacco sieve element occlusion (SEO) proteins. *Plant Signal Behav* **7**.
- Jongebloed, U., Szederkenyi, J., Hartig, K., Schobert, C., and Komor, E.** (2004). Sequence of morphological and physiological events during natural ageing and

- senescence of a castor bean leaf: sieve tube occlusion and carbohydrate back-up precede chlorophyll degradation. *Physiol Plant* **120**, 338-346.
- Jorgensen, R.A., Atkinson, R.G., Forster, R.L.S., and Lucas, W.J.** (1998). An RNA-based information superhighway in plants. *Science* **279**, 1486-1487.
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**, 193-195.
- Kehr, J., and Buhtz, A.** (2008). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot* **59**, 85-92.
- Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L., and Fischer, R.L.** (1996). The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* **8**, 137-153.
- Knoblauch, M., and van Bel, A.J.E.** (1998). Sieve tubes in action. *Plant Cell* **10**, 35-50.
- Knoblauch, M., Peters, W.S., Ehlers, K., and van Bel, A.J.** (2001). Reversible calcium-regulated stopcocks in legume sieve tubes. *Plant Cell* **13**, 1221-1230.
- Knoblauch, M., Noll, G.A., Muller, T., Prufer, D., Schneider-Huther, I., Scharner, D., Van Bel, A.J., and Peters, W.S.** (2003). ATP-independent contractile proteins from plants. *Nat Mater* **2**, 600-603.
- Knoblauch, M., and Oparka, K.** (2012). The structure of the phloem--still more questions than answers. *Plant J* **70**, 147-156.
- Knoblauch, M., Stubenrauch, M., van Bel, A.J., and Peters, W.S.** (2012). Forisome performance in artificial sieve tubes. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1419-1427.
- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* **204**, 383-396.
- Krizek, B.A.** (1999). Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *Dev Genet* **25**, 224-236.
- Lalonde, S., Tegeder, M., Throne-Holst, M., Frommer, W.B., and Patrick, J.W.** (2003). Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell & Environment* **26**, 37-56.
- Lalonde, S., Wipf, D., and Frommer, W.B.** (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 341-372.
- Lannoo, N., Peumans, W.J., Pamel, E.V., Alvarez, R., Xiong, T.C., Hause, G., Mazars, C., and Van Damme, E.J.** (2006). Localization and *in vitro* binding studies suggest that the cytoplasmic/nuclear tobacco lectin can interact in situ with high-mannose and complex N-glycans. *FEBS Lett* **580**, 6329-6337.
- Lannoo, N., Vandendorre, G., Miersch, O., Smagghe, G., Wasternack, C., Peumans, W.J., and Van Damme, E.J.** (2007). The jasmonate-induced expression of the *Nicotiana tabacum* leaf lectin. *Plant Cell Physiol* **48**, 1207-1218.
- Lee, J.Y., Yoo, B.C., Rojas, M.R., Gomez-Ospina, N., Staehelin, L.A., and Lucas, W.J.** (2003). Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science* **299**, 392-396.
- Lehesranta, S.J., Lichtenberger, R., and Helariutta, Y.** (2009). Cell-to-cell communication in vascular morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 59-65.
- Li, C., Gu, M., Shi, N., Zhang, H., Yang, X., Osman, T., Liu, Y., Wang, H., Vatish, M., Jackson, S., and Hong, Y.** (2011). Mobile FT mRNA contributes to the systemic florigen signalling in floral induction. *Sci. Rep.* **1**.
- Lin, W.C., Shuai, B., and Springer, P.S.** (2003). The *Arabidopsis* LATERAL ORGAN BOUNDARIES-domain gene ASYMMETRIC LEAVES2 functions in the repression of KNOX gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *Plant Cell* **15**, 2241-2252.

- Lin, M.K., Lee, Y.J., Lough, T.J., Phinney, B.S., and Lucas, W.J.** (2009). Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol Cell Proteomics* **8**, 343-356.
- Liu, L., Liu, C., Hou, X., Xi, W., Shen, L., Tao, Z., Wang, Y., and Yu, H.** (2012). *FTIP1* is an essential regulator required for florigen transport. *PLoS Biol* **10**, e1001313.
- Liu, D.D., Chao, W.M., and Turgeon, R.** (2012). Transport of sucrose, not hexose, in the phloem. *J Exp Bot* **63**, 4315-4320.
- Lough, T.J., and Lucas, W.J.** (2006). Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 203-232.
- Love, D.C., Krause, M.W., and Hanover, J.A.** (2010). O-GlcNAc cycling: emerging roles in development and epigenetics. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 646-654.
- Lucas, W.J., and Lee, J.-Y.** (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 712-726.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J.** (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 183-193.
- Marin-Gonzalez, E., and Suarez-Lopez, P.** (2012). "And yet it moves": Cell-to-cell and long-distance signaling by plant microRNA. *Plant Sci* **196**, 18-30.
- Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L., and Faure, J.D.** (2008). Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **56**, 169-179.
- Martens, H.J., Roberts, A.G., Oparka, K.J., and Schulz, A.** (2006). Quantification of plasmodesmatal endoplasmic reticulum coupling between sieve elements and companion cells using fluorescence redistribution after photobleaching. *Plant Physiol* **142**, 471-480.
- Martin, A., Adam, H., Diaz-Mendoza, M., Zurczak, M., Gonzalez-Schain, N.D., and Suarez-Lopez, P.** (2009). Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development* **136**, 2873-2881.
- Medberry, S.L., Lockhart, B.E., and Olszewski, N.E.** (1992). The Commelina yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. *Plant Cell* **4**, 185-192.
- Medina, J., Catala, R., and Salinas, J.** (2001). Developmental and stress regulation of *RCI2A* and *RCI2B*, two cold-inducible genes of *Arabidopsis* encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant Physiol* **125**, 1655-1666.
- Medina, J., Rodriguez-Franco, M., Penalosa, A., Carrascosa, M.J., Neuhaus, G., and Salinas, J.** (2005). *Arabidopsis* mutants deregulated in *RCI2A* expression reveal new signaling pathways in abiotic stress responses. *Plant J* **42**, 586-597.
- Miyata, L.Y., Harakava, R., Stipp, L.C., Mendes, B.M., Appezzato-da-Gloria, B., and de Assis Alves Mourao Filho, F.** (2012). GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters. *Plant Cell Rep*.
- Mizukami, Y., and Fischer, R.L.** (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 942-947.
- Mullendore, D.L., Windt, C.W., Van As, H., and Knoblauch, M.** (2010). Sieve tube geometry in relation to phloem flow. *Plant Cell* **22**, 579-593.
- Münch.** (1930). *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Jena.
- Musetti, R., Paolacci, A., Ciaffi, M., Tanzarella, O.A., Polizzotto, R., Tubaro, F., Mizzau, M., Ermacora, P., Badiani, M., and Osler, R.** (2010). Phloem cytochemical

- modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Phytopathology* **100**, 390-399.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J.H., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T., and Bailey-Serres, J.** (2009). Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18843-18848.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A.** (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**, 34-41.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenführ, A.** (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J* **51**, 1126-1136.
- Noll, G.A., Fontanellaz, M.E., Ruping, B., Ashoub, A., van Bel, A.J., Fischer, R., Knoblauch, M., and Prufer, D.** (2007). Spatial and temporal regulation of the forisome gene *for1* in the phloem during plant development. *Plant Mol Biol* **65**, 285-294.
- Notaguchi, M., Wolf, S., and Lucas, W.J.** (2012). Phloem-mobile Aux/IAA transcripts target to the root tip and modify root architecture(F). *J Integr Plant Biol* **54**, 760-772.
- Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O., and Hartweck, L.M.** (2009). O-GlcNAc protein modification in plants: evolution and function. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 49-56.
- Oparka, K.J.** (1990). What is phloem unloading? *Plant Physiol* **94**, 393-396.
- Oparka, K.J., Duckett, C.M., Prior, D.A.M., and Fisher, D.B.** (1994). Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant J* **6**, 759-766.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N., and Epel, B.** (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**, 743-754.
- Oparka, K.J., and Turgeon, R.** (1999). Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* **11**, 739-750.
- Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D.** (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNA and other small RNA. *Plant J* **53**, 674-690.
- Parthasarathy, M.V.** (1974). Ultrastructure of phloem in palms. *Protoplasma* **79**, 265-315.
- Pelissier, H.C., Peters, W.S., Collier, R., van Bel, A.J., and Knoblauch, M.** (2008). GFP tagging of sieve element occlusion (SEO) proteins results in green fluorescent forisomes. *Plant Cell Physiol* **49**, 1699-1710.
- Peters, W.S., van Bel, A.J., and Knoblauch, M.** (2006). The geometry of the forisome-sieve element-sieve plate complex in the phloem of *Vicia faba* L. leaflets. *J Exp Bot* **57**, 3091-3098.
- Peuke, A.D.** (2009). Correlations in concentrations, xylem and phloem flows, and partitioning of elements and ions in intact plants. A summary and statistical re-evaluation of modelling experiments in *Ricinus communis*. *J Exp Bot* **61**, 635-655.
- Poot, M., Zhang, Y.Z., KrÄƒmer, J.A., Wells, K.S., Jones, L.J., Hanzel, D.K., Lugade, A.G., Singer, V.L., and Haugland, R.P.** (1996). Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **44**, 1363-1372.

- Read, S.M., and Northcote, D.H.** (1983). Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin). *Eur J Biochem* **134**, 561-569.
- Read, S.M., and Northcote, D.H.** (1983b). Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the *Cucurbitaceae*. *Planta* **158**, 119-127.
- Rennie, E.A., and Turgeon, R.** (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14162-14167.
- Requena, A., Simon-Buela, L., Salcedo, G., and Garcia-Arenal, F.** (2006). Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 734-746.
- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B., and Piston, D.W.** (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* **22**, 445-449.
- Roberts, A.G., Cruz, S.S., Roberts, I.M., Prior, D., Turgeon, R., and Oparka, K.J.** (1997). Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell* **9**, 1381-1396.
- Roland, J.C., Bouteau, H.e.M., Bouteau, F., and Roland, F.** (2008). Atlas de biologie végétale. Tome 2, Organisation des plantes à fleurs (Editeur: Dunod).
- Rook, F., Corke, F., Baier, M., Holman, R., May, A.G., and Bevan, M.W.** (2006). Impaired sucrose induction1 encodes a conserved plant-specific protein that couples carbohydrate availability to gene expression and plant growth. *Plant J* **46**, 1045-1058.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y.** (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* **5**, 725-738.
- Ruping, B., Ernst, A.M., Jekat, S.B., Nordzieke, S., Reineke, A.R., Muller, B., Bornberg-Bauer, E., Pruber, D., and Noll, G.A.** (2010). Molecular and phylogenetic characterization of the *sieve element occlusion* gene family in Fabaceae and non-Fabaceae plants. *BMC Plant Biol* **10**, 219.
- Sabnis, D.D., and Hart, J.W.** (1979). Heterogeneity in phloem protein complements from different species: Consequences to hypotheses concerned with P-protein functions. *Planta* **145**, 459-466.
- Sasaki, T., Chino, M., Hayashi, H., and Fujiwara, T.** (1998). Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol* **39**, 895-897.
- Sauer, N., and Stolz, J.** (1994). SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* **6**, 67-77.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., and Barkan, A.** (2005). RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* **17**, 2791-2804.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675.
- Schouppe, D., Ghesquiere, B., Menschaert, G., De Vos, W.H., Bourque, S., Trooskens, G., Proost, P., Gevaert, K., and Van Damme, E.J.** (2011). Interaction of the tobacco lectin with histone proteins. *Plant Physiol* **155**, 1091-1102.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D.** (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental cell* **8**, 517-527.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D.** (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1121-1133.

- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flügge, U.-I., and Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol* **131**, 16-26.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., and Davidson, M.W.** (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **120**, 4247-4260.
- Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E., and Maule, A.J.** (2009). An *Arabidopsis* GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *Plant Cell* **21**, 581-594.
- Sjölund, R.D.** (1997). The phloem sieve element: a river runs through it. *Plant Cell* **9**, 1137-1146.
- Slewinski, T.L., Baker, R.F., Stubert, A., and Braun, D.M.** (2012). *Tie-dyed2* encodes a callose synthase that functions in vein development which affects symplastic trafficking within the phloem of maize leaves. *Plant Physiol*.
- Smith, L., Sabnis, D., and Johnson, R.C.** (1987). Immunocytochemical localisation of phloem lectin from *Cucurbita maxima* using peroxidase and colloidal-gold labels. *Planta* **170**, 461-470.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Spanner, D.C.** (1971). Transport in the phloem. *Nature* **232**, 157-160.
- Srivastava, A.C., Ganesan, S., Ismail, I.O., and Ayre, B.G.** (2008). Functional characterization of the *Arabidopsis AtSUC2* Sucrose/H<sup>+</sup> symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiol* **148**, 200-211.
- Stadler, R., Wright, K.M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K.J., and Sauer, N.** (2005). Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J* **41**, 319-331.
- Taoka, K.-i., Ham, B.-K., Xoconostle-Cázares, B., Rojas, M.R., and Lucas, W.J.** (2007). Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *Plant Cell* **19**, 1866-1884.
- Thomas, C.L., Bayer, E.M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L., and Maule, A.J.** (2008). Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol* **6**, e7.
- Thompson, M.V., and Wolniak, S.M.** (2008). A plasma membrane-anchored fluorescent protein fusion illuminates sieve element plasma membranes in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiol* **146**, 1599-1610.
- Truernit, E., and Sauer, N.** (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana SUC2* sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by *SUC2*. *Planta* **196**, 564-570.
- Truernit, E., and Palauqui, J.C.** (2009). Looking deeper: whole-mount confocal imaging of plant tissue for the accurate study of inner tissue layers. *Plant Signal Behav* **4**, 151-152.
- Truernit, E., Bauby, H., Belcram, K., Barthelemy, J., and Palauqui, J.C.** (2012). OCTOPUS, a polarly localised membrane-associated protein, regulates phloem differentiation entry in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **139**, 1306-1315.
- Turgeon, R., and Wolf, S.** (2009). Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 207-221.
- Turgeon, R., and Oparka, K.** (2010). The secret phloem of pumpkins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13201-13202.

- van Bel, A.J., Ehlers, K., and Knoblauch, M.** (2002). Sieve Elements caught in the act. *Trends Plant Sci* **7**, 126-132.
- van Bel, A.J.** (2003). Transport phloem: low profile, high impact. *Plant Physiol* **131**, 1509-1510.
- Van Bel, A.J.E.** (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment* **26**, 125-149.
- van Bel, A.J., Knoblauch, M., Furch, A.C., and Hafke, J.B.** (2011). (Questions)(n) on phloem biology. 1. Electropotential waves, Ca<sup>2+</sup> fluxes and cellular cascades along the propagation pathway. *Plant Sci* **181**, 210-218.
- van Bel, A.J., Furch, A.C., Hafke, J.B., Knoblauch, M., and Patrick, J.W.** (2011). (Questions)n on phloem biology. 2. Mass flow, molecular hopping, distribution patterns and macromolecular signalling. *Plant Sci* **181**, 325-330.
- Vaucheret, H., and Fagard, M.** (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* **17**, 29-35.
- Vaucheret, H.** (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev* **20**, 759-771.
- Vida, T.A., and Emr, S.D.** (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology* **128**, 779-792.
- Vilaine, F., Palauqui, J.C., Amselem, J., Kusiak, C., Lemoine, R., and Dinant, S.** (2003). Towards deciphering phloem: a transcriptome analysis of the phloem of *Apium graveolens*. *Plant J* **36**, 67-81.
- Voigt, B., Timmers, A.C.J., Å amaj, J., MÃ¼ller, J., BaluÅ;ka, F.e., and Menzel, D.** (2005). GFP-FABD2 fusion construct allows *in vivo* visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *European Journal of Cell Biology* **84**, 595-608.
- Vuorinen, A.L., Kelloniemi, J., and Valkonen, J.P.** (2011). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Sci* **181**, 355-363.
- Wells, L., Whelan, S.A., and Hart, G.W.** (2003). O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 435-441.
- Wenzel, C.L., Schuetz, M., Yu, Q., and Mattsson, J.** (2007). Dynamics of *MONOPTEROS* and *PIN-FORMED1* expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **49**, 387-398.
- Windt, C.W., Vergeldt, F.J., de Jager, P.A., and van As, H.** (2006). MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant, Cell & Environment* **29**, 1715-1729.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J.** (2007). An Electronic Fluorescent Pictograph browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718.
- Wolters, H., and Jurgens, G.** (2009). Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet* **10**, 305-317.
- Wright, K.M., Horobin, R.W., and Oparka, K.J.** (1996). Phloem mobility of fluorescent xenobiotics in *Arabidopsis* in relation to their physicochemical properties. *J Exp Bot* **47**, 1779-1787.
- Wright, K.M., Roberts, A.G., Martens, H.J., Sauer, N., and Oparka, K.J.** (2003). Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to *AtSUC2* promoter activity. *Plant Physiol* **131**, 1555-1565.
- Xie, B., Deng, Y., Kanaoka, M.M., Okada, K., and Hong, Z.** (2011). Expression of *Arabidopsis* callose synthase 5 results in callose accumulation and cell wall permeability alteration. *Plant Sci* **183**, 1-8.

- Xie, B., and Hong, Z.** (2011). Unplugging the callose plug from sieve pores. *Plant Signal Behav* **6**, 491-493.
- Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z., and Hong, Z.** (2011). *CalS7* encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant J* **65**, 1-14.
- Ye, Z.H., Freshour, G., Hahn, M.G., Burk, D.H., and Zhong, R.** (2002). Vascular development in *Arabidopsis*. *Int Rev Cytol* **220**, 225-256.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J.** (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**, 1979-2000.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F.W., Yamaya, T., and Saito, K.** (2002). Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J* **29**, 465-473.
- Zakhleniuk, O.V., Raines, C.A., and Lloyd, J.C.** (2001). *pho3*: a phosphorus-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **212**, 529-534.
- Zhang, S., Sun, L., and Kragler, F.** (2009). The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNA and interferes with translation. *Plant Physiol* **150**, 378-387.
- Zhang, B., Tolstikov, V., Turnbull, C., Hicks, L.M., and Fiehn, O.** (2010). Divergent metabolome and proteome suggest functional independence of dual phloem transport systems in cucurbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13532-13537.
- Zhang, L., Tan, Q., Lee, R., Trethewey, A., Lee, Y.H., and Tegeder, M.** (2010). Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 3603-3620.
- Zhang, C., Shi, H., Chen, L., Wang, X., Lu, B., Zhang, S., Liang, Y., Liu, R., Qian, J., Sun, W., You, Z., and Dong, H.** (2011). Harpin-induced expression and transgenic overexpression of the phloem protein gene *AtPP2-A1* in *Arabidopsis* repress phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae*. *BMC Plant Biol* **11**, 11.
- Zhang, Y.** (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.
- Zhao, C., Craig, J.C., Petzold, H.E., Dickerman, A.W., and Beers, E.P.** (2005). The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the *Arabidopsis* root-hypocotyl. *Plant Physiol* **138**, 803-818.
- Zheng, M.S., Takahashi, H., Miyazaki, A., Hamamoto, H., Shah, J., Yamaguchi, I., and Kusano, T.** (2004). Up-regulation of *Arabidopsis thaliana NHL10* in the hypersensitive response to Cucumber mosaic virus infection and in senescing leaves is controlled by signalling pathways that differ in salicylate involvement. *Planta* **218**, 740-750.
- Zhong, S., Lin, Z., Fray, R., and Grierson, D.** (2008). Improved plant transformation vectors for fluorescent protein tagging. *Transgenic Research* **17**, 985-989.



# **Annexes**

## Cartes des vecteurs utilisés lors de la thèse

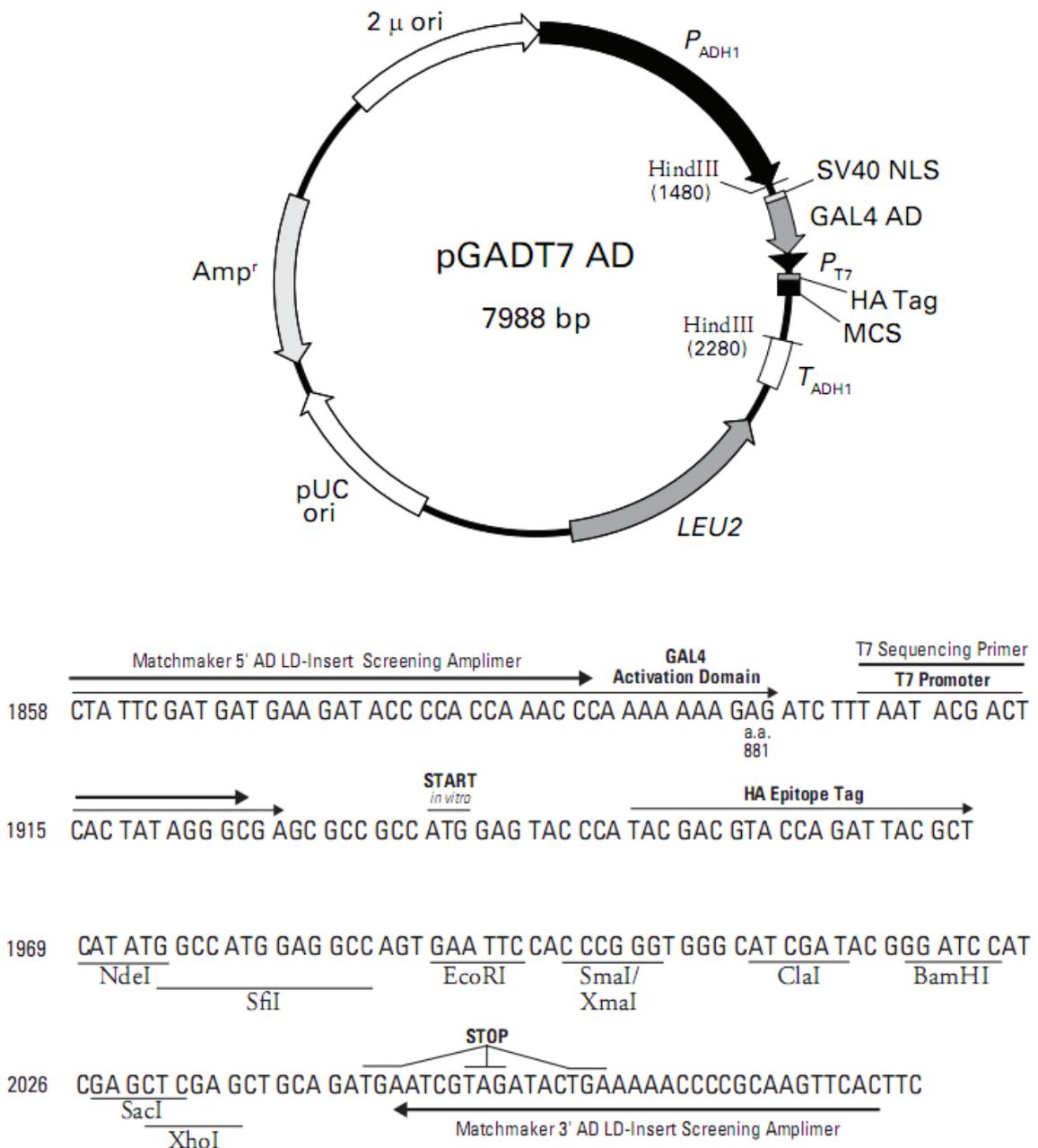
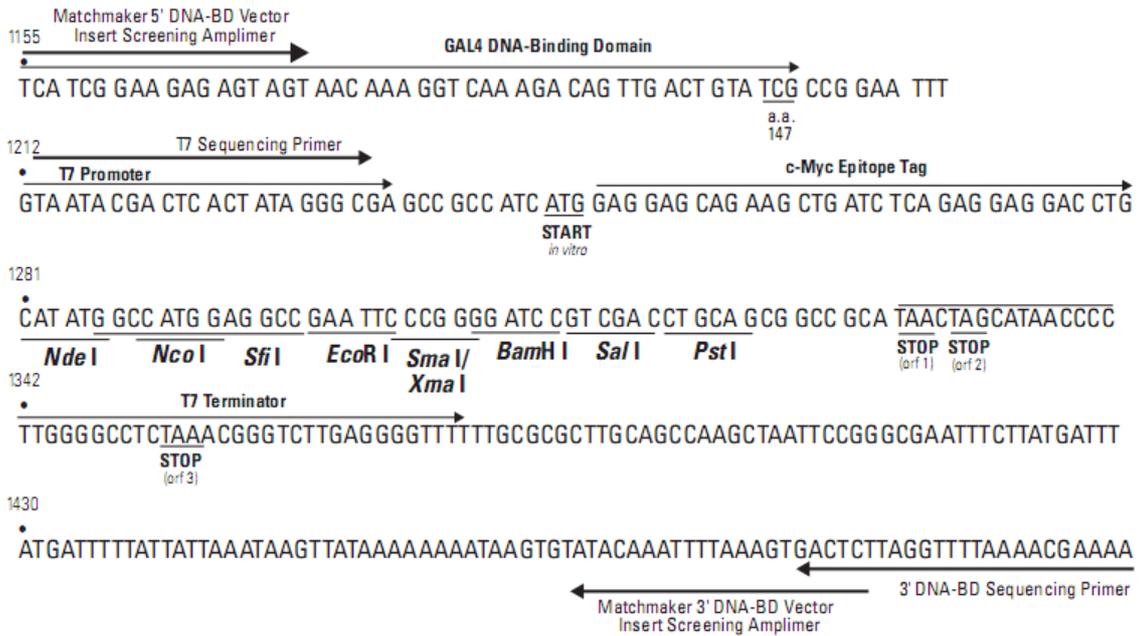
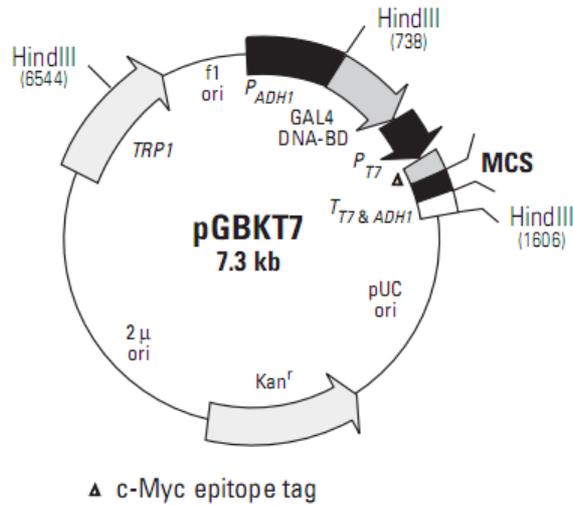


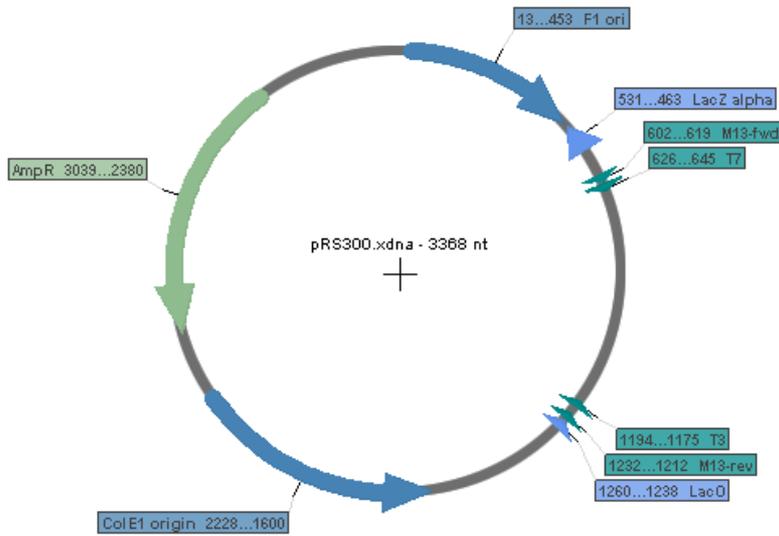
Figure 73 : Carte de pGADT7

Ce vecteur nous a été fourni par Sylvaine Boissinot, de l'équipe ViVe, à l'INRA de Colmar. Elle nous a également fourni les vecteurs pGADT7 contenant les séquences de PP2-A1 et PP2-A2.



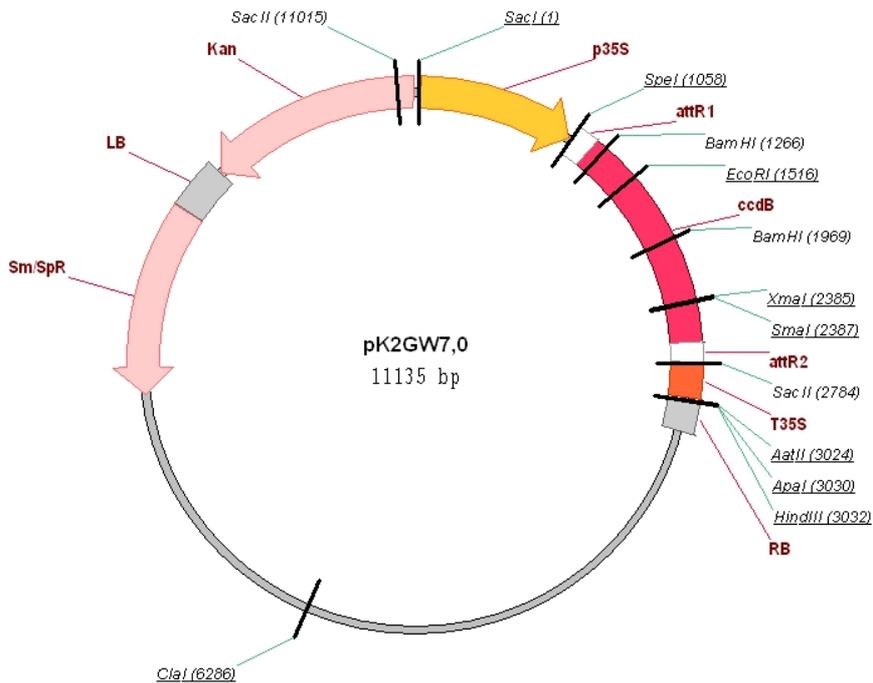
**Figure 74 : Carte de pGBKT7**

*Ce vecteur nous a été fourni par Sylvaine Boissinot, de l'équipe ViVe, à l'INRA de Colmar.*



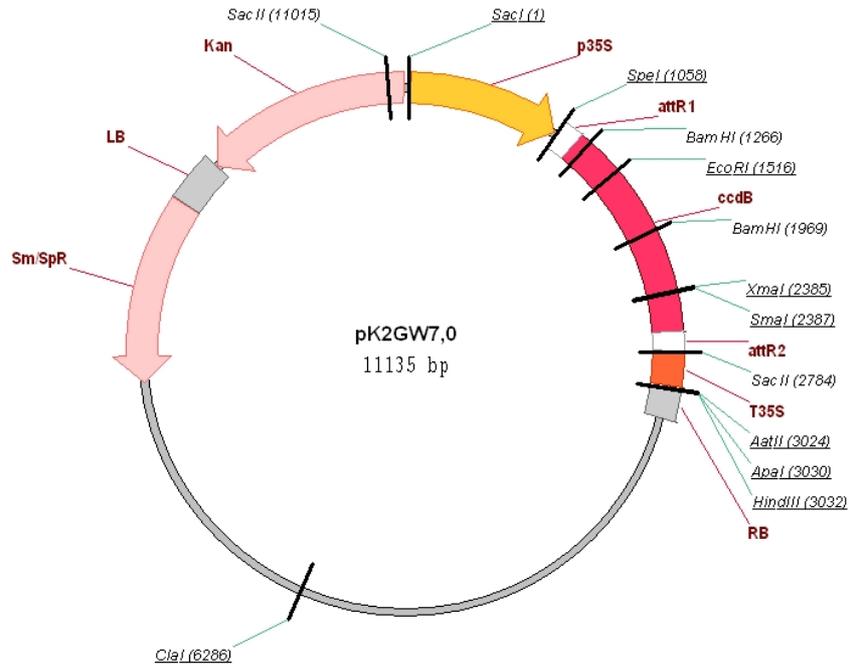
**Figure 75 : Carte du pRS300**

Image: Serial Cloner 2.0 (Serialbasics). (Don de Françoise Vilaine, IJPB)



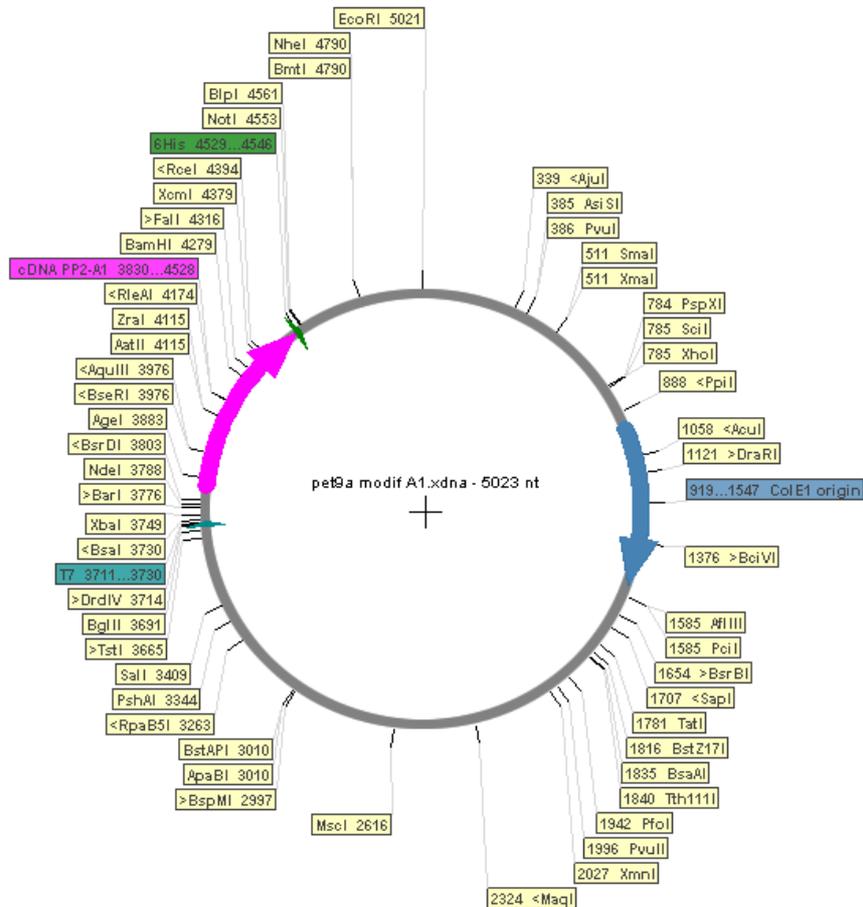
**Figure 76 : pK2GW7**

(Don de Thierry Desprez, IJPB). Images: [<http://gateway.psb.ugent.be>]



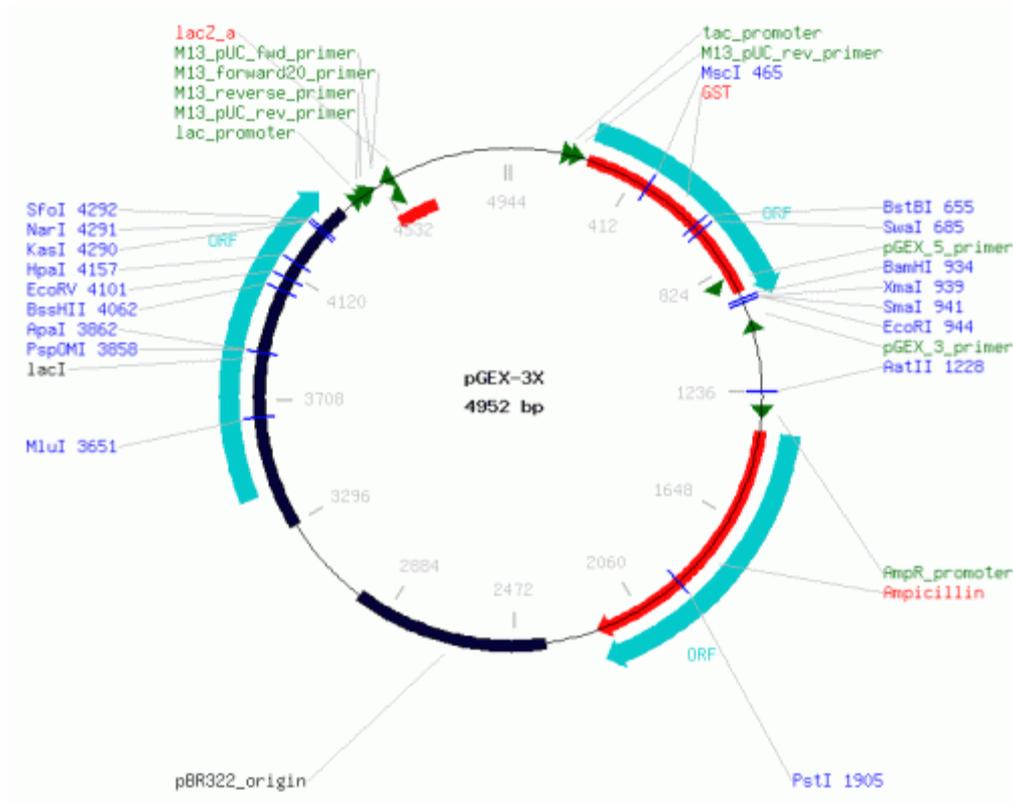
**Figure 77 : pK2GW7**

(Don de Thierry Desprez, IJPB). Images: [<http://gateway.psb.ugent.be>]



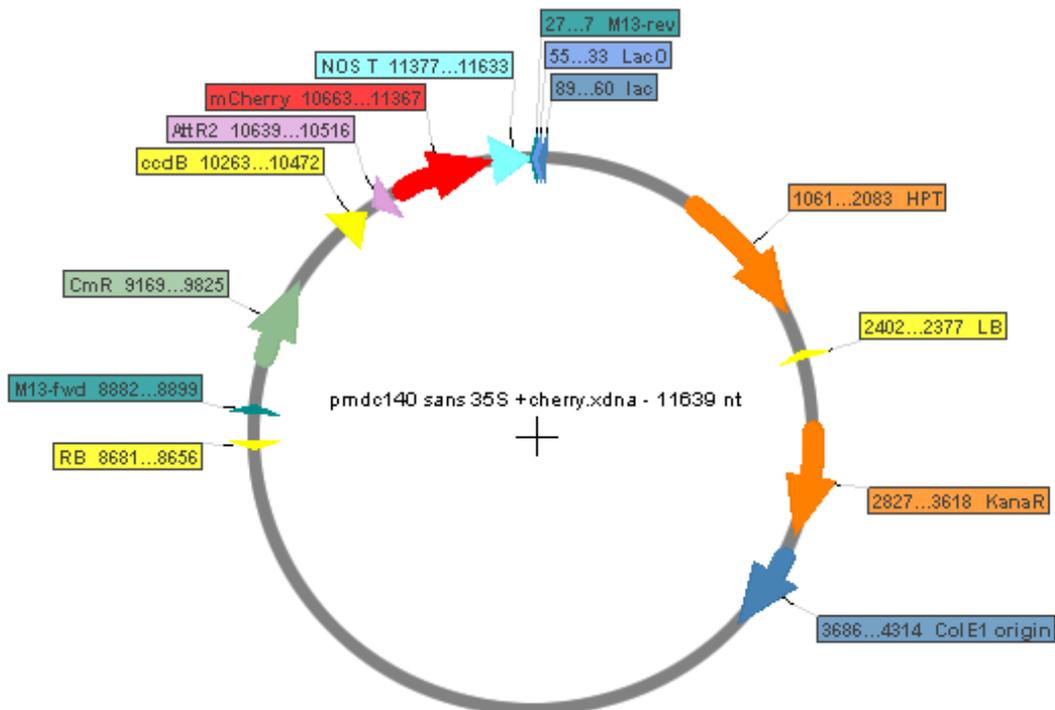
**Figure 78 : Carte du pET9 modifié-PP2-A1-HIS**

Ce vecteur d'expression, contenant PP2-A1, a été réalisé par Julie Beneteau. (Beneteau, 2008) Image: Serial Cloner 2.0 (Serialbasics).



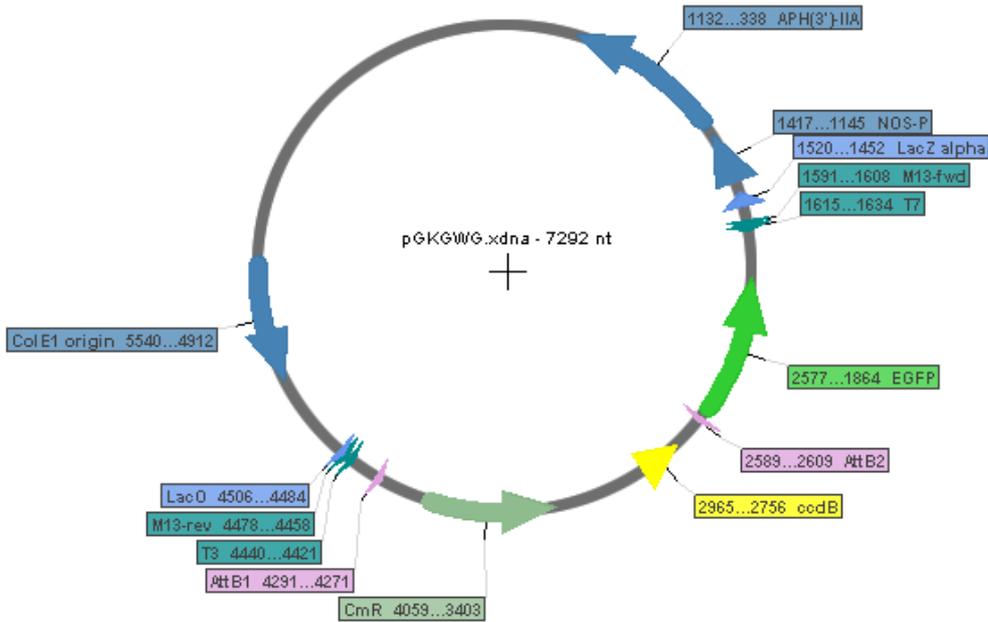
**Figure 79 : Carte du pGEX 3X (GE Healthcare)**

Image: <https://www.lablife.org>; Don de Nathalie Berger, IJPB.



**Figure 80 : Carte du pMDC140 modifié**

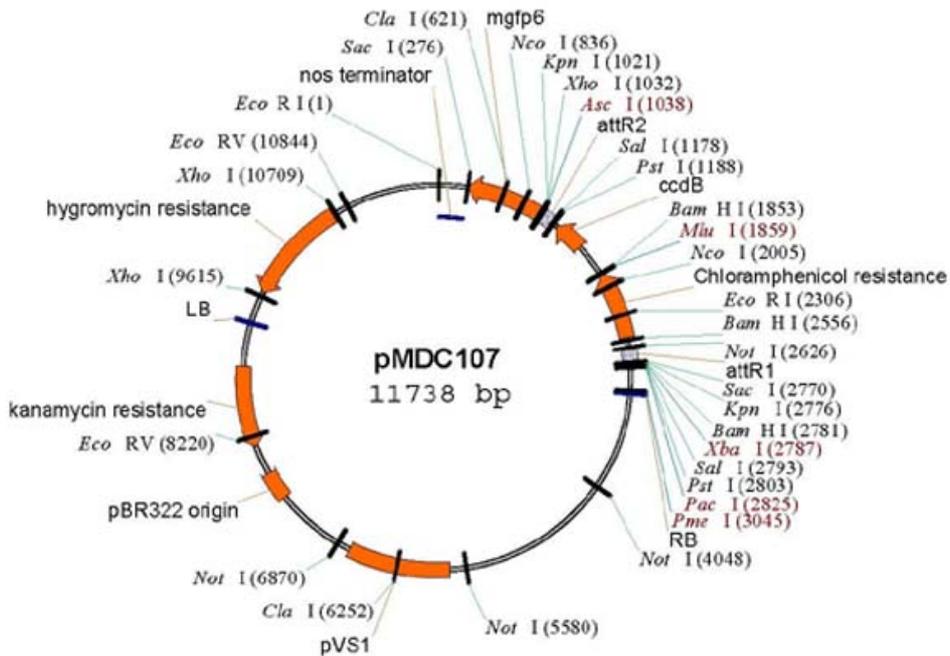
Dans ce vecteur, le promoteur 35S du CaMV a été enlevé. La séquence codante de mCherry, a été clonée à la place de la séquence codante du gène de la  $\beta$ -glucuronidase (GUS). Don de Laurent Ogé, INRA Nantes. Image: Serial Cloner 2.0 (Serialbasics).



**Figure 81 : Carte de pGKGWG.**

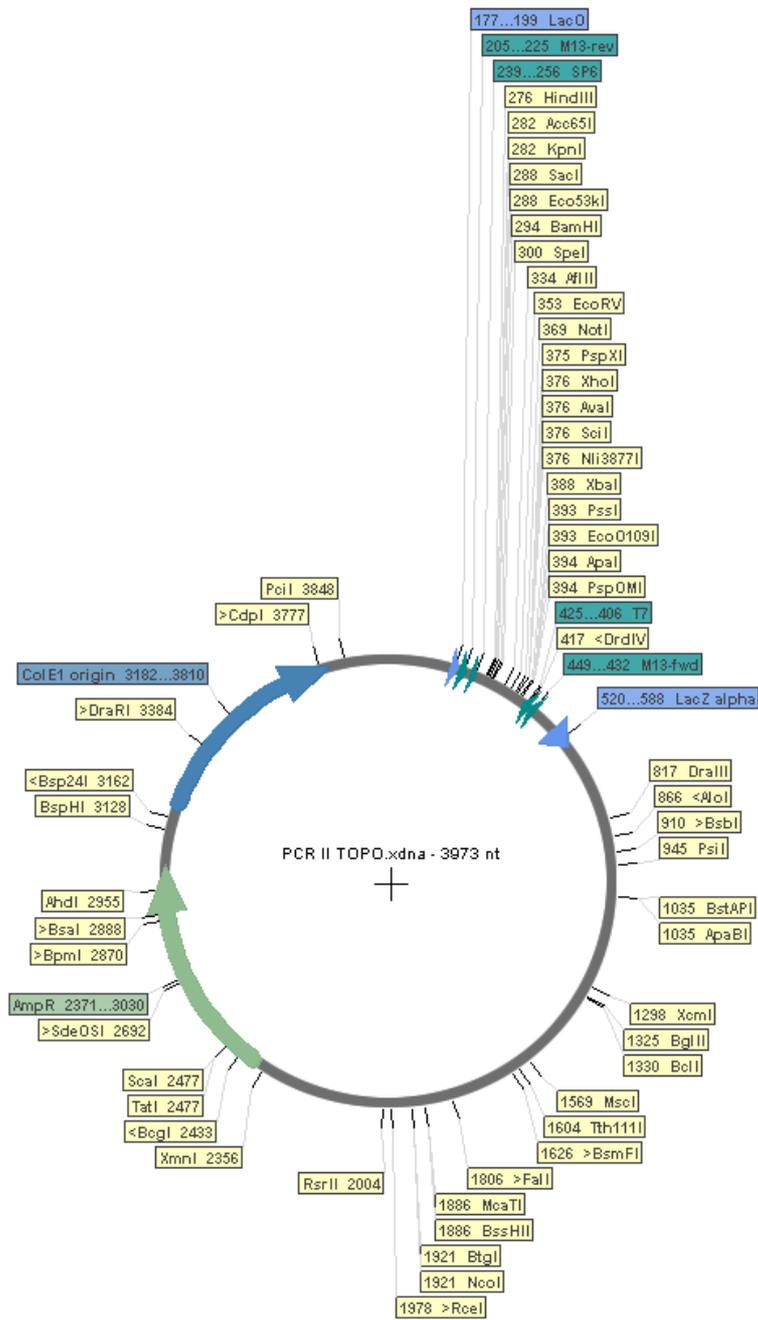
Image: Serial Cloner 2.0 (Serialbasics).

Pour le vecteur pGKGWY, la séquence codante de la E-GFP est remplacée par celle de la protéine fluorescente Venus (YFP). Pour le vecteur pGBGWC, la séquence codante de la E-GFP est remplacée par celle de la protéine fluorescente Cerulean (CFP), et le gène de résistance est remplacé par le gène de résistance au Basta. (Zhong et al., 2008). Ces vecteurs ont été commandés au NASC.



**Figure 82 : Carte du pMDC107**

Image: [<http://www.Arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=vector&id=501100116>]



**Figure 83 : Carte de pCR II TOPO**  
 Vecteur (Invitrogen©). Image: Serial Cloner 2.0 (Serialbasics).

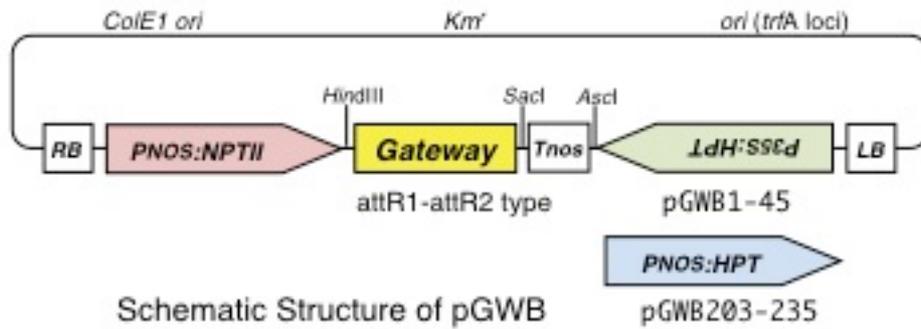


Figure 84 : Carte schématique des vecteurs pGWB et dérivés

Structure schématique des pGWB, dont pGWB1 fait partie. Image: <http://shimane-u.org/nakagawa/gbv.htm>

Tableau 20 : Récapitulatif des 31 PP2 d'Arabidopsis, avec leur numéro AGI

Protéine	Numéro AGI
PP2-A1	AT4G19840
PP2-A2	AT4G19850
PP2-A3	AT2G26820
PP2-A4	AT1G33920
PP2-A5	AT1G65390
PP2-A6	AT5G45080
PP2-A7	AT5G45090
PP2-A8	AT5G45070
PP2-A9	AT1G31200
PP2-A10	AT1G10155
PP2-A11	AT1G63090
PP2-A12	AT1G12710
PP2-A13	AT3G61060
PP2-A14	AT5G52120
PP2-A15	AT3G53000
PP2-B1	AT2G02230
MEE66	AT2G02240
PP2-B2	AT2G02250
PP2-B3	AT2G02270
PP2-B4	AT2G02280
PP2-B5	AT2G02300
PP2-B6	AT2G02310
PP2-B7	AT2G02320
PP2-B8	AT2G02340
PP2-B9	AT2G02350
PP2-B10	AT2G02360
PP2-B11	AT1G80110
PP2-B12	AT5G24560
PP2-B13	AT1G56240
PP2-B14	AT1G56250
PP2-B15	AT1G09155





## Organisation du phloème et analyse fonctionnelle des protéines PP2

### RESUME

Le phloème est un tissu complexe composé de plusieurs types cellulaires, dont les cellules compagnes et les tubes criblés. Il permet le transport et l'allocation à longue distance de nombreux métabolites et de macromolécules. Il existe dans les tubes criblés des structures très spécifiques dont la fonction est inconnue. Par exemple le rôle des protéines phloémiennes PP2 (Phloem Protein 2) qui ont été de longue date décrites dans les tubes criblés, reste à définir. Les protéines PP2 présentent une activité de lectine et d'interaction avec des protéines de sève phloémienne, suggérant un rôle dans le transport de macromolécules dans le phloème.

Nous avons étudié la fonction de deux membres de la famille, PP2-A1 et PP2-A2, chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. Plusieurs approches ont été mises en oeuvre pour étudier ces protéines ; une approche cytologique, la recherche de partenaire protéiques et la création de lignées dérégulées pour l'expression des gènes *PP2*. L'étude de la localisation de PP2-A1 avec des étiquettes fluorescentes dérivées de la GFP a été réalisée par microscopie confocale, dans les cellules compagnes et dans les tubes criblés ; elle a montré que cette protéine présente une localisation nucléo- cytoplasmique dans les cellules compagnes tandis qu'elle forme des agrégats fixés dans les tubes criblés. Ceci suggère que PP2-A1 est ancrée dans les tubes criblés, à la membrane plasmique ou à certains organites. Des résultats similaires ont été obtenus pour PP2-A2. Sur la base de cette première étude, nous permettant d'identifier *in vivo* avec précision les cellules compagnes et les tubes criblés, et en utilisant plusieurs marqueurs subcellulaires fluorescents de référence, nous avons réalisé une cartographie subcellulaire fine des cellules compagnes et des tubes criblés *in vivo*. Cette approche a permis de décrire *in vivo* l'organisation subcellulaire de ces cellules. Elle a révélé la présence de nombreux organites présents à la périphérie des tubes criblés et de nature énigmatique, suggérant une activité importante dans ces cellules, en accord avec des données récentes de protéome des tubes criblés. L'étude de lignées surexprimant des versions étiquetées de *PP2-A1* et *PP2-A2* nous a permis de mettre en évidence un phénotype altéré avec des plantes qui présentent un retard de floraison et une biomasse plus importante. Ces observations suggèrent que *PP2-A1* et *PP2-A2* pourraient avoir un rôle dans la signalisation à longue distance. Ces travaux, qui illustrent la complexité des cellules du phloème, apportent ainsi des éléments nouveaux sur les voies de signalisation à longue distance utilisées par les végétaux pour coordonner leur croissance et leur développement.

Mots clé : Phloème – cellule compagne – microscopie confocale – PP2 – tube criblé

### Phloem organization and functional analysis of PP2 proteins

#### ABSTRACT

The phloem is a complex tissue, made of several cell types, including companion cells and sieve elements. It plays an important role in long-distance transport and allocation of a number of metabolites and macromolecules. The sieve elements display specific structures yet uncharacterized and of unknown function. For instance the function of the phloem specific PP2 proteins (Phloem Protein 2) that have been described for long in the sieve elements is still unclear. PP2 proteins present lectin activity and bind to phloem sap proteins, suggesting a role in the transport of macromolecules in the phloem.

We have investigated the function of two members of this family, PP2-A1 and PP2-A2 in the model species *Arabidopsis thaliana*. Different approaches have been undertaken to study these proteins: a cytological approach, the research of partners, and the study of downregulated and upregulated lines for the *PP2-A1* and *PP2-A2* genes. Localization studies of PP2-A1 fused to GFP-derived fluorescent tags have been realized by confocal laser scanning microscopy in the companion cells and the sieve elements; they showed that PP2-A1 presents a nucleocytoplasmic localization in the companion cells, whereas it forms fixed aggregates in the sieve elements. It suggested that PP2-A1 is anchored to the plasma membrane or to organelles inside the sieve elements. Similar results were obtained for PP2-A2. Making use of this study to accurately identify companion cells and sieve elements *in vivo*, and using additional subcellular fluorescent markers, we realized a fine mapping of companion cells and sieve elements *in vivo*. This study revealed the presence of numerous organelles of unknown identity at the periphery of the sieve elements, suggesting an important activity in those cells consistent with recent proteomics analysis of the sieve tubes. The study of plants overexpressing tagged versions of *PP2-A1* and *PP2-A2* enabled to observe an altered phenotype with delayed flowering and increased biomass, suggesting that PP2-A1 and PP2-A2 may play a role in long distance signalling. This work illustrates the complexity of phloem cell organization and functions, bringing new elements on long distance signalling pathway used by the plants to coordinate their growth and development.

Keywords : Phloem – companion cell – confocal microscopy – PP2 – sieve element