

Université Paris-SUD

Ecole doctorale : Sciences du végétal

Thèse de doctorat :

Biologie

**Dissection génétique et chimogénomique des mécanismes
d'adhésion cellulaire chez les plantes**

Stéphane VERGER

Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech

Mots-clés:

Adhésion cellulaire, plantes, *Arabidopsis thaliana*, paroi, pectines, génétique, chimogénomique, crible suppresseur, séparation cellulaire, Perception de l'intégrité pariétale, O-fucosyltransferases

Introduction :

La paroi des plantes est la première source de biomasse terrestre. Son utilisation est effective dans de nombreux domaines, elle peut-être utilisée par exemple comme matériaux de constructions jusque dans l'industrie pharmaceutique. L'étude de la biosynthèse de la paroi en vue de l'amélioration des plantes, visant à une meilleur adéquation entre la qualité de la paroi et les applications technologiques que l'on veut en faire, est un des challenges scientifiques du 21ème siècle notamment du fait de la pénurie de pétrole (et par conséquent des ses produits dérivés) qui semble inéluctable. D'un point de vue plus fondamental, la paroi peut-être vu comme un exosquelette de la plante, le contrôle de sa synthèse et de ses propriétés physicochimiques est un élément clé dans le contrôle de la croissance, du développement de la plante. La paroi est un compartiment composite principalement constitué de polysaccharides. Ces dernières années certaines des recherches de l'équipe (Bouton et al., 2002, Mouille et al., 2006, Peaucelle et al, 2008) se sont focalisées sur la voie de biosynthèse et de maturation des pectines. Les pectines représentent une fraction non négligeable de la biomasse végétale de la plupart des dicotylédones. Leurs applications sont très diverses et leurs propriétés physicochimiques très originales et variées.

Des travaux récents ont démontré le rôle majeur des pectines, en particulier des Homogalacturonannes (HG), dans les mécanismes d'adhésion cellulaire (Bouton et al., 2002; Mouille et al., 2007). En effet, l'équipe a identifié et caractérisé des mutants d'*Arabidopsis* (*quasimodo 1 et 2*) présentant des défauts d'adhésion cellulaire. Ces défauts semblent corrélés à la diminution d'une fraction polysaccharidique de la paroi, les Homogalacturonannes constituant des pectines. Ces travaux ont permis d'identifier de nouveaux acteurs de la synthèse des Homogalacturonannes : une Galacturonosyltransferase (QUA1/GAUT) et une pectine méthyltransferase putative (QUA2), et d'asseoir le rôle des pectines dans l'adhésion cellulaire. Cependant, les mutants *quasimodo* ne sont pas seulement affectés dans l'adhésion cellulaire. Un allèle du gene *QUASIMODO2* a été isolé dans un crible génétique comme présentant un développement tumoral (*TSD2*) (Krupková et al., 2007) menant dans certaines conditions à la formation d'un cal anormal au lieu des feuilles et des tiges. Un autre allèle de *QUASIMODO2* a été identifié dans un autre crible génétique en tant qu'hypersensible au saccharose (*OSU1*) (Gao et al., 2008). Ces phénotypes pléiotropes nous ont interrogés

sur l'effet que la perte de l'adhésion cellulaire ou la diminution du contenu en HG de la paroi pourrait avoir sur le développement et le métabolisme de la plante. En outre, d'autres mutants sont déficients dans le contenu HG dans leur paroi (guenin et al, 2011; Persson et al, 2007, Xiao et al, 2014..), mais ne sont pas affectés dans l'adhésion cellulaire, ce qui remet en cause le lien réel entre le contenu en HG de la paroi et l'adhésion cellulaire. L'identification récente de *friable1* un mutant affecté dans l'adhésion cellulaire, mais pas dans le contenu en HG (Neumetzler et al., 2012), renforce ce questionnement.

Il est fort probable que les mécanismes en jeu dans l'adhésion cellulaire soient bien plus compliqués que ce que la caractérisation initiale de *qua1* et *qua2* prédit, et devraient impliquer d'autres acteurs moléculaires responsables du défaut d'adhésion cellulaire ainsi que d'autres acteurs moléculaires impliqués dans les autres phénotypes pléiotropes des mutants *quasimodo*.

Le projet de cette thèse visait à l'identification de nouvelles fonctions impliquées dans les mécanismes d'adhésion cellulaire et la synthèse d'Homogalacturonannes chez les plantes via des approches de génétique et de chemogénomique.

Notre principale stratégie pour tenter de répondre à ces questions était d'utiliser une approche de crible génétique « forward » classique mais très efficace. Une mutagenèse EMS des mutants *qua1* et *qua2* a été réalisée et un criblage de mutants supprimeurs a été entrepris avant que j'ai intégré le laboratoire. Une grande partie de ma thèse a consisté en l'identification de la mutation causale qui était responsable de la suppression du défaut d'adhésion cellulaire et la sensibilité au saccharose dans les lignées isolées à partir du crible. J'ai ensuite entrepris la caractérisation de la fonction de l'un de ces gènes et mis en place des expériences pour essayer de comprendre son rôle dans l'adhésion cellulaire.

Une deuxième approche ajoutée au cours de ma thèse était la réalisation d'un crible de suppresseur chemogénomique. Le but du crible était l'identification de petites molécules pouvant restaurer soit le défaut d'adhésion cellulaire, la sensibilité au sucrose ou les deux phénotypes observés dans les mutants *quasimodo*. Cette approche peut être considérée comme complémentaire de l'approche génétique classique puisque les petites molécules peuvent affecter la fonction des gènes qui ne sont généralement pas

isolés lors de cribles génétique en raison de la redondance fonctionnelle ou la létalité des mutations. L'objectif était alors d'essayer d'identifier quelles étaient les cibles protéiques de ces petites molécules et de façon similaire au crible génétique, d'identifier leur rôle dans l'adhésion cellulaire.

En conclusion, l'objectif général de ma thèse était d'identifier la fonction de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans l'adhésion cellulaire et comprendre comment le fait d'affecter leur fonction, impacte l'adhésion cellulaire chez les plantes. Ces mécanismes étant encore très peu connus, l'objectif de ces travaux était aussi l'identification de nouvelles fonctions et de nouveaux gènes encore non-caractérisés.

La combinaison et la complémentarité de ces deux cribles suppresseurs représente une approche innovante et particulièrement efficace. De plus l'originalité du sujet réside en partie dans son aspect pluridisciplinaire comprenant des approches génétique et chimogénomique, et par le fait qu'il se propose de disséquer au niveau moléculaire les mécanismes de contrôle de l'adhésion cellulaire encore mal connue et pressentie comme très complexe.

Résumé des travaux de recherche :

L'adhésion cellulaire chez les plantes est permise par la présence de la paroi dont les composants sont réticulés afin de former un réseau de polysaccharides liant les cellules entre elles. Cependant, la paroi est un compartiment cellulaire dynamique qui participe à la croissance et au développement de la plante, notamment par son relâchement et sa réorganisation constante et nous ne savons pas exactement comment l'adhésion cellulaire est effectivement maintenue dans ces conditions. Afin d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent l'adhésion cellulaire chez les plantes, nous avons utilisé une combinaison de crible génétique suppresseur et de crible chimogénomique suppresseur sur les mutants *quasimodo1* et *quasimodo2* présentant un défaut d'adhésion cellulaire accompagné d'une déficience de synthèse de pectine. Par ces approches nous avons pu isoler des mutants suppresseurs et des molécules chimiques impliquées dans l'adhésion cellulaire. Le crible génétique a conduit à

l'identification et l'étude d'un suppresseur muté dans le gène *ESMERALDA1*, une O-fucosyltransférase putative non caractérisée. L'étude génétique du défaut d'adhésion cellulaire en incluant *friable1*, muté dans une autre O-fucosyltransférase putative, a montré que la mutation de *ESMD1* était suffisante pour supprimer le défaut d'adhésion cellulaire de *qua1*, *qua2* et *frb1*, ce qui en fait un acteur majeur de l'adhésion cellulaire. Le crible chemogénomique a montré l'implication du transport de l'auxine et de l'activité pectin méthylesterase dans le processus contrôlant l'adhésion cellulaire.

Sur la base de ces nouvelles informations, nous avons établi un modèle qui explique la perte de l'adhésion cellulaire chez les mutants *quasimodo* et *friable1*, et à partir de ce modèle, nous avons pu déduire l'existence de mécanismes qui permettent le maintien de l'adhésion cellulaire de façon dynamique au cours de croissance et de développement chez les plantes.

Dissection génétique des mécanismes d'adhésion cellulaire chez les plantes (Chapitre II)

La majeure partie de mon projet de thèse a consisté en l'identification des loci suppresseurs des mutants *quasimodo1* et *quasimodo2* qui ont été isolés à partir d'un écran de suppresseur génétique.

Le criblage a consisté à isoler des lignées de suppresseurs qui ont rétabli une sensibilité à une teneur élevée en saccharose dans le milieu, avec l'idée que ces lignes suppresseur aurait également une restauration de l'adhésion cellulaire ou non. J'ai effectué la cartographie génétique partielle et le séquençage de 7 de ces lignes de suppresseurs et me suis finalement concentré sur deux de ces lignes qui étaient allélique. Ce chapitre de la thèse se concentre sur l'identification et la caractérisation de *ESMERALDA1* (*ESMD1*), un locus suppresseur des mutants *quasimodo1* et *quasimodo2*.

La première partie de ce chapitre décrit le crible suppresseur génétique, l'identification du gène *ESMERALDA1* et une analyse génétique des différents mutants affectés dans l'adhésion cellulaire, ce qui nous conduit à la conclusion que l'adhésion cellulaire chez les plantes doit dépendre d'un rétrocontrôle basé sur l'état des pectines dans la paroi cellulaire.

Dans la deuxième partie, je présente un certain nombre de travaux supplémentaires que j'ai effectué pour élucider la fonction moléculaire de *ESMD1*, ainsi que d'un certain

nombre d'expériences et des analyses phénotypiques des mutants *quasimodo* et du suppresseur *esmeralda1* que j'ai effectuées afin de mieux comprendre l'existence de phénotypes pléiotropes chez *quasimodo* ainsi que comprendre comment la mutation suppresseur peut rétablir l'adhésion cellulaire.

Résumé de la partie : L'adhésion cellulaire chez les plantes est sous le control de O-fucosyltransferases putatives.

L'adhésion cellulaire chez les plantes est médiée par une paroi polysaccharidique et la présence d'une lamelle moyenne riche en pectine (Jarvis et al., 2003). Le déficit de la synthèse de pectine à précédemment été démontré comme conduisant à une perte d'adhésion cellulaire (Bouton et al., 2002; Mouille et al., 2007). Cependant des travaux récents ont indiqué que la perte de l'adhésion cellulaire peut se produire sans une déficience de synthèse de pectines et que la déficience en pectines ne conduit pas toujours à une perte de l'adhésion cellulaire (Persson et al., 2007; Neumetzler et al., 2012; Guénin et al., 2011; Xiao et al., 2014). Nous avons effectué un crible génétique suppresseur sur les mutants *quasimodo1* et *2* déficient en pectine et présentant un défaut d'adhésion cellulaire, ainsi qu'une analyse génétique des différents mutants affectés dans l'adhésion cellulaire. Nos résultats démontrent que la perte de l'adhésion cellulaire n'est pas directement liée à une diminution de la teneur en pectine dans la paroi mais est plutôt corrélé avec l'activation d'une voie de signalisation liée aux pectines. Deux des mutants étudiés affectent des O-fucosyltransférases putatives qui pourraient affecter directement la fonction de récepteur kinases capable de percevoir un défaut des pectines. Nos résultats suggèrent que l'état de l'adhésion des cellules est sous le contrôle d'une boucle de rétrocontrôle positive ou négative pouvant influencer l'adhésion cellulaire. Un tel mécanisme pourrait agir afin de moduler de la force d'adhésion entre les cellules pour faciliter la coordination correcte de la croissance et du développement.

Résumé de la partie : Travaux additionnels sur la fonction de FRIABLE1 et ESMERALDA1

Après l'identification du locus *ESMERALDA1* comme un O-fucosyltransférases putative, j'ai entrepris un certain nombre d'expériences afin de démontrer l'activité catalytique de la protéine et de son homologue FRIABLE1. J'ai aussi essayé de déterminer si les WALL

Associated Kinases (WAKs) o-fucosylés par ces deux enzymes. La mise en place et l'exécution de ces expériences ont pris une quantité considérable de temps, et même si je n'ai pas réussi à démontrer l'activité catalytique et identifier le substrat de ces protéines au cours de ma thèse, ce travail a généré un matériel biologique qui sera utile pour la suite de l'étude de ces protéines.

Les mutants de *quasimodo* présentent un certain nombre de phénotypes pléiotropes en plus du défaut d'adhésion cellulaire: sensibilité au saccharose, le développement tumoral, l'hyperhydricité et la réduction de l'élongation de l'hypocotyle sont quelques-uns des plus frappants. L'étude des mutants et des suppresseurs nous a conduit à rechercher dans des directions différentes pour caractériser et mieux comprendre le lien entre ces différents phénotypes. Certaines de ces expériences sont peu concluantes et auraient besoin de travail supplémentaire pour être exploitées et être informatives pour la caractérisation du défaut d'adhésion cellulaire et sa suppression par *esmd1*. Mais dans l'ensemble ces caractérisations phénotypiques supplémentaires apportent des informations et des idées intéressantes afin de mettre en place des expériences futures.

Dissection chimogénomique des mécanismes d'adhésion cellulaire chez les plantes (Chapitre III)

La deuxième partie de mon projet de thèse a consisté en la sélection et la caractérisation de petites molécules ayant un effet suppresseur sur le défaut d'adhésion cellulaire et / ou la sensibilité au saccharose des mutants *quasimodo1* et *quasimodo2*.

Afin de découpler les deux phénotypes les plus importants chez les mutants de *quasimodo*, j'ai réalisé deux cribles en parallèle. Le criblage consistait en l'identification de petites molécules qui restaurent spécifiquement le défaut d'adhésion cellulaire de *quasimodo* pour l'un des cribles et spécifiquement la sensibilité au saccharose de *quasimodo* pour l'autre crible. L'un des intérêts de cette approche était d'isoler les outils chimiques pour disséquer les phénotypes de *quasimodo*.

Pour ce travail, j'ai eu l'occasion de réaliser le crible chimogénomique dans le laboratoire de Stéphanie Robert (UPSC, Umeå, Suède). J'ai alors entrepris la caractérisation des petites molécules. Dans le cadre de ce travail, j'ai supervisé Clément

Férésini, un étudiant de Master1 qui a effectué une partie des expériences qui sont présentés dans ce chapitre.

Dans ce chapitre je décris le crible chemogénomique, des cribles secondaires, et l'identification de la cible (ou cible putatif pour certains) de certaines des molécules qui ont été isolées dans le crible. Ces résultats révèlent que l'inhibition du transport de l'auxine, ainsi que l'inhibition de l'activité Pectin methylesterase sont suffisants pour restaurer le phénotype de *quasimodo*.

Résumé de la partie

Un certain nombre d'études portant sur les processus développementaux très contrôlés de séparation cellulaire tels que l'abscission des organes floraux ont fait la lumière sur ce qui contrôle la séparation des cellules dans ces événements spécifiques. D'autre part, nous avons une idée assez précises de la façon dont les cellules restent attachées les unes aux autres dans les plantes, mais les mécanismes précis et les acteurs moléculaires qui régulent et maintiennent l'adhésion cellulaire pendant la croissance et le développement, lorsque la paroi cellulaire est constamment synthétisé et remodelé, restent à découvrir. *quasimodo1* et *quasimodo2* sont des mutants d'*Arabidopsis* qui sont déficients dans la synthèse des pectines et qui sont affectés dans l'adhésion cellulaire. Nous rapportons ici le crible chemogénomique ayant mené à l'identification de molécules supprimeurs qui sont capables de restaurer le défaut d'adhésion et la sensibilité au saccharose des mutants *quasimodo*. Nous avons été en mesure d'identifier de manière efficace l'activité de certains de ces composés supprimeurs et confirmé, entre autres hypothèses, que l'inhibition du transport de l'auxine et de l'activité pectine methylestérase (PME) sont tous deux suffisant pour restaurer le phénotype de *quasimodo*. Nous avons également testé l'effet inhibiteur direct de nos composés sur l'activité de PMEs purifiés, et nous avons constaté qu'environ un tiers de ces molécules étaient des inhibiteurs directs de l'activité de PME *in vitro* et étaient capables d'induire une augmentation de l'estérification des homogalacturonanes dans la paroi lors d'un traitement. Cette approche nous a permis d'identifier la cible directe d'un certain nombre de composés supprimeurs, et nous laisse avec une liste plus courte de composés sur lesquels se concentrer pour de futurs travaux de recherche. Cette approche nous fournit également des indications intéressantes sur le rôle du transport

de l'auxine et de l'activité PME sur les mécanismes d'adhésion cellulaire et la sensibilité au saccharose chez les plantes.

Discussion générale

Le travail présenté dans cette thèse illustre l'utilisation de la combinaison de deux approches. Nous avons effectué un crible suppresseur génétique et un crible suppresseur chimogénomique de l'adhésion cellulaire sur les mutants *quasimodo*, et avons isolé un certain nombre de mutants suppresseurs et des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et la sensibilité de saccharose.

Le crible génétique a conduit à l'identification et l'étude d'un suppresseur affecté dans *ESMD1*, une O-fucosyltransférase putative non caractérisée. L'étude génétique de l'adhésion cellulaire, incluant y compris une autre O-fucosyltransférase putative, *FRB1*, a montré que la mutation de *ESMD1* était capable d'entraîner une restauration du défaut d'adhésion cellulaire de *qua1*, *qua2* et *frb1*, ce qui en fait un acteur majeur de l'adhésion cellulaire. Bien que nous n'ayons pas encore pleinement déterminé son rôle, les travaux futurs sur ce gène s'avèreront certainement très important pour la compréhension de l'adhésion cellulaire chez les plantes.

Le crible chimogénomique a montré l'implication du transport de l'auxine et de l'activité de PME dans l'adhésion cellulaire.

Au delà des criblages génétiques et chimogénomiques, ce travail présente l'étude de seulement quelques-uns des acteurs moléculaires que nous avons isolé, et ceux-ci sont déjà en train de changer notre point de vue et notre compréhension des mécanismes de l'adhésion cellulaire chez les plantes.

Perspectives

L'objectif de ce travail était d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans l'adhésion cellulaire, et d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes d'adhésion cellulaire.

Par l'utilisation d'approches sans *a priori* notre objectif était d'essayer d'identifier la fonction de nouveaux gènes non caractérisés. Nous avons isolé et identifié *ESMD1* qui

représentent cet égard un gène non caractérisé d'une famille de gènes à l'intérieur de laquelle aucun des gènes n'ont été caractérisés pour leur fonction catalytique chez les plantes.

L'étude de la fonction putative de ESMD1 et FRB1 nous a conduit à l'hypothèse que ces O-fucosyltransférases putative sont impliqués dans la fucosylation des domaines EGF des protéines WAKs. Cependant, d'autres protéines pourraient en fait être des substrats de ces O-fucosyltransférases putatives comme les SRK qui, pour certaines d'entre elles ont un sites de O-fucosylation conservé. Mais il pourrait y avoir d'autres substrats. La famille des O-fucosyltransférases putatives chez *Arabidopsis* contient 39 membres, et sur la base de notre prédiction inspirée de ce qui est connus du système animal, il n'y aurait que de 15 sites de O-fucosylation conservés sur les protéines d'*Arabidopsis*. Un tel écart entre le nombre d'enzymes et le nombre de cibles putatives pourrait s'expliquer par une forte redondance de certains de ses membres, ou des motifs d'expression de ces gènes très distincts. Mais il est aussi très probable qu'il existe bien plus de substrats potentiels que ce que nous avons estimé. Le défi sera de déterminer réellement quels sont ces substrats chez les plantes. L'étude des O-fucosyltransférases putatives chez les plantes, la caractérisation de leur fonction catalytique et le rôle qu'elles jouent dans le développement de la plante devraient se révéler très intéressants pour de futures recherches.

Références

- Bouton, S., Leboeuf, E., Mouille, G., Leydecker, M.-T., Talbotec, J., Granier, F., Lahaye, M., Höfte, H., and Truong, H.N.** (2002). QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 2577–2590.
- Gao, P., Xin, Z., and Zheng, Z.-L.** (2008). The OSU1/QUA2/TSD2-Encoded Putative Methyltransferase Is a Critical Modulator of Carbon and Nitrogen Nutrient Balance Response in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **3**: e1387.
- Guénin, S. et al.** (2011). Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **192**: 114–126.
- Jarvis, M.C., Briggs, S., and Knox, J.P.** (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment* **26**: 977–989.
- Krupková, E., Immerzeel, P., Pauly, M., and Schmülling, T.** (2007). The TUMOROUS

SHOOT DEVELOPMENT2 gene of Arabidopsis encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. *The Plant Journal* **50**: 735–750.

Mouille, G., Ralet, M.-C., Cavelier, C., Eland, C., Effroy, D., Hématy, K., McCartney, L., Truong, H.N., Gaudon, V., Thibault, J.-F., Marchant, A., and Höfte, H. (2007). Homogalacturonan synthesis in Arabidopsis thaliana requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *The Plant Journal* **50**: 605–614.

Neumetzler, L., Humphrey, T., Lumba, S., Snyder, S., Yeats, T.H., Usadel, B., Vasilevski, A., Patel, J., Rose, J.K.C., Persson, S., and Bonetta, D. (2012). The FRIABLE1 Gene Product Affects Cell Adhesion in Arabidopsis. *PLoS ONE* **7**: e42914.

Persson, S., Caffall, K.H., Freshour, G., Hilley, M.T., Bauer, S., Poindexter, P., Hahn, M.G., Mohnen, D., and Somerville, C. (2007). The Arabidopsis irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxytan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *The Plant Cell* **19**: 237–255.

Xiao, C., Somerville, C., and Anderson, C.T. (2014). POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 Functions in Cell Elongation and Flower Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **26**: 1018–1035.