



**HAL**  
open science

# Rôles de polygalacturonases (PG) dans le développement racinaire, chez *Arabidopsis thaliana*

Gwennaëlle Chen

► **To cite this version:**

Gwennaëlle Chen. Rôles de polygalacturonases (PG) dans le développement racinaire, chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2018. Français. NNT : 2018AMIE0022 . tel-03640685

**HAL Id: tel-03640685**

**<https://theses.hal.science/tel-03640685v1>**

Submitted on 13 Apr 2022

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

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

# Thèse de Doctorat

*Mention Biologie  
Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire*

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

**de l'Université de Picardie Jules Verne**

par

**Gwennaëlle CHEN**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Rôles de polygalacturonases (PG) dans le développement  
racinaire, chez Arabidopsis thaliana*

Soutenue le 04 décembre 2018, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

<b>M<sup>me</sup> S. Vernhettes, Directrice à l'INRA de Versailles</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M<sup>me</sup> V. Legué, Professeur à l'Université de Clermont-Ferrand</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. A. Lehner, Maître de Conférences-HDR à l'Université de Rouen</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. F. Guérineau, Professeur à l'UPJV</b>	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>me</sup> V. Lefebvre, Maître de Conférences à l'UPJV</b>	<b>Membre invité</b>
<b>M O. Van Wuytswinkel, Professeur à l'UPJV</b>	<b>Directeur</b>

# Laboratoire d'accueil

Ces travaux de thèse ont été réalisés au laboratoire BIOPI (Biologie des Plantes et Innovation ; EA3900), situé au 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex 1.

Tél. : (+33) 3 22 82 76 48

# Remerciements

*Je souhaiterais remercier en premier lieu les membres du jury, pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie donc Samantha Vernhettes et Valérie Legué en tant que rapportrices, ainsi qu'Arnaud Lehner et François Guérinau en tant qu'examinateurs.*

*Merci également à Valérie Lefebvre d'avoir accepté de faire partie du jury en tant que membre invité, et surtout d'avoir pris le temps de relire et de corriger ma thèse, dans un délai très court. Merci mille fois !*

*Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse Olivier Van Wuytswinkel, pour son soutien infaillible durant ces trois ans de thèse. Merci pour ton encadrement, le partage de tes connaissances, tes schémas explicatifs, ta patience, ta compréhension, ta confiance, ton soutien moral, et tout ce que tu m'as apporté durant ma thèse. Merci pour les manip que tu as réalisées, qui t'ont fait remettre ta blouse blanche. Merci de m'avoir aidé à faire de moi la scientifique que je suis aujourd'hui, de m'avoir aidé à progresser, à prendre mes marques et de l'assurance. Aujourd'hui, si je suis fière du travail accompli, c'est en grande partie grâce à toi. Merci pour tout cela.*

*Merci également aux collaborateurs qui ont participé à ce projet. Merci à Mélanie Venant et Tom Beeckman du VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) à Gand (Belgique), ainsi que Patrick Schäfer de l'Université de Warwick (Royaume-Uni), pour leur analyse de certaines de nos plantes transformées. Merci aussi à Maïté Vicré et Azeddine Driouich de l'Université de Rouen Normandie (France), pour leur aide pour l'étude des BLC, et pour leur accueil au sein du Glyco-MEV. Je remercie également Renze Heidstra de l'Université de Wageningen (Pays-Bas), pour nous avoir procuré les plantes transformées permettant d'étudier les gènes cibles du facteur de transcription PLETHORA2. Enfin, j'aimerais remercier l'équipe de Shinichiro Sawa de l'Université de Kumamoto (Japon), pour leur étude sur l'une de nos PG d'intérêt, à propos de la réponse des plantes face à l'attaque de nématodes.*

*Je souhaite ensuite remercier l'ensemble de l'équipe BIOPI, à qui je dois également un accueil, un soutien, et une ambiance au quotidien très agréable. Merci d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions, de m'avoir aidé à trouver des solutions à mes problèmes, de m'avoir soutenu, pour ma thèse mais aussi pour mes enseignements.*

*Merci aux personnes qui m'ont aidées à réaliser mes expériences, notamment Françoise Fournet. Un grand merci pour ton aide pour les expressions transitoires en feuilles de tabac (une manip longue et laborieuse), et pour la réalisation des coupes au microtome (une manip très très très longue et très très très laborieuse). Merci également à Corinne Pau et son stagiaire Ousmane Dia, qui m'ont fait gagner un temps précieux par rapport aux expressions hétérologues en levure. Enfin, merci à Solène Bassard, qui nous fait gagner à tous un temps*



*Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai passé de bons moments au QG de BIOPI, l'éternel GoodNess, les BIOPIens comme les non-BIOPIens. J'ai beaucoup apprécié ce RDV bi-hebdomadaire avec vous durant ma thèse. Merci notamment à Thomas Defort'escu, grâce à qui je me suis sentie vite intégrée.*

*J'aimerais aussi remercier mes anciens camarades du Glyco-MEV, puisqu'eux aussi m'ont toujours apporté leur soutien durant ma thèse. Merci pour votre bonne humeur, vos blagues foireuses, vos taquineries (ah non pas pour ça en fait :p), et vos conseils. Merci également à Roxy, Cyril et Gaby, parce que votre amitié m'est précieuse. Et merci à tous ceux qui feront le déplacement à Amiens pour ma soutenance <3.*

*Je tiens également à remercier ma famille, mes parents et mon frère, pour leur soutien et amour inconditionnel. Merci d'être toujours là pour moi. Merci pour les 15 jours de rédaction au frais en bord de mer pendant la canicule, et de m'avoir permis de rédiger sans me soucier de rien, presque en vacances. Je vous aime fort <3. Merci aussi à mon chat, pour les rares moments de silence qu'il a daigné m'offrir pendant ma rédaction. C'est pas censé dormir tout le temps un chat ?? Je pense que le mien présente un dysfonctionnement quelque part.*

*Enfin, un immense merci à ma moitié, mon Amour. Merci pour tout. Pour ton aide d'un point de vue scientifique, tes conseils et tes suggestions, ton expertise statistique, le partage de tes connaissances. Merci d'être toujours prêt à m'aider, qu'importe l'heure et le jour, et de m'avoir accompagnée au labo le week-end. Merci aussi d'avoir relu ma thèse pour corriger les dernières coquilles. Merci pour ton soutien, tes encouragements, ta compréhension, ta patience. Merci d'avoir été aux petits soins pour moi, d'avoir tout géré à l'appart pour me laisser plus de temps pour travailler, ou pour me reposer. Merci pour les massages pour délasser les nœuds de mon dos à force de rédiger dans de mauvaises positions, même si tu n'aimes pas ça. Merci pour tous ces sacrifices que tu as fait pour moi et ma rédaction <3. Merci pour les bonnes pâtisseries que tu nous fais, notamment ce délicieux cake aux pommes-noix de coco que j'aime tant. Merci pour ta bonne humeur, pour ton grain de folie, que tu essaies de cacher en public, qui me fait tant rire. Merci de ne pas avoir balancé mon chat par la fenêtre, malgré ses sérénades (oui je sais c'est tentant parfois). Merci d'être toi, et d'être là pour moi. Merci d'être entré dans ma vie <3. あたしはあなたが大好きです <3 <3.*



# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I. La paroi cellulaire végétale.....</b>	<b>1</b>
I.1. Contexte global.....	1
I.2. Les différents constituants de la paroi et leur synthèse.....	2
I.3. Agencement des polysaccharides pariétaux .....	20
<b>Chapitre II. La croissance des plantes et l'élongation cellulaire .....</b>	<b>23</b>
II.1. Mécanismes et contrôles de l'élongation cellulaire .....	24
II.2. La paroi des cellules en expansion .....	25
II.3. Mécanismes qui interviennent après l'élongation cellulaire .....	31
<b>Chapitre III. Les racines.....</b>	<b>33</b>
III.1. Fonction et structure du système racinaire.....	33
III.2. Structure d'une racine primaire d' <i>A. thaliana</i> .....	33
III.3. La croissance racinaire.....	34
III.4. Formation des racines latérales .....	42
<b>Chapitre IV. Les protéines à ancre GPI.....</b>	<b>44</b>
IV.1. Structure de l'ancre GPI .....	44
IV.2. Fonctions des GPI-AP .....	45
IV.3. Synthèse des ancres GPI.....	46
IV.4. Maturation des GPI-AP.....	46
IV.5. Sécrétion des GPI-AP .....	47
IV.6. Association des GPI-AP aux microdomaines lipidiques.....	48
IV.7 Connexion entre la paroi et la membrane .....	49
IV.8 Prédiction de la modification des protéines par l'ajout d'une ancre GPI.....	49
<b>Chapitre V. Objectifs de la thèse .....</b>	<b>51</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>53</b>
<b>Chapitre I : le matériel .....</b>	<b>53</b>
I.1. Matériel végétal .....	53
I.2. Culture de bactéries .....	56
I.3. Culture de levures .....	57
<b>Chapitre II : Biologie moléculaire .....</b>	<b>59</b>
II.1. Extractions d'acides nucléiques.....	59
II.2. Amplification de l'ADN par PCR.....	62
II.3. Visualisation des acides nucléiques sur gel d'agarose .....	62
II.4. Étude de l'expression des gènes par RT-qPCR.....	63
II.5. Sélection des mutants Knock-Out par PCR .....	65
II.6. Clonages .....	66
II.7. Création de plantes transformées.....	74
II.8. Transformation de levures <i>Pichia pastoris</i> .....	77
<b>Chapitre III : Biochimie .....</b>	<b>80</b>
III.1. Extraction et analyses de PG pariétales .....	80
III.2. Production, extraction et analyses de PG produites par <i>Pichia pastoris</i> .....	82



<b>Chapitre V : Imagerie micro et macroscopique .....</b>	<b>93</b>
V.1. Préparation d'échantillons GUS .....	93
V.2. Observations .....	94
<b>Chapitre VI : Analyses statistiques .....</b>	<b>96</b>
VI.1. Logiciel utilisé .....	96
VI.2. Nécessité d'analyses statistiques .....	96
VI.3. Tests réalisés .....	96
VI.4. Mise en forme des résultats.....	96
<b>Résultats.....</b>	<b>97</b>
<b>Chapitre I : Recherche des gènes candidats .....</b>	<b>97</b>
I.1. Recherche d'une PG candidate à ancre GPI .....	97
I.2. Recherche d'une PG sans ancre GPI exprimée dans la racine .....	100
<b>Chapitre II : Localiser l'expression des gènes .....</b>	<b>102</b>
II.1. Localisation de l'expression à l'échelle tissulaire .....	102
II.2. Précision de la zone d'expression tissulaire .....	104
<b>Chapitre III : Localisation cellulaire des PG .....</b>	<b>107</b>
III.1. Approche en expression transitoire en feuilles de tabac .....	107
III.2. Approche en expression stable dans <i>A. thaliana</i> .....	108
<b>Chapitre IV : Etude de la fonction des PG <i>in planta</i> .....</b>	<b>110</b>
IV.1. Mutants et sur-expresssurs <i>pg ram</i> et <i>pg r</i> disponibles .....	110
IV.2. Rôles des PG dans la croissance et l'élongation cellulaire .....	113
IV.3. Rôles des PG dans la production de racines latérales .....	117
IV.4. Activité PG globale <i>in planta</i> .....	118
IV.5. Fonction de PG R dans le détachement des cellules de la coiffe latérale .....	119
IV.6. Expression des PG en réponse à une blessure abiotique.....	121
IV.7. Contrôle de l'expression des gènes <i>PG R</i> et <i>PG RAM</i> .....	121
<b>Chapitre V : Etude de l'activité enzymatique des PG <i>in vitro</i> .....</b>	<b>125</b>
V.1. Production des PG en système hétérologue .....	125
V.2. Caractérisation de l'activité PG <i>in vitro</i> .....	126
<b>Discussion et conclusion .....</b>	<b>129</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>144</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>151</b>
<b>Liens internet .....</b>	<b>174</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>175</b>

# Liste des figures

<i>Figure 1: Schéma d'une cellule végétale.....</i>	<i>1</i>
<i>Figure 2: La paroi cellulaire végétale.....</i>	<i>1</i>
<i>Figure 3 : Hétérogénéité structurale des polysaccharides pariétaux chez les plantes.....</i>	<i>2</i>
<i>Figure 4 : Modèle de la machinerie cellulaire permettant la synthèse de la cellulose.....</i>	<i>3</i>
<i>Figure 5 : Structure primaire des Homogalacturonanes (HG).....</i>	<i>5</i>
<i>Figure 6 : Mode d'action théorique des enzymes de modification des HG (HGME).....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 7 : Modèle des caractéristiques structurales majeures du rhamnogalacturonane de type I (RG-I). ....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 8 : Représentation schématique d'un arabinogalactan de type II (AGP).....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 9 : Séquence glycosidique du rhamnogalacturonane II (RG-II).....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 10 : Deux molécules de rhamnogalacturonane de type II (RG-II) liées entre-elles de façon covalente via un bore-diol ester 1:2.....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 11 : L'appareil de Golgi chez les plantes.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 12 : Modèle de régulation des mouvements de l'appareil de Golgi et de la sécrétion contrôlée de polysaccharides.....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 13 : Différents modèles des complexes pectiques proposés dans la littérature. A) Modèle du réseau pectique selon Nakumura et al., 2002 et Matsuhashi et al., 1993.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 14 : Ancien modèle de la structure de la paroi cellulaire.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 15 : Nouveau modèle théorique de la structure de la paroi cellulaire.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 16 : La croissance primaire et secondaire chez les végétaux.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 17: Modèle de la dynamique des microfibrilles de cellulose durant l'extension longitudinale de la paroi cellulaire.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 18 : Mise en évidence de la relation entre la forme des cellules, l'orientation des microfibrilles de cellulose, et la résistance mécanique des tissus.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 19 : Différenciation entre le réseau racinaire fasciculé et le système racinaire pivotant.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 20 : Organisation tissulaire d'un apex racinaire d'A. thaliana.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 21 : Formation du cortex, de l'endoderme, de l'épiderme et, de la coiffe latérale par division anticline puis péricle.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 22 : Différences d'épitopes (pectines hautement ou faiblement méthylestérifiées) à l'apex racinaire d'A. thaliana.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 23 : Transport de l'auxine à la pointe racinaire à la façon d'une fontaine inversée.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 24 : Maintien du méristème apical racinaire par différents facteurs de transcription.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 25 : Gradient du facteur de transcription PLETHORA (PLT) permettant de contrôler l'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 26 : Induction de la transcription des cibles de PLETHORA (PLT).....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 27 : Domaine d'expression des gènes IAA2, PLT1, PLT2, PLT3 et PLT4.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 28 : Le gradient d'expression de PLT2 n'est pas une réponse du gradient d'auxine.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 29 : Etapes de formation du primordium de racine latérale.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 30 : Mécanismes impliqués dans le positionnement des racines latérales le long des axes longitudinal et axial de la racine source.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 31 : Structure générale des ancrs GPI.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 32 : Transformation post-traductionnelle d'une protéine en GPI-AP.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 33 : Carte du plasmide pAC161 à l'origine des lignées mutantes GABI-KAT.....</i>	<i>53</i>
<i>Figure 34 : Carte du vecteur pROK2 contenant l'ADN-T utilisé pour générer les mutants SALK.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 35 : Chambre ouverte de la Phénobox.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 36 : Extraction d'ARN totaux avec le kit « RNeasy® Plant mini kit » (QIAGEN®).....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 37 : Bioanalyseur « Agilent RNA 6000 Nano Assay » et puce « Nano chip » à ARN.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 38 : Résultats sous forme d'électrophorégrammes fournis par le bioanalyseur « Agilent RNA 6000 Nano Assay ».....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 39 : Principe de la RT-qPCR en temps réel avec une sonde TaqMan (Termo Fisher scientific).....</i>	<i>63</i>

<i>Figure 40 : Schématisation du géotypage des mutants PG K-O, effectué par amplification par PCR.</i>	65
<i>Figure 41 : Cartographie du plasmide pENTR™ Directional TOPO® (Invitrogen™, Life Technologies™, Thermo Fisher scientific).</i>	66
<i>Figure 42 : Principe de ligation d'un produit PCR avec une séquence CACC au vecteur pENTR™ D TOPO®.</i>	67
<i>Figure 43 : Principe de la recombinaison Gateway.</i>	67
<i>Figure 44 : Cartes des plasmides pKGWFS7.1 et pK2GW7.</i>	68
<i>Figure 45 : Carte des vecteurs pPICZα A, pPICZα B et pPICZα C (Invitrogen™, TerhmoFisher™).</i>	68
<i>Figure 46 : Principe de l'assemblage des 6 modules Greengate grâce à à l'enzyme de restriction Bsa I.</i>	70
<i>Figure 47 : Transmission de l'ADN-T à la génération T2.</i>	76
<i>Figure 48 : Quantité (en grammes) de sulfate d'ammonium à ajouter en fonction du pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium initial, et du pourcentage de saturation final désiré.</i>	84
<i>Figure 49 : Transfert d'un gel d'électrophorèse sur membrane : Montage du gel d'acrylamide SDS-PAGE, de la membrane PVDF, et des papiers Whatman® imbibés de différents tampon, pour le transfert de protéines en système semi-sec.</i>	88
<i>Figure 50 : Conversion du DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) en ANS (acide 3-amino-5-nitrosalicylique) par les sucres réducteurs.</i>	90
<i>Figure 51 : Résultats de la recherche de protéines présentant une ancre GPI putative parmi les PG d'A. thaliana (d'après PredGPI).</i>	97
<i>Figure 52 : Représentation schématique des séquences génomiques de AT3G1720, AT3G48950 et AT1G60390</i>	98
<i>Figure 53 : Probabilité de la présence d'une ancre GPI chez les quatres isoformes de la protéine AT3G15720 (d'après PredGPI).</i>	98
<i>Figure 54 : Localisation de l'expression des gènes AT3G15720, AT3G48950 et AT1G60390 selon l'Arabidopsis EFP browser.</i>	99
<i>Figure 55 : Localisation de l'expression du gène AT3G06770 selon l'Arabidopsis EFP browser.</i>	100
<i>Figure 56 : Représentation schématique des séquences génomiques des cinq variants du gène AT3G06770.</i>	100
<i>Figure 57 : Localisation de l'activité des promoteurs des gènes AT3G15720 (PG RAM) et AT3G06770 (PG R) dans différents organes de plantules d'A. thaliana (gènes rapporteurs GUS).</i>	102
<i>Figure 58 : Expression des gènes AT3G15720 (PG RAM) et AT3G06770 (PG R) au cours de l'émergence des racines latérales.</i>	103
<i>Figure 59 : Localisation de l'expression des gènes PG R et PG RAM au niveau des racines (gènes rapporteurs GFP-NLS).</i>	104
<i>Figure 60 : Expression hétérologue et transitoire des constructions 35S::PG-eYFP (PG R, PG RAM pleine longueur et PG RAM tronquée) en feuilles de tabac.</i>	107
<i>Figure 61 : Localisation subcellulaire de la protéine PG RAM pleine longueur dans des transformants stables d'A. thaliana portant la construction 35S::eYFP-PG RAM (pleine longueur) au niveau de la racine et de l'hypocotyle.</i>	108
<i>Figure 62 : Transformants PG-eYFP réalisés en fond sauvage (A) ou en fond mutant (B et C).</i>	109
<i>Figure 63 : Lieu d'insertion des ADN-T GABI-KAT et SALK dans les mutants pg r et pg ram.</i>	110
<i>Figure 64 : Vérification de l'absence de transcrits PG R et PG RAM chez les mutants respectifs pg r ainsi que pg ram1 et pg ram3, par amplification d'ADN par PCR.</i>	111
<i>Figure 65 : Expression relative des gènes PG R et PG RAM chez le sauvage, les mutants pg r, pg ram1 et pg ram3.</i>	111
<i>Figure 66 : Expression relative des gènes PG R et PG RAM chez le sauvage et les sur-expresssurs 35S::PG R.</i>	113
<i>Figure 67 : Croissance de la racine primaire des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 ainsi que des sur-expresssurs 35S::PG R.</i>	113
<i>Figure 68 : Croissance de la racine primaire des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 suivant différentes conditions de culture.</i>	114
<i>Figure 69 : Croissance de la racine primaire des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 suivant différentes concentrations en calcium (CaCl<sub>2</sub>).</i>	115
<i>Figure 70 : Croissance d'hypocotyles étiolés des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 ainsi que des sur-expresssurs 35S::PG R.</i>	115

<i>Figure 71 : Motifs d'expressions GUS des gènes PG R et PG RAM après passage de plantules de 5 jours à l'obscurité (symbolisée par une lune) ou après passage d'hypocotyles étiolés de 3 jours à la lumière (symbolisée par un soleil).....</i>	116
<i>Figure 72 : Production de racines latérales (longueur de la zone de branchement, densité de racines latérales) par les mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 chez des plantules de 10 jours.....</i>	118
<i>Figure 73 : Dosage des protéines extraites de feuilles et de racines de plantes sauvages Col-0, pg r, pg ram1, pg ram3, et des sur-expresseurs 35S::PG R, et dosage de l'activité PG globale.....</i>	119
<i>Figure 74 : Etude des cellules bordantes (BLC) du mutant pg r.....</i>	120
<i>Figure 75 : Activité des promoteurs des gènes PG R et PG RAM après une blessure abiotique.....</i>	121
<i>Figure 76 : Croissance des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 sur auxine (IAA) ou NPA.....</i>	122
<i>Figure 77 : Activité des promoteurs des gènes PG R et PG RAM (gènes rapporteurs GUS) au niveau de l'apex racinaire de plantes cultivées sur auxine (IAA) ou sur NPA.....</i>	123
<i>Figure 78 : Expression des gènes PG R et PG RAM chez le mutant plt1 plt2, transformé par la construction 35S::PLT-GR, avec ou sans induction par la dexaméthasone.....</i>	124
<i>Figure 79 : Expression des protéines PG R, PG RAM PL et PG RAM T en système hétérologue, et caractérisation in vitro.....</i>	125
<i>Figure 80 : Mode d'action des différentes PG : Endo-, Exo- et rhamno-PG (comprenant les endo- et les exo-RG).....</i>	129
<i>Figure 81 : Analyse de l'évolution des gènes PG, nombre de PG chez différentes espèces végétales, et proportion des différents clades pour chaque espèce.....</i>	129
<i>Figure 82 : Hypothèses des fonctions de PG R.....</i>	131
<i>Figure 83 : Suppositions du contrôle de l'expansion cellulaire et de l'activation des défenses des plantes par les WAK.....</i>	134
<i>Figure 84 : Hypothèses des liens entre PG R et les WAK dans les contextes de croissance et de blessures....</i>	136
<i>Figure 85 : Hypothèse de la fonction de PG RAM.....</i>	138

# Liste des tableaux

<u>Tableau 1 : Anticorps spécifiques des HG</u> .....	9
<u>Tableau 2 : Lignées mutantes utilisées</u> .....	53
<u>Tableau 3 : Composition des mélanges réactionnels de PCR selon la Taq polymérase utilisée</u> .....	62
<u>Tableau 4 : Cycles PCR suivant la Taq utilisée</u> .....	62
<u>Tableau 5 : Amorces et sondes FAM pour la réalisation des RT-qPCR avec les sondes TaqMan® (Thermo Fisher scientific)</u> .....	63
<u>Tableau 6 : Amorces permettant de cloner les promoteurs et les séquences codantes des gènes d'intérêt dans le vecteur d'entrée pENTR™ D TOPO®</u> .....	66
<u>Tableau 7 : Amorces permettant le clonage des séquences codantes des PG d'intérêt dans le vecteur pPICZα B</u> .....	69
<u>Tableau 8 : Amorces pour réaliser différents clonages Greengate</u> .....	70
<u>Tableau 9 : Programmes possibles de la réaction Greengate finale au thermocycleur</u> .....	71
<u>Tableau 10 : Constructions Greengate réalisées durant la thèse</u> .....	71
<u>Tableau 11 : Résistance aux antibiotiques de différents vecteurs</u> .....	72
<u>Tableau 12 : Composition des gels de séparation et de concentration qui composent les gels électrophorèse de type SDS-PAGE, de 12 et 15 %</u> .....	87
<u>Tableau 13 : Programmes de transfert de protéines sur membrane (PVDF ou nitrocellulose) pour Western blot</u> .....	88
<u>Tableau 14 : Spectres d'émission et d'excitation des fluorophores utilisés</u> .....	95

# Liste des abréviations

- 2Me-Fuc : 2-*O*-methyl fucose
- 2Me-Xyl : 2-*O*-methyl xylose
- AA : acides aminés
- ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
- AceA : aceric Acid
- ACR4 : ARABIDOPSIS CRINKLY 4
- ADNc : ADN complémentaire
- ADNg : ADN génomique
- ADN-T : ADN de transfert
- AGA : apiogalacturonane
- AGP : arabinogalactan protein
- AIL : AINTEGUMENTA-LIKE
- ANS : 3-amino-5-nitrosalicylic acid
- AP1 : ADENOSINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE
- Api : apiose
- APS : ammonium persulfate
- ARF : auxin respons factor
- BC : cellule bordante
- BD : bordure droite
- BET : bromure d'éthidium
- BG : bordure gauche
- BLC : border-like cell
- BMGY : buffered glycerol complex medium
- BMMY : buffered methanol-complex medium
- CALS : callose synthase
- CAZY : carbohydrate active enzyme
- CBP : cellulose binding protein
- CDS : coding DNA sequence
- CE : carbohydrate esterase
- CESA : cellulose synthase
- CFP : cerulean florescent protein
- CLA : CLATHERIN
- CLE : CLV3/EMBRYO SURROUNDING REGION (ESR)
- CLE40 : CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION 40
- Col-0 : columbia-0
- COS : chitosan oligosaccharide
- CT : cycle threshold
- CW : cell wall
- DAB : 3,3' -diaminobenzidine tetrahydrochloride
- DAMPS : damage associated molecular patterns
- DHA : acide docosahexaénoïque
- DM : degré de méthylesterification
- DNS : 3,5-dinitrosalicylic acid
- dNTPs : désoxynucléotides tri-phosphate
- DO : densité optique
- DP : degré de polymérisation
- DTT : dithiothréitol
- EDTA : éthylènediaminetétraacétique
- EF1 $\alpha$  : eukaryotic translation elongation factor 1 alpha
- EFP : electronic fluorescent pictograph
- eYFP : enhanced yellow fluorescent protein
- F : forward
- FT : flow through
- FTIR : fourier transform infrared
- GalA : acides galacturoniques
- GFP : green florescent protein
- GH : glycoside hydrolase
- GPI : glycosylphosphatidylinositol
- GPI-AP : GPI-anchored protein
- GR : récepteur aux glucocorticoïdes
- GRF : GROWTH-REGULATION FACTOR
- GUS : beta-glucuronidase
- HF : high fidelity
- HG : homogalacturonane

- HGME : HG modifying enzyme
- His : histidine
- HRGP : hydroxyproline-rich glycoprotein
- IAA : indole-3-acetic acid
- IHF : integration host factor
- KD : knock-down
- Kdo : keto-deoxyoctulosonate
- $K_m$  : constante de Michaelis
- KO : knock-out
- LB : lysogeny broth
- LC-MS : liquid chromatography - mass spectrometry
- L-Gal : L-galactose
- LiCl : chlorure de lithium
- LRR-RLK : leucin-rich repeat receptor-like kinase
- LTPG : GPI-linked lipid transfer protein
- MES : acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique
- $MgCl_2$  : magnesium chloride
- MS : murashige et skoog
- $Na_2$  : disodium
- NaCl : chlorure de sodium
- NaOH : sodium hydroxide
- NEB : new england biolabs
- Ni : nickel
- NLS : nuclear localization sequence
- *nolac* : *nonorganogenic callus with loosely attached cells*
- NPA : 1-N-naphthylphthalamic acid
- OG : oligogalacturonide
- p/p : poids/poids
- p/v : poids/volume
- PAE : pectin acetylerase
- PAT : polar auxin transport
- PCR : polymerase chain reaction, ou réaction en chaîne par polymérase
- PEG : polyéthylène glycol
- PEX4 : PEROXIN4
- PG : polygalacturonase
- PGA : polygalacturonic acid
- PGIP : inhibiteur de polygalacturonase
- pI : point isoélectrique
- PIN : pinformed
- PI-PL : phosphatidylinositol-specific phospholipases
- PL : pleine longueur
- PL1 : polysaccharide lyase 1
- PLL : pectate lyase-like
- PLT : PLETHORA
- PM : plasma membrane
- PME : pectin methylesterase
- PMEI : pectin methylesterase inhibitor
- Prom : promoteur
- PS : peptide signal
- $P_v$  :  $P_{value}$
- PVDF : polyvinylidène difluoride
- R : reverse
- RAM : root apical meristem
- RCPG : ROOT CAP POLYGALACTURONASE
- RE : réticulum endoplasmique
- RFP : red florescent protein
- RG-I : rhamnogalacturonane de type I
- RG-II : rhamnogalacturonane de type II
- Rha : rhamnose
- RIN : RNA integrity number
- RL : racines latérales
- RMN : résonance magnétique nucléaire
- ROS : reactive oxygen species
- rpm : rotation per minute
- RT qPCR : real-time reverse transcription polymerase chain reaction
- RuBisCO : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
- RWA : reduced wall acetylation
- SCR : SCARECROW

- SDS : sodium dodecyl sulfate
- SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
- SHR : SHORT ROOT
- SMB : SOMBRERO
- SOC : super optimal broth
- T : tronquée
- TAE : tris-acétate-EDTA
- TAIR : the Arabidopsis Information Ressource
- TD : tandem duplication
- TEMED :N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
- TGN : trans-Golgi network
- TGS : tris glycine SDS
- Ti : tumor-inducing
- TIP41 : TIP41-like protein
- Tm : melting temperature
- TrisHCl : trisaminométhane hydrochloride
- UDP : uridine diphosphate-glucose
- UV : ultraviolet
- v/v : volume/volume
- V<sub>m</sub> : vitesse maximale
- WDG : whole genome duplication
- WUS : WUSCHEL
- XET : xyloglucane endotransglucosylase
- XGA : xylogalacturonane
- X-Gluc : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl β-D-glucuronide
- XTH : xyloglucanes endotransglucosylases / hydrolases
- YFP : yellow fluorescent protein
- YPD : yeast extract peptone dextrose
- YPDS : yeast extract peptone dextrose + sorbitol







# Préambule

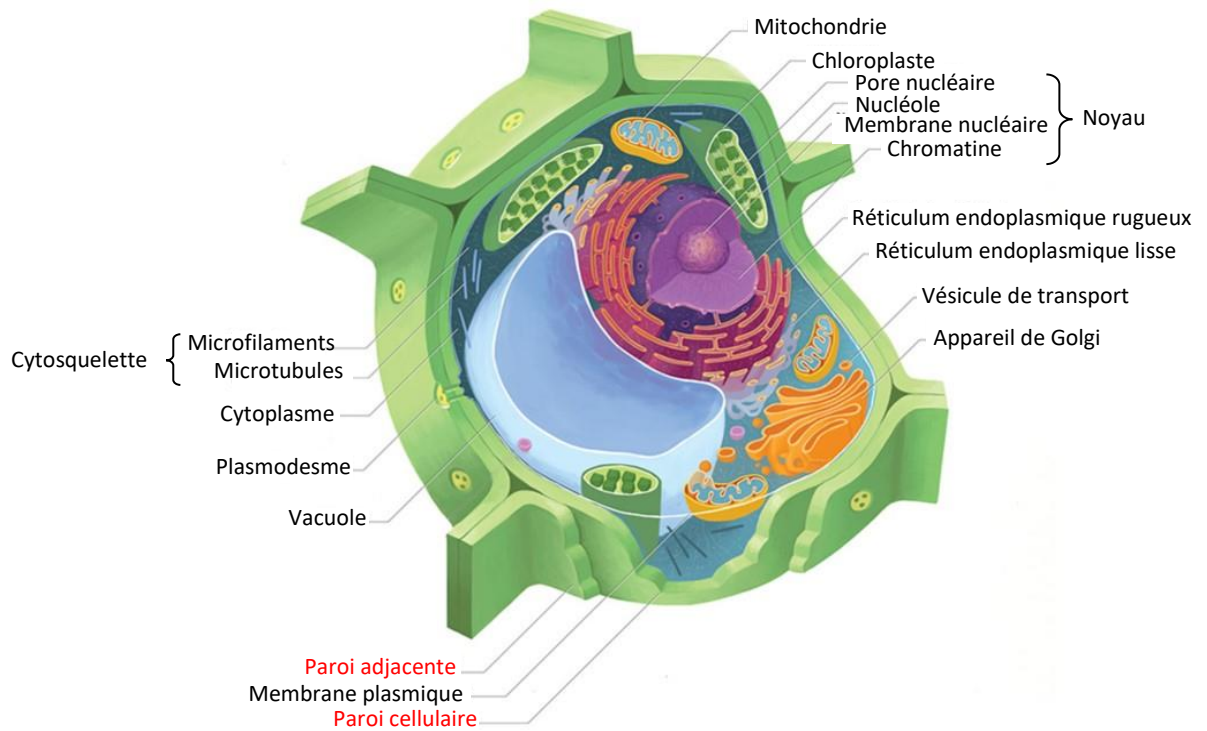
Un voyage autour du monde, ou à défaut un petit tour sur internet peut nous permettre de nous rendre compte de la richesse du monde végétal. On peut trouver des arbres comme le *Sequoia* pouvant dépasser les 100 m de hauteur avec un tronc de 8 m de diamètre, des bryophytes qui s'élèvent à peine un peu plus haut que le sol, des plantes aux feuilles de toutes les formes, simplement rondes ou avec des formes plus exotiques comme les feuilles en tire-bouchon de l'*Albuca spiralé*, et bien d'autres encore. Pourtant, fondamentalement, toutes ces plantes ont la même constitution. Elles sont toutes composées de cellules avec la même machinerie cellulaire, entourées d'une paroi unique dans le monde du vivant, grâce à laquelle les cellules sont soudées entre elles et forment des tissus. Si les plantes peuvent avoir autant de formes différentes, leur permettant de s'adapter et de coloniser des niches environnementales variées, c'est en partie grâce à cette paroi qui entoure leurs cellules. Qui plus est, lorsque l'on supprime la paroi des cellules végétales à l'aide d'enzymes, on obtient ce qu'on appelle des protoplastes : des cellules végétales rondes et isolées.

La paroi végétale possède une multitude de fonctions, et une grande adaptabilité à la vie de la plante, à son stade de développement, et à ses interactions avec son environnement biotique et abiotique. En effet, la paroi des cellules n'est pas la même selon l'âge de la cellule. Elle est au départ très souple, puis de plus en plus rigide. Elle est également capable de se renforcer en cas de blessure. Il en va de la survie de la plante, car une brèche dans la paroi est une porte d'entrée pour les pathogènes.

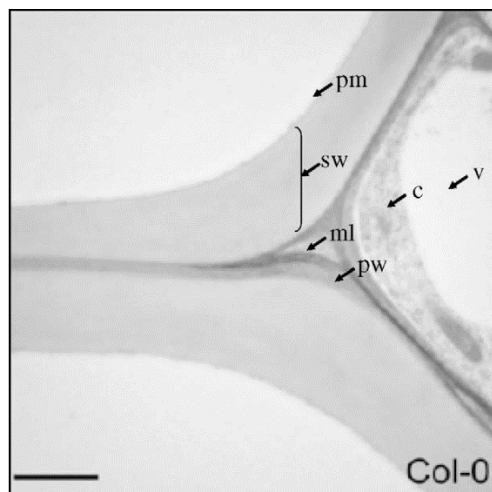
La paroi intéresse les chercheurs pour toutes ses fonctions, et car elle a encore beaucoup de choses à nous apprendre. Sa structure est complexe, ses composants sont nombreux, et les interactions et les réseaux dont ceux-ci sont capables ne sont pas tous connus. Les constituants de la paroi peuvent également être modifiés par des enzymes variées, souvent représentées par des familles multigéniques complexes, dont les fonctions sont encore à l'étude.

En plus de satisfaire notre soif de connaissance sur le monde vivant, en apprendre davantage sur la paroi est bénéfique pour l'Homme par rapport aux applications industrielles des composants de la paroi, ou des enzymes aptes à les modifier.

Parmi tous les composants de la paroi, ceux qui font l'objet de cette étude sont les pectines et plus particulièrement les homogalacturonanes, les polysaccharides pectiques les plus abondants. Ce projet s'intéresse également à une famille enzymatique capable de cliver les homogalacturonanes : les polygalacturonases. La vocation de cette thèse est de comprendre le rôle de certaines polygalacturonases dans le remodelage de la paroi cellulaire, en particulier dans le cadre de la croissance racinaire et de l'élongation cellulaire.



**Figure 1: Schéma d'une cellule végétale.** (<https://www.printablediagram.com/diagrams-of-a-plant-cell-to-print/cell-diagram-2/>).



**Figure 2: La paroi cellulaire végétale.** Coupe transversale d'une racine d'*A.thaliana* sauvage, écotype Columbia-O (Col-0), au microscope électronique à transmission. Sont annotés la lamelle moyenne (ml : middle lamella), la paroi primaire (pw : primary wall), la paroi secondaire (sw : secondary wall), la membrane plasmique (pm : plasma membrane), le cytosol (c), et la vacuole (v). Barre : 2  $\mu\text{m}$  (Caffall and Mohnen, 2009).

# Introduction

## Chapitre I. La paroi cellulaire végétale

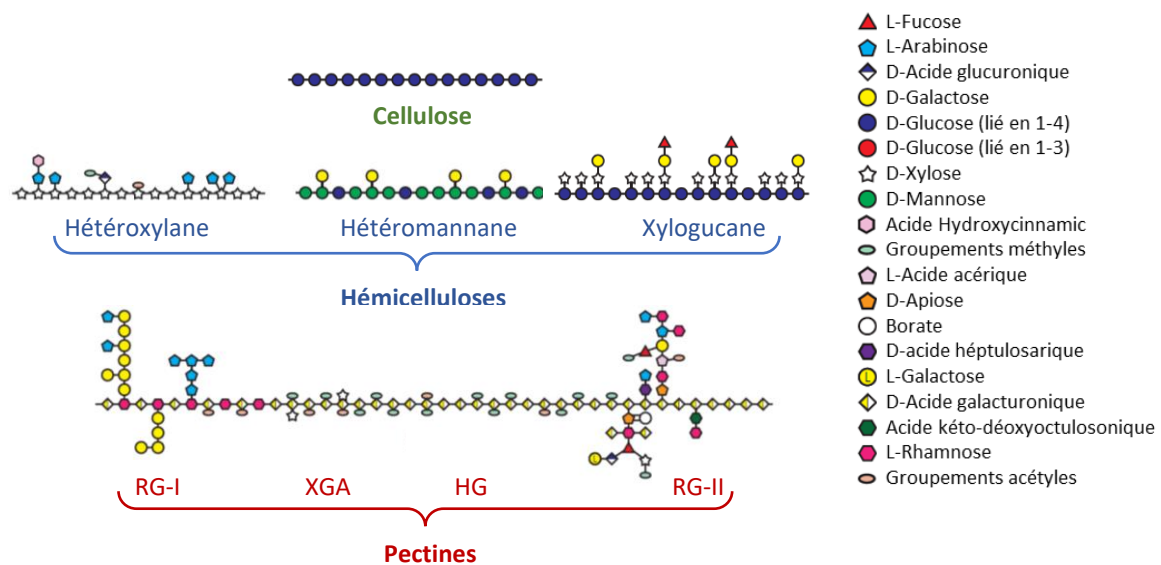
### I.1. Contexte global

La paroi des cellules végétales est une structure macromoléculaire fibreuse complexe qui entoure les cellules ([figure 1](#)). En tant que composant mécanique le plus résistant de la cellule, la paroi agit comme un exosquelette pour donner à la cellule végétale sa forme ainsi que la capacité de supporter une pression de turgescence interne élevée. La paroi permet également la cohésion des cellules entre elles, la défense contre certains agents pathogènes, et participe à de nombreux processus de différenciation et de croissance (Cosgrove, 1997). On pourrait penser que la paroi isole les cellules les unes des autres, mais ce n'est pas le cas, grâce à la présence de canaux qui traversent les parois appelés « plasmodesmes » ([figure 1](#)), qui permettent le transit de molécules de cellules en cellules, faisant des plantes de véritables *syncytium* (Reece et al., 2011a).

La paroi est composée de différents polysaccharides, de protéines, ainsi que de composés aromatiques et aliphatiques, qui permet aux plantes de s'épanouir dans diverses niches environnementales (Caffall and Mohnen, 2009).

Pour pouvoir s'adapter aux différents phases de développement de la plante ainsi qu'aux conditions environnementales, la structure de la paroi est continuellement modifiée (Caffall and Mohnen, 2009). Les cellules végétales indifférenciées commencent par sécréter une paroi relativement mince et flexible, appelée paroi primaire. Entre les parois primaires des cellules adjacentes se trouve une couche mince de lamelle moyenne. Elle est riche en polysaccharides hydrophiles appelés pectines, capables d'absorber une grande quantité d'eau. Les pectines de la lamelle moyenne permettent également d'assurer la cohésion des cellules entre elles. Quand l'expansion cellulaire cesse, la structure de la paroi primaire change afin de devenir plus rigide. De plus, chez beaucoup de cellules, la paroi est ensuite renforcée par l'ajout d'une paroi secondaire, entre la membrane plasmique et la paroi primaire ([figure 2](#) ; Caffall and Mohnen, 2009; Reece et al., 2011a). La paroi fait partie de l'apoplaste, qui désigne l'espace situé entre les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes, et tout ce qui s'y trouve. L'apoplaste inclut donc les parois primaire et secondaire, la lamelle moyenne, les espaces intercellulaires, l'eau ainsi que les solutés (O'Neill and York, 2003).

La paroi primaire est caractérisée par une quantité moins importante de cellulose, et une plus grande proportion de pectines, comparée à la paroi secondaire. La paroi primaire contribue à l'intégrité structurelle de la paroi, à la transduction de signaux (notamment dans la médiation de réponses de défense), ainsi qu'à la croissance et au développement de la plante. La paroi secondaire, quant à elle, est une couche durable pouvant devenir très épaisse. Le bois, par exemple, se compose principalement de parois secondaires dans laquelle de la lignine, un polymère très résistant, vient s'ajouter à la cellulose. Enfin, les polysaccharides non-cellulosiques des parois secondaires ont généralement des degrés moins importants de



**Figure 3 : Hétérogénéité structurale des polysaccharides pariétaux chez les plantes.** La chaîne principale de ces polysaccharides est basée sur des monosaccharides liés en  $\beta(1 \rightarrow 4)$  dans le cas de la cellulose et des hémicelluloses, comprenant le xyloglucane, les hétéroxylanes et les hétéromannanes ; alors que les pectines sont majoritairement composées d'une chaîne principale de résidus d'acides galacturoniques liés en  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ , ce qui correspond aux homogalacturonanes (HG), qui représentent le principal constituant des pectines. Le xylogalacturonane (XGA) et le rhamnogalacturonane de type II (RG-II) possèdent également cette chaîne principale, mais portent des substitutions. En revanche, la chaîne principale du rhamnogalacturonane de type I (RG-I) est composée d'une répétition d'acides galacturoniques et de rhamnosés liés en  $[-\alpha -D-GalA-1,2-\alpha-L-Rha-1-4-]_n$ . D'après Burton et al. (2010).

branchements ou de substitutions de la chaîne principale, et sont considérés comme étant moins solubles en milieu aqueux (Burton et al., 2010; Caffall and Mohnen, 2009; Reece et al., 2011a).

Ce travail s'est focalisé sur l'étude de la paroi primaire et les informations bibliographiques qui suivent décriront uniquement la paroi de type I des plantes à fleurs, puisque c'est le type de paroi que possède la plante modèle utilisée dans cette étude, *Arabidopsis thaliana*. Il existe cependant une paroi de type II présente chez les graminées, qui possède une composition en polysaccharides légèrement différente de la paroi de type I (Carpita and Gibeaut, 1993).

## I.2. Les différents constituants de la paroi et leur synthèse

Quatre-vingt-dix pourcent du poids sec de la paroi primaire est composé de polysaccharides (O'Neill and York, 2003). Ceux-ci forment un réseau coextensif (inséparable), et ont une structure tridimensionnelle complexe. Ils sont composés d'au moins 14 monosaccharides différents, connectés entre eux par une large variété de liaisons glycosidiques (Scheible and Pauly, 2004). La paroi primaire est également composée de 2 à 10 % de glycoprotéines structurales, moins de 2 % d'esters phénoliques, de 1 à 5 % de minéraux liés à ses constituants par des liaisons covalentes et ioniques, et enfin d'enzymes. De la lignine est retrouvée dans les parois secondaires uniquement. Dans les tissus végétaux vivants, l'eau peut représenter jusqu'à 70 % du volume total de la paroi primaire (O'Neill and York, 2003).

Il existe trois catégories de polysaccharides dans la paroi primaire : des microfibrilles de cellulose cristalline, une matrice complexe de pectines et des hémicelluloses. La façon dont ces polysaccharides sont agencés sera détaillée dans la partie I.3. De la callose peut également être retrouvée en moindre quantité ([figure 3](#) ; Scheible and Pauly, 2004).

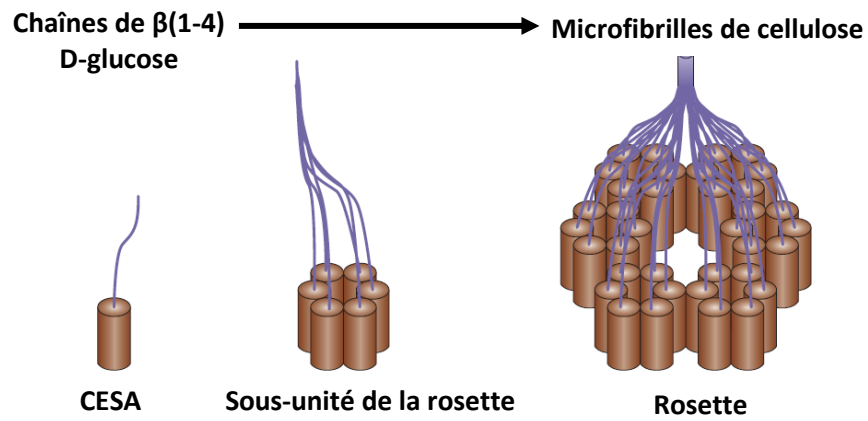
Les protéines structurales majoritaires sont les extensines, des protéines de type « HRGP » pour « hydroxyproline-rich glycoprotein », capables de créer des liaisons avec d'autres protéines, sans nécessairement se lier aux polysaccharides (Carpita and Gibeaut, 1993).

### I.2.1. La cellulose

#### I.2.1.a. Structure de la cellulose

La cellulose est l'élément principal des parois primaires et secondaires. Chez les dicotylédones comme *A. thaliana*, elle représente entre 15 % du poids sec des feuilles et 30 % du poids sec des tiges. Chez les monocotylédones, les parois sont composées approximativement de 6 à 10 % de cellulose au niveau des feuilles, et de 20 à 40 % dans les tiges (Caffall and Mohnen, 2009).

La cellulose est constituée de chaînes linéaires non branchées et non substituées de  $\beta(1\rightarrow4)$  D-glucose, assemblées en microfibrilles cristallines par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes non covalentes (Burton et al., 2010; Nishiyama et al., 2002; Scheible and Pauly, 2004). La longueur des chaînes de cellulose ainsi que le degré de cristallisation peut



**Figure 4 : Modèle de la machinerie cellulaire permettant la synthèse de la cellulose.** Chaque protéine CESA synthétise une chaîne de  $\beta(1-4)$  D-glucose, sous forme d'un ruban cristallin. Une rosette, qui est composée de 6 hexamères de CESA, permet de former 36 chaînes de glucose, assemblées en microfibrilles. D'après Cosgrove, 2005.



varier, mais la structure chimique de la cellulose reste identique dans les parois de différentes plantes, organes et tissus (Burton et al., 2010). Bien que chaque chaîne ne fasse que quelques milliers d'unités de longueur, elles se chevauchent en s'initiant et en se terminant à différents endroits de la microfibrille. Une microfibrille est donc très longue par rapport aux chaînes qui la compose, de la même manière qu'un fil de coton est composé de milliers de fibres de coton de seulement quelques centimètres de longs (Carpita and Gibeaut, 1993).

### I.2.1.b. Synthèse de la cellulose

Les microfibrilles de cellulose sont produites par un large complexe protéique membranaire appelés CESA (cellulose synthase), qui génère la cellulose à la surface de la cellule, de façon semblable à un fil d'araignée (Cosgrove, 2005; Saxena and Brown, 2005). On peut d'ailleurs noter que certaines bactéries, telles que *Acetobacter xilinum*, sont capables de produire et de sécréter des quantités importantes de cellulose afin de former une pellicule extracellulaire. Grâce à la bactérie *A. xilinum*, un activateur de la cellulose synthase a été découvert, ce qui a rendu possible l'amélioration de la synthèse de cellulose *in vitro*. À l'aide de la purification de la cellulose synthase, les gènes codant la sous-unité catalytique ainsi que d'autres protéines impliquées dans la synthèse de la cellulose ont pu être clonés (Delmer, 1999).

La cellulose synthase correspond à un assemblage de 10 ou 12 glycosyltransférases processives de type 2 (Scheible and Pauly, 2004). Les CESA sont assemblées en rosette : chaque rosette est constituée de six sous-unités, et chaque sous-unité est constituée de six CESA (**figure 4**). Les microfibrilles se forment par le regroupement spontané et la cristallisation de douzaines de chaînes de cellulose, produites à partir d'UDP-glucose (uridine diphosphate-glucose). Les microfibrilles font 3 à 5 nm de large, et plusieurs micromètres de long, ce qui est suffisant pour faire plusieurs fois le tour complet de la cellule (Cosgrove, 2005).

### I.2.2. La callose

De façon semblable à la cellulose, la callose, un polysaccharide amorphe de  $\beta(1\rightarrow3)$  D-glucose, est produit par un complexe protéique membranaire appelé CALS (callose synthase), qui utilise également comme substrat des UDP-glucose et nécessite la présence de calcium et de glucosides (Delmer, 1999). La callose est moins abondante que la cellulose durant les conditions de croissance normales de la plante. Cependant, ce polysaccharide est présent au niveau de la plaque cellulaire des cellules en division, dans les parois des cellules mères du pollen et dans les tubes polliniques, ainsi que dans les cribles des éléments du phloème. De plus, la callose est déposée dans la paroi suite à une blessure biotique ou abiotique (Scheible and Pauly, 2004).

### I.2.3. Les hémicelluloses

#### I.2.3.a. Structure des hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides pariétaux non solubles dans des tampons, de l'eau chaude, ou des agents chélateurs, mais uniquement par des agents chaotropiques forts



comme des alcalis aqueux (tel que du NaOH, entre 0,1 M et 4 M ; Cosgrove, 1997; O'Neill and York, 2003). Suivant cette définition, les hémicelluloses regroupent le xyloglucane, les xylanes (incluant le glucuronoxylane, l'arabinoxylane, et le glucuronoarabinoxylane), les mannanes (qui comportent le glucomannane, le galactomannane, et le galactoglucomannane), et enfin l'arabinogalactane (Cosgrove, 1997; O'Neill and York, 2003).

Les hémicelluloses peuvent également être définis comme des polysaccharides pariétaux généralement branchés, avec de courtes chaînes latérales constituées de xylose, galactose, et souvent terminées par un fucose (Cosgrove, 1997). Ils ont une structure proche de la cellulose, puisqu'ils sont composés d'un squelette de résidus  $\beta(1\rightarrow4)$  D-pyranosyl tels que le glucose, le mannose et le xylose, dont le O-4 est dans l'orientation équatoriale. Le xyloglucane, les xylanes et les mannanes répondent à cette deuxième définition, mais pas l'arabinogalactane (Cosgrove, 1997; O'Neill and York, 2003), qui est en réalité une chaîne latérale des pectines (Schols and Voragen, 2002; Vincken, 2003). Malgré la ressemblance des hémicelluloses avec la cellulose, leurs branchements et autres modifications les empêchent de former des microfibrilles (Cosgrove, 2005).

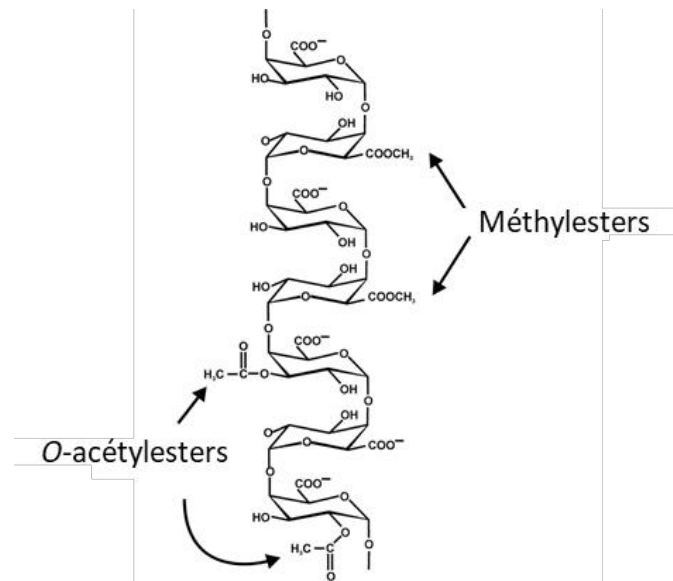
Le xyloglucane et l'arabinoxylane sont les deux hémicelluloses les plus abondantes. Le xyloglucane est constitué d'une chaîne de  $\beta(1\rightarrow4)$  D-glucose comme la cellulose, mais possède entre 50 et 75 % de substitutions par des résidus  $\alpha(1\rightarrow2)$  xylose. Chez la plupart des espèces de plante, ces résidus xylose sont également substitués par des résidus  $\beta(1\rightarrow2)$  D-galactose à des positions spécifiques, qui peuvent être à leur tour substitués par des résidus  $\alpha(1\rightarrow2)$  fucose (Scheible and Pauly, 2004). Dans les parois primaires de type I, le xyloglucane est le principal polysaccharide responsable de la stabilisation et de l'espacement des microfibrilles de cellulose (Carpita and Gibeaut, 1993).

Quant à l'arabinoxylane, c'est une chaîne de  $\beta(1\rightarrow4)$  D-xylane avec des branchements arabinose.

### I.2.3.b. Synthèse des hémicelluloses

A l'inverse de la cellulose et de la callose, la matrice d'hémicellulose est synthétisée dans l'appareil de Golgi, grâce à des glycosyltransférases appartenant à la même famille que les protéines CESA, responsables de la production de la cellulose. La super-famille de gènes codant ces glycosyltransférases est appelée « CSL » pour « CELLULOSE SYNTHASE-LIKE » (CSLA à CLSH). Les protéines CSL contiennent des motifs caractéristiques des  $\beta$ -glycosyltransférases et possèdent des points communs avec les CESA. Elles représentent de bonnes candidates pour la synthèse des chaînes de  $\beta$ -D-glycanes des hémicelluloses tels que le xyloglucane, le xylane, le mannane et autres  $\beta$ -D-glycanes de la paroi (Cosgrove, 2005).

D'autres glycosyltransférases de l'appareil de Golgi ont pour rôle d'ajouter les substitutions aux chaînes glycaniques (Scheible and Pauly, 2004). Les glycosyltransférases forment des liaisons glycosidiques, en fixant une portion de sucre d'un donneur de substrat approprié (souvent un nucléotide-sucre) à un accepteur de substrat spécifique (Scheible and Pauly, 2004).



**Figure 5 : Structure primaire des Homogalacturonanes (HG).** Il s'agit d'un homopolymère linéaire de  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  D-GalA, pouvant être méthylestérifiés en position C-6, à hauteur de 80 % (Wolf et al., 2009), et porter des groupements acétyle en O-2 et O-3, à hauteur de 10 % (Gou et al., 2012). D'après Ridley et al. (2001).

Après la formation des chaînes glycaniques et de leurs branchements, les polysaccharides sont ensuite transportés par des vésicules dérivées du Golgi vers la membrane plasmique. Ces vésicules fusionnent alors avec la membrane, relarguant les polysaccharides empaquetés vers la paroi. Les polysaccharides sont intégrés dans le réseau pariétal par des interactions physiques, des liaisons enzymatiques et des réactions de réticulation. Contrairement aux microfibrilles de cellulose, la matrice de polysaccharides nouvellement sécrétée peut diffuser sur une certaine distance dans la paroi cellulaire, aidée par la pression de turgescence, qui étire la paroi, augmentant ainsi sa porosité, et fournissant un gradient d'énergie pour acheminer les polymères dans la paroi (Cosgrove, 2005).

#### I.2.4. Les pectines

##### I.2.4.a. Structure des pectines

Les pectines représentent la famille de polysaccharides naturels la plus complexe du point de vue structurel (Wolf et al., 2009). Elles constituent jusqu'à 35 % de la structure des parois primaires chez les dicotylédones et les monocotylédones non graminées, mais seulement 2 à 10 % des parois primaires des herbacées et des Commelinidées. On en retrouve également dans le bois où elles représentent 5 % des constituant de la paroi (Mohnen, 2008).

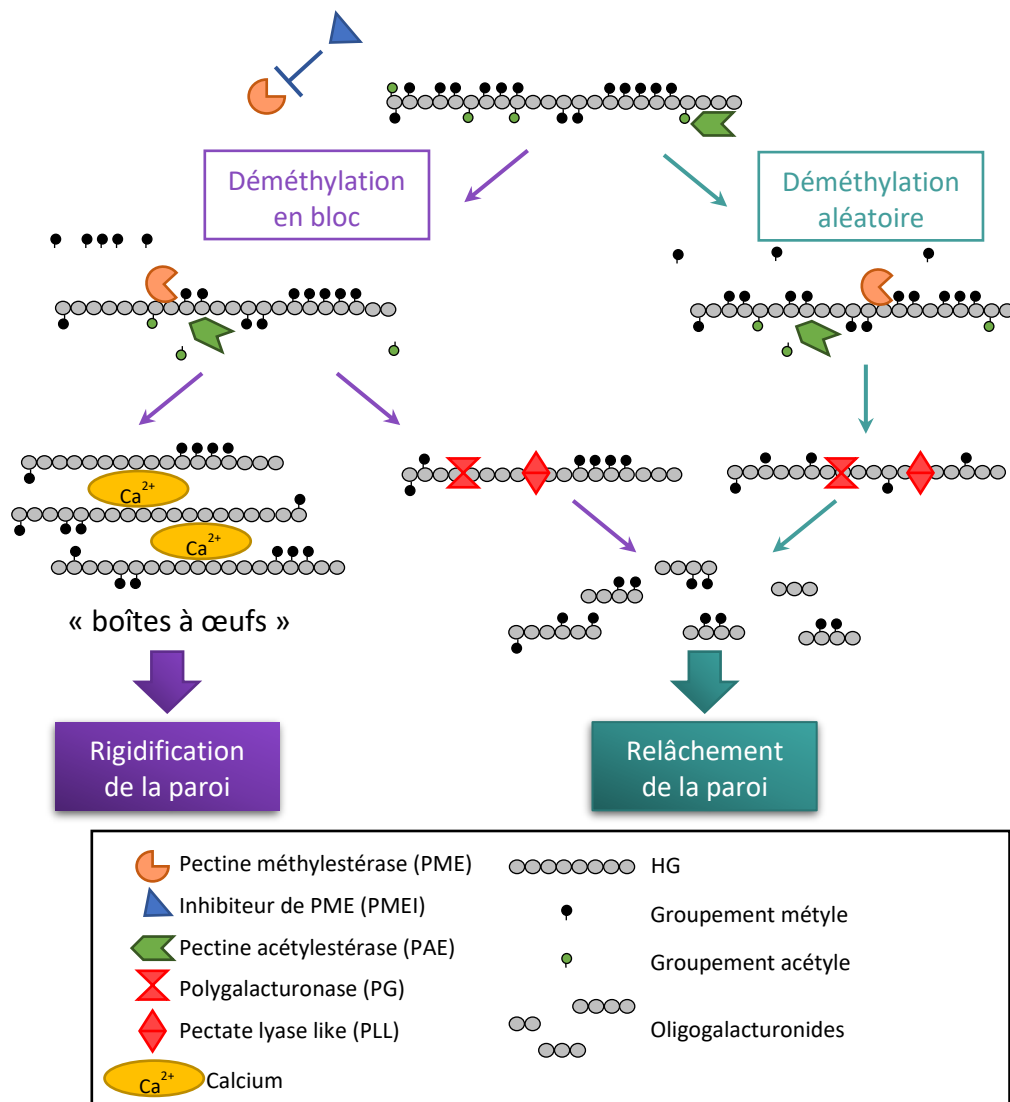
Les pectines sont composées à 70 % d'acides galacturoniques (Mohnen, 2008), principalement sous la forme d'un squelette de  $\alpha(1\rightarrow4)$  D-acides galacturoniques (GalA). Elles sont donc également nommées galacturonanes. Les pectines sont cependant constituées de 17 monosaccharides différents (Vincken, 2003). On estime que la biosynthèse des pectines nécessite au moins 67 transférases différentes chez *A. thaliana*, dont des glycosyl-, méthyl- et acétyltransferases (Mohnen, 2008).

Les pectines sont divisées en différentes classes structurales, incluant les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et les rhamnogalacturonanes de type II (RG-II), qui sont les trois principaux polysaccharides pectiques. On retrouve également en moindre quantité du xylogalacturonane (XGA), qui est un squelette d'HG avec 25 à 75 % de GalA substitués par du  $\beta$ -xylose en O-3, pouvant lui-même être occasionnellement substitué en O-4 par du  $\beta$ -xylose (Coenen et al., 2007; Mohnen, 2008). Enfin, on peut retrouver chez les monocotylédones aquatiques de l'apiogalacturonane (AGA), qui est une chaîne principale d'HG substituée en O-2 et O-3 par du D-apiofuraose (Mohnen, 2008).

##### I.2.4.b. Les principaux domaines pectiques

###### *Les homogalacturonanes*

Les HG sont les polysaccharides pectiques les plus abondants des parois primaires des eudicotylédones. Ils représentent en effet entre 50 et 70 % des pectines totales des parois primaires d'*Arabidopsis thaliana* (Zabackis et al., 1995). Ce sont des homopolymères linéaires de  $\alpha(1\rightarrow4)$  D-GalA (**figure 5**), avec un degré de polymérisation d'environ 100 résidus d'acides galacturoniques (Wolf et al., 2009). Ils peuvent être méthylestérifiés en position C-6, à hauteur



**Figure 6 : Mode d'action théorique des enzymes de modification des HG (HGME).** Les HG peuvent être méthylestérifiés et acétylés. Les PME peuvent déméthylester les HG en bloc ou de façon aléatoire. La déméthylestérification en bloc permet la formation de structures en boîtes à œuf grâce aux interactions entre les charges positives du calcium et les charges négatives des HG déméthylestérifiés. Ces structures mènent à la rigidification de la paroi. La déméthylestérification aléatoire va au contraire favoriser la dégradation des HG par les polygalacturonases et les pectate lyases like, menant au relâchement pariétal et à la production d'oligogalacturonides. D'après Hocq et al. (2017).

de 80 % (Wolf et al., 2009), et porter des groupements acétyles en O-2 et O-3, à hauteur de 10 % (Gou et al., 2012).

### *Modification de la structure des HG par les HGME*

Les HG sont synthétisés dans l'appareil de Golgi (voir paragraphe I.2.4.c.). Ils sont alors substitués dans le *trans*-Golgi, avant d'être transférés sous forme hautement méthylestérifiée (90 %) vers la paroi cellulaire, où leur structure pourra être modifiée par l'activité d'enzymes pariétales (Senechal and Wattier and Wattier et al., 2014; Wolf et al., 2009). Ces enzymes sont nommées HGME pour « HG-modifying enzymes ». Parmi celles-ci, on retrouve les pectines méthylestérases (PME ; EC 3.1.1.11), capables de contrôler le degré de méthylestérification des HGs en éliminant des groupements méthyles. Leur activité est régulée par des inhibiteurs protéiques, les PMEI (pectin methylesterase inhibitor). On retrouve également les pectines acétylestérases (PAE ; EC 3.1.1.6) qui hydrolysent les liaisons O-acétyles. Les HG partiellement déméthylestérifiés peuvent subir deux types de modifications différentes. Puisque les HG déméthylestérifiés sont chargés négativement, ils peuvent s'assembler entre eux *via* des ponts calciques, ce qui permet la formation de structures en « boîtes à œufs », ou « gels pectiques », qui permettent de rigidifier la paroi (Caffall and Mohnen, 2009; Grant et al., 1973; Liners et al., 1989; Wolf et al., 2009). Les HG déméthylestérifiés peuvent également devenir la cible d'enzymes de dégradation des pectines, telles que les polygalacturonases (endo-PG, EC 3.2.1.15 ; et exo-PG, EC 3.2.1.67) et les « pectate lyases-like » (PLL), incluant les pectates lyases (endo-PL, EC 4.2.2.2 ; et exo-PL, EC 4.2.2.9) et les pectines lyases (endo-PNL ; EC 4.2.2.10), ce qui peut conduire à un relâchement pariétal (**figure 6**). Chacune de ces HGME appartient à une grande famille multigénique (Hocq et al., 2017; Senechal and Wattier et al., 2014; Wolf et al., 2009).

#### ➤ *Les pectines méthylestérases*

Les PME appartiennent à la famille carbohydate esterase 8 (CE8), d'après le répertoire CAZY (carbohydate active enzyme ; <http://www.cazy.org>). Les PME comportent chez *A. thaliana* 66 isoformes, divisées en deux groupes : les PME de type I et celles du type II. Les 45 PME du type I sont constituées d'une partie mature avec un domaine catalytique PME, et d'une région PRO en N-terminal, qui présentent des similarités avec les domaines des PMEI. Les 21 PME du type II sont seulement constituées d'une partie PME mature (Pelloux et al., 2007).

Les PME sont présentes chez les plantes, les bactéries et les champignons. Chez les plantes, il existe des isoformes neutres, basiques, mais aussi quelques isoformes acides. Toutes les isoformes catalysent l'hydrolyse des liaisons méthylesters en C6 des résidus GalA, ce qui engendre la formation de groupes carboxyles libres et relâche du méthanol et des protons, qui ont pour effet d'acidifier la paroi (Hocq et al., 2017; Pelloux et al., 2007).

L'activité des PME dépend de beaucoup de facteurs, notamment de la présence de groupes carboxyles libres près du site actif des PME, ce qui explique l'affinité des PME pour les HG partiellement déméthylestérifiés (Fries et al., 2007; Van Alebeek et al., 2003). Les PME





sont également sensibles au pH et à la concentration en cations (Dixit et al., 2013; Jolie et al., 2010). Dans un environnement acide, les PME sont moins actives que dans un pH légèrement alcalin. Il se pourrait que les PME alcalines chargées positivement en pH acide, auraient par conséquent une forte attraction pour les groupes carboxyles libres des HG, chargés négativement, ce qui les rendrait inactives. *A contrario*, à pH légèrement alcalin, les isoformes basiques sont moins positivement chargées, ce qui les libèrerait du substrat, due aux répulsions électrostatiques entre les enzymes et les groupes carboxyles libres (Jolie et al., 2010; Senechal and Wattier et al., 2014).

Le pH, le substrat, le type de PME, et l'environnement ionique détermine le mécanisme d'action des PME. Trois mécanismes d'actions ont été observés : (i) « un mécanisme à une seule chaîne », où les PME éliminent tous les méthylesters continus d'une chaîne avant de se dissocier du substrat. (ii) « un mécanisme d'attaques multiples », dans lequel plusieurs PME catalysent la libération d'un nombre limité de méthylesters sur plusieurs chaînes d'HG. Ces deux premiers modes d'action produisent tout deux des HG déméthylestérifiés de façon processive ou en bloc, ce qui permet l'association des chaînes d'HG en boîtes à œufs. (iii) « un mécanisme à plusieurs chaînes », où les PME éliminent un seul méthylester avant de se dissocier du GalA. Ce mode d'action permet d'obtenir une déméthylestérisation aléatoire, pouvant conduire à la dégradation des HG partiellement déméthylestérifiés par des PG et des PLL (Fries et al., 2007; Jolie et al., 2010; Senechal and Wattier et al., 2014).

#### ➤ *Les pectines acétylases*

Les PAE (famille CE13 ; <http://www.cazy.org>) comportent 12 isoformes. Elles ont été caractérisées chez les plantes, les bactéries et les champignons (Senechal and Wattier et al., 2014). Elles peuvent déacétyler les HG, mais également les rhamnogalacturonanes de type I (voir-ci après ; Ishii, 1997). Au sein de la chaîne d'HG, la présence simultanée de groupements méthyles et acétyles sur les mêmes résidus de GalA est rarement observé, mais peut avoir lieu, et influencer l'activité PME et PAE (Ralet et al., 2005). L'acétylation peut empêcher la dégradation des HG par des endo-PG (Bonnin et al., 2003), et la déacétylation favorise la gélification des HG chez la betterave sucrière (Ralet et al., 2003).

Chez *A. thaliana*, la majeure partie des PAE ont un pI (point isoélectrique) neutre ou basique. Les PAE de plantes purifiées de haricot et d'orange sont actives sur des substrats synthétiques comme la triacétine et le *p*-nitrophényle acétate, et sur des pectines de betterave. Elles ont une activité optimale dans des pH acides entre 5 et 6,5 suivant le substrat. Enfin, l'activité PAE semble être amplifiée sur les substrats préalablement déméthylestérifiés. Une synergie entre les PME et les PAE aurait donc lieu à la paroi afin de permettre la mise en place des boîtes à œufs ou la dégradation des HG par les PG et les PLL (Christensen et al., 1996; Senechal and Wattier et al., 2014; Williamson, 1991).

#### ➤ *Les polygalacturonases*

Les PG appartiennent à la famille glycoside hydrolase 28 (GH28 ; <http://www.cazy.org>). Cette famille regroupe les endo- (EC 3.2.1.15) et les exo-polygalacturonases (EC 3.2.1.67), les



exopolygalacturonosidases (EC 3.2.1.82), les rhamnogalacturonases (EC 3.2.1.171) les endoxylogalacturonanes hydrolases (EC 3.2.1.-) et les rhamnogalacturonanes  $\alpha$ -l-rhamnopyranohydrolases (EC 3.2.1.40).

La famille GH28 compte 68 isoformes. Cependant, en se basant sur l'analyse des séquences des PG, Senechal and Wattier et al. (2014) suggèrent que le nombre de PG devrait être de 67 au lieu de 68, car l'une des isoformes considérée comme une PG (AT4G20050) ne possède pas de domaine GH28, mais un domaine pectate lyase 3.

La famille enzymatique des PG a été identifiée chez les plantes, les insectes herbivores, les bactéries, les champignons et les nématodes (Senechal and Wattier et al., 2014). Quel que soit leur origine, les PG clivent par hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -(1-4) des résidus GalA, principalement des homopolymères linéaires d'HG. Généralement, leur activité augmente proportionnellement avec la diminution du DM des HG. L'activité PG dépend donc de l'activité PME. La dégradation des HG par les PG produit des oligogalacturonides (OG) avec différents degrés de polymérisation. Chez les plantes, les endo-PG préfèrent les HG avec plus de quatre GalA déméthylestérifiés, entre des GalA méthylestérifiés. A l'inverse, les exo-PG n'agissent que sur les positions terminales des chaînes d'HG, et libèrent ainsi des monogalacturonides (Brummell and Harpster, 2001; Senechal and Wattier et al., 2014; Verlent et al., 2005).

Les PG de plantes ont une activité optimum entre pH 3,3 et 6. Mais l'activité des PG dépend également du microenvironnement ionique. Par exemple, des PG de tomates purifiées présentent une activité optimale de pH 4 à 4,5 en présence de NaCl, et de pH 5 à 6 en présence de KCl (Chun and Huber, 1998). De même, en présence d'un chélateur de calcium, l'activité PG peut disparaître (Nogata et al., 1993). Mais toutes les PG ne dépendent pas de la présence de calcium (Senechal and Wattier et al., 2014).

L'activité PG peut également être inhibée par des inhibiteurs de PG (PGIP), que la plante produit afin d'inhiber l'activité de PG en provenance de pathogènes (Federici et al., 2001; Ferrari et al., 2006; Sathiyaraj et al., 2010). Les PGIP de plantes agiraient selon deux modes d'action : par la formation d'un complexe PG-PGIP (Federici et al., 2001; Spadoni, 2006) et/ou par la liaison des PGIP aux HG, pour empêcher les PG de pathogènes d'accéder à leur substrat (Spadoni, 2006). Actuellement, peu de données indiquent le rôle des PGIP de plante sur la régulation des PG de plante. Une étude a cependant démontré que l'augmentation de l'expression de PGIP de plante au niveau de la graine entraînait une altération de la dégradation des pectines et donc du mucilage, inhibant ainsi la germination. Le traitement par des PG fongique ou un pH acide permet de rétablir la germination de ces graines (Kanai et al., 2010).

#### ➤ *Les pectate lyases-like*

Les PLL appartiennent à la famille polysaccharide lyase 1 (PL1), et comporte 26 isoformes. Elles sont retrouvées chez les plantes, les bactéries, les champignons et les nématodes (Senechal and Wattier et al., 2014). Elles clivent les HG par  $\beta$ -élimination de la liaison  $\alpha$ -(1-4) entre les résidus GalA méthylestérifiés ou déméthylestérifiés, donnant naissance à une liaison

**Tableau 1 : Anticorps spécifiques des HG**

<b>Anticorps</b>	<b>Épitope</b>	<b>Références</b>
JIM5	HG (DM < 40 %)	Knox et al., 1990 Willats et al., 2000
PAM1	HG faible DM (larges portions d'au moins 30 résidus GalA non méthylés)	Willats et al., 1999 Willats et al., 2000
JIM7	DM entre 15 et 81 %	Knox et al., 1990 Willats et al., 2000
2F4	HG complexés par le calcium (boîtes à œufs)	Liners et al., 1989
LM7	HG partiellement déméthylestérifiés de façon aléatoire	Clausen et al., 2003 Willats et al., 2001
LM18	HG partiellement déméthylestérifiés et déméthylestérifiés	Verhertbruggen et al., 2009
LM19	HG déméthylestérifiés	Verhertbruggen et al., 2009
LM20	HG méthylestérifiés	Verhertbruggen et al., 2009

C4-C5 insaturée à l'extrémité non réductrice de l'oligogalacturonide nouvellement formé (Mayans et al., 1997; Pilnik and Rombouts, 1981; Senechal and Wattier et al., 2014).

Les PLL comprennent les pectates lyases et les pectines lyases. Les pectates lyases sont plus spécifiques des HG déméthylestérifiés ou avec un DM très bas, et leur activité nécessite du calcium. Leur pH optimal est généralement aux alentours de pH 8,5. Au contraire, les pectines lyases dégradent les HG hautement méthylestérifiés, avec un pH optimum à 5,5, et ne requièrent pas de calcium (Herron et al., 2000; Mayans et al., 1997). De plus, il existe des endo et exo pectates lyases, alors que seules des endo pectines lyases ont été découvertes (Sinitsyna et al., 2007). Les PLL sont généralement trouvées chez les microorganismes. Les champignons sécrètent habituellement des pectines lyases, et les bactéries des pectates lyases (Payasi and Sanwal, 2003; Sinitsyna et al., 2007).

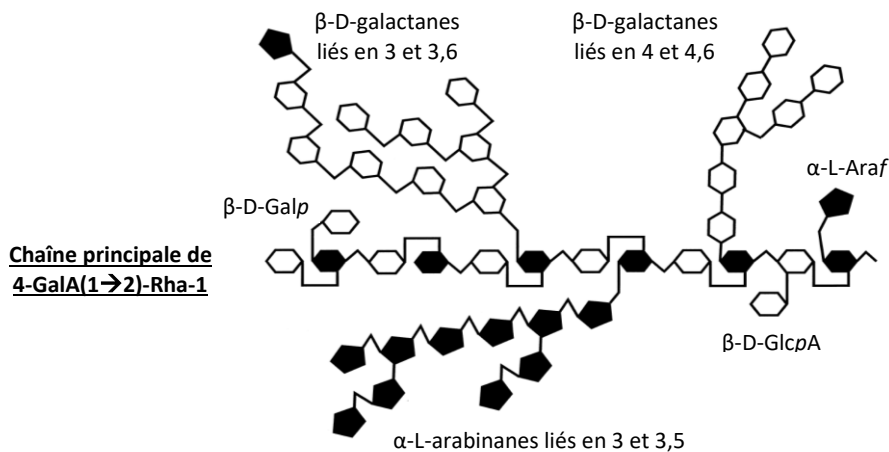
### *Immunolocalisation du degré de méthylestérification des HG*

Des anticorps spécifiques peuvent être utilisés pour détecter le degré de méthylestérification des HG par immunolocalisation. Ces anticorps sont listés sur le site <http://www.plantprobes.net/index.php> ([tableau 1](#); Clausen et al., 2003; Knox et al., 1990; Liners et al., 1989; Verherbruggen et al., 2009; Willats et al., 1999, 2000, 2001). Ces anticorps ont permis de mettre en évidence des différences de répartition du degré de méthylestérification des HG au sein de la paroi : les pectines déméthylestérifiées (reconnues par JIM5 et 2F4) sont fortement présentes au niveau de la lamelle moyenne, près des méats cellulaires, et sont présentes de manière abondante dans les méats et dans les espaces intercellulaires (Bush et al., 2001; Knox, 1997). Ces observations, corrélées avec une présence importante d'ions calciques aux mêmes endroits, témoignent de la présence de réseaux pectiques en boîtes à œufs dans les méats et dans les espaces intercellulaires. La conformation en boîte à œuf des pectines permet la cohésion des cellules, là où la tension induite par la pression de turgescence est la plus élevée (Jarvis, 1992; Knox, 1997). Les pectines méthylestérifiées sont quant à elles majoritairement présentes au niveau de la paroi primaire, et uniformément abondantes (Bush et al., 2001; Knox, 1997). Dans certains cas, une couche d'HG déméthylestérifiés reconnus par JIM5 est observée au niveau de la paroi en contact avec la membrane plasmique. Des variations sont toutefois observées suivant les espèces, et dans certains cas, la paroi peut apparaître uniformément déméthylestérifiée (Knox, 1997). Ces variations témoignent d'une régulation du degré de méthylestérification par les HGMEs.

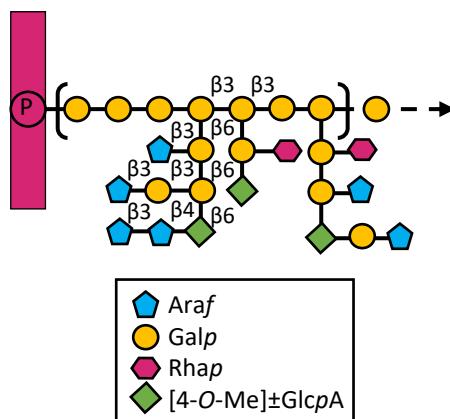
En industrie, la méthylestérification des HG retient particulièrement l'attention des chercheurs, puisqu'elle détermine l'applicabilité industrielle des pectines (utilisées pour leurs propriétés gélifiantes, épaississantes et stabilisantes ; Daas et al., 2001).

### *Le rhamnogalacturonane de type I*

Le RG-I représente 20 à 35 % des pectines (Mohnen, 2008). Sa structure a été déterminée pour la première fois à partir de la solubilisation des parois cellulaires de cultures de cellules d'érable en suspension (*Acer pseudoplatanus*). Le RG-I est le seul polysaccharide pectique qui n'est pas constitué d'une chaîne principale d'HG, mais d'une répétition d'acides



**Figure 7 : Modèle des caractéristiques structurales majeures du rhamnogalacturonane de type I (RG-I).** La chaîne principale est composée de la répétition du disaccharide [- $\alpha$  -D-GalA-1,2- $\alpha$ -L-Rha-1-4-]<sub>n</sub>. Des oligosaccharides branchés et linéaires, composés majoritairement de résidus  $\alpha$ -L-Araf and  $\beta$ -D-Galp, sont liés au C4 de certains résidus Rhap. Certains résidus Rhap peuvent également être O-acétylés en C2 et/ou en C3. Ara : arabinose ; Gal : galactose ; GalA : acide galacturonique ; Glc : glucose ; Rha : rhamnose. f : furanose ; p : pyranose. D'après Ridley et al. (2001).



**Figure 8 : Représentation schématique d'un arabinogalactan de type II (AGP).** Les chaînes carbohydrates principales des AGPs sont constituées d'une répétition de D-galactopyranose (Galp), avec un degré de polymérisation aux alentours de 7 (une répétition est ici représentée entre crochets). Il peut y avoir 10 répétitions ou plus. Les galactoses peuvent être substitués en C-6 par des chaînes latérales de  $\beta$ -D-Galp liés en (1→6), également substituées par de l'arabinofuranose (Araf), du Galp, et une minorité de rhamnopyranose (Rhap). Des branchements d'oligosaccharides  $\beta$ -D-Galp liés en (1→6) avec une terminaison non-réductrice de [4-O-Me] $\pm$ Glc pA peut se trouver sur n'importe quel Galp de la chaîne principale. D'après Gaspar et al. (2001).

galacturoniques et de rhamnoses liés en  $[-\alpha\text{-D-GalA-1,2-}\alpha\text{-L-Rha-1-4-}]_n$  ([figure 7](#) ; Lau et al., 1985).

Les résidus d'acides galacturoniques peuvent être *O*-acétylés en *C*-2 et/ou en *C*-3 (Lerouge et al., 1993; Ridley et al., 2001; Vincken, 2003). Concernant les résidus rhamnose, en fonction de la plante étudiée et des méthodes d'isolement, environ 50 % des résidus rhamnose du RG-I peuvent être substitués en *C*-4 par des monosaccharides, des oligo- ou polysaccharides, qui sont majoritairement ou entièrement composés de résidus glycosyl neutres (Lerouge et al., 1993). Les chaînes latérales sont liées au rhamnose du squelette du RG-I, et sont principalement constituées de résidus linéaires et branchés de L-Arabinofuranoses, liés en  $\alpha(1\rightarrow3)$  ou en  $\alpha(1\rightarrow5)$ , et de résidus D-Galactopyranoses liés en  $\beta(1\rightarrow4)$  (Nakamura et al., 2002). Les chaînes latérales ont des tailles variables, depuis un résidu unique jusqu'à des chaînes de 50 résidus voire plus, incluant des arabinanes, des galacto-arabinanes, des arabinogalactanes de type I (Lerouge et al., 1993; Øbro et al., 2004) et de type II ([figure 7](#) ; Carpita and Gibeaut, 1993; Silva et al., 2016). Des résidus  $\alpha\text{-L-fucose}$ ,  $\beta\text{-D-glucuronide}$ , et 4-*O*-methyl  $\beta\text{-D-glucuronide}$  peuvent également être présents, ainsi que de l'acide férulique et coumarique (Ridley et al., 2001).

Les arabinogalactanes de types I consistent en une chaîne principale de  $\beta\text{-D-Galp}$  lié en  $(1\rightarrow4)$ , et des résidus  $\alpha\text{-L-Araf}$  peuvent être liés aux résidus galactoses en *O*-3 (Vincken, 2003). Les arabinogalactanes de type II sont également appelés « AGPs » pour « arabinogalactans proteins », puisqu'ils sont principalement liés à des protéines. Leur intégration dans le complexe protéique reste incertain, cependant, les pectines et les AGPs sont généralement co-extraits, et sont difficiles à séparer, ce qui peut suggérer qu'ils sont liés de façon covalente (Vincken, 2003). Les arabinogalactanes de type II sont également composés d'une chaîne principale de  $\beta\text{-D-Galp}$  liés, mais liés en  $(1\rightarrow3)$ , et possèdent des chaînes latérales de  $\beta\text{-D-Galp}$  liés en  $(1\rightarrow6)$  au niveau du *C*-6, se terminant généralement par un  $\alpha\text{-L-Araf}$ , ou d'autres sucres, tels que du *Fucp*, *Rhap*, ou du *Glc p A* (avec ou sans 4-*O*-méthyl ; [figure 8](#)). La partie carbohydrate est généralement liée à la partie protéique *via* une hydroxyproline. La partie protéique des AGPs correspond à moins de 10 % de la molécule (p/p ; poids/poids), et est riche en proline/hydroxyproline, alanine, sérine et thréonine (Gaspar et al., 2001).

La structure des RG-I varie suivant la plante source. En effet, le RG-I de mucilage de graines d'*A. thaliana* est relativement peu branché (Penfield et al., 2001; Western, 2004), alors que le RG-I extrait de paroi de suspension cellulaire d'érable possède approximativement la moitié des résidus rhamnoses branchés en position *C*-4 par des chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes, ou d'arabinogalactanes (Lau et al., 1985; Lerouge et al., 1993). De plus la quantité de chaînes latérales est régulée différenciellement suivant le stade de développement de la plante. Il a par exemple été montré un changement des épitopes correspondant aux chaînes latérales de RG-I, reconnus par les anticorps LM5 (qui reconnaît quatre résidus  $\beta(1\rightarrow4)$  D-galactose ; Jones et al., 2018) et LM6 (qui reconnaît cinq résidus  $\alpha(1\rightarrow5)$  L-arabinose ; Willats et al., 1998) au cours de la tubérisation de la pomme de terre (Bush et al., 2001).





D'autres anticorps sont spécifiques du RG-I : l'anticorps CCRC-M1 reconnaît les terminaisons  $\alpha$ -L-fucosyles non réductrices (Puhlmann et al., 1994), CCRC-M2 le RG-I spécifiquement (Puhlmann et al., 1994), et CCRC-M7 les chaînes de (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-Galactanes présentes sur les chaînes latérales des AGPs (Steffan et al., 1995).

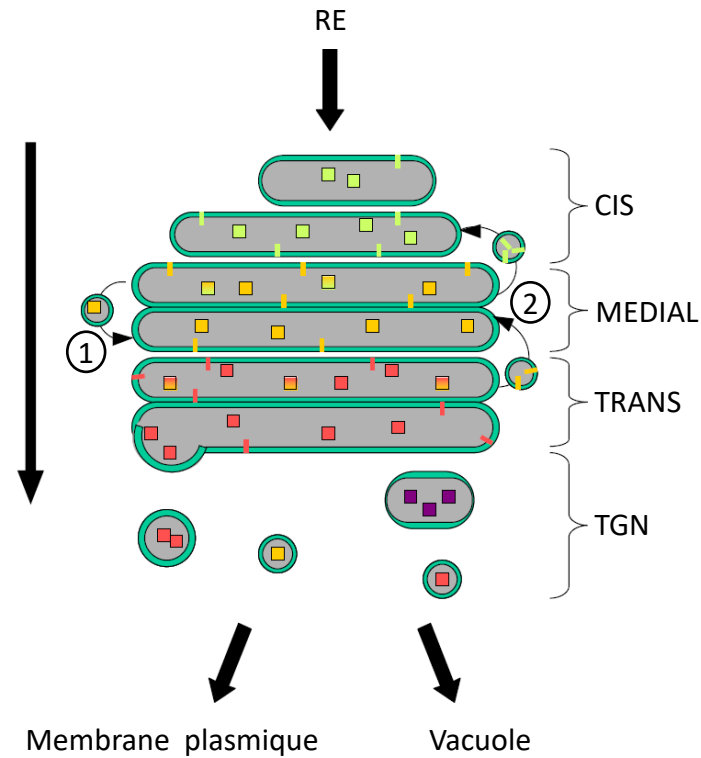
### *Le rhamnogalacturonane de type II*

Le RG-II représente entre 1 et 4 % des parois primaires riches en pectines des dicotylédones, des monocotylédones non-graminées et des gymnospermes, mais moins de 0,1 % des parois primaires pauvres en pectines des poacées (O'Neill et al., 2004). Tout comme le RG-I, il a été caractérisé pour la première fois à partir de la paroi de cellules en suspension d'érable (Darvill et al., 1978). En revanche, le RG-II n'est pas lié structurellement au RG-I, puisqu'il est composé d'une chaîne principale  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) D-GalA comme les HG, avec des chaînes latérales complexes, composées de 12 glycanes différents, liés entre eux par plus de 20 liaisons glycosidiques différentes. Le RG-II possède 4 types de chaînes latérales, notées de A à D (**figure 9**).

Comme l'ont souligné O'Neill et al. en 2004, le nom du RG-II aurait dû être "Apio-acéro-arabino-fuco-galacto-galacturono-glucurono-lyxulosaro-mannulosono-méthylfucométhylxylo-rhamno-galacturonane", selon la règle de l'IUPAC- IUBMB (International Union Of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry and Molecular Biology) « 2-Carb-39.7 » (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iupac/2carb/39.html#397>) de la nomenclature pour carbohydrates de type polysaccharides. En effet, cette règle stipule que « [...] lorsqu'un polysaccharide possède une chaîne principale (« backbone ») composé d'un seul type de sucre, ce sucre doit être cité en dernier (sous le terme de « glycan »), et les autres types de résidus sont cités comme préfixe « glyco- », dans l'ordre alphabétique [...] ». C'est pourquoi le terme de « RG-II » a été adopté, et est rentré dans la littérature de la recherche en paroi cellulaire végétale.

Certains sucres qui composent les chaînes latérales du RG-II sont rarement observés. Il s'agit du D-apiose (Api), du L-acide acérique (3-C-carboxy-5-déoxy-L-xylose, AceA), du 2-O-méthyl L-fucose (2Me-Fuc), du 2-O-méthyl D-xylose (2Me-Xyl), du L-galactose (L-Gal), du 2-kéto-3-déoxy-D-lyxo-acide héptulosarique (acide docosahexaénoïque, Dha), et du 2-kéto-3-déoxy-D-manno-acide octulosonique (keto-deoxyoctulosonate, Kdo ; O'Neill et al., 2004). Seule la présence du 3-O-méthyl rhamnose semble différer selon le type de plante étudié, puisqu'il n'est pas présent chez toutes les plantes ptéridophytes et lycophytes (Matsunaga, 2004). De plus ce glycan n'a encore jamais été détecté chez un angiosperme. En revanche, le RG-II de n'importe quel type de plante contient du GalA, de l'acide glucuronique, du L-rhamnose, du D-galactose, du L-arabinose et du L-Fucose (O'Neill et al., 2004). Le RG-II serait le seul domaine pectique majeur qui ne possède pas de diversité structurale significative, ou de modulation de sa structure fine. Au contraire, sa structure serait fortement conservée (O'Neill et al., 2004; Willats et al., 2001).

Deux chaînes de RG-II sont unies entre elles via un ester de bore (Kobayashi et al., 1996; O'Neill et al., 1996), qui se lie aux résidus apioses des chaînes A des monomères de RG-II



**Figure 11 : L'appareil de Golgi chez les plantes.** L'appareil de Golgi est composé d'un assemblage de vésicules aplaties. C'est le lieu de synthèse des glycoprotéines et des polysaccharides (représentés par des carrés de couleur), grâce aux glycosyltransférases liées aux membranes (représentées par des bâtons colorés). La synthèse des glycomolécules se fait dans la direction indiquée. L'entrée des molécules dans l'appareil de Golgi depuis le réticulum endoplasmique (RE) se fait par la citerne CIS. Puis les molécules traversent les citernes MEDIAL et TRANS, et se retrouvent dans les vésicules de transport du « trans-Golgi network » (TGN) afin d'être exportées. **1) Modèle de « transport vésiculaire antérograde » :** les glycomolécules synthétisées sont transportées de citerne en citerne par des vésicules de transport. Les glycosyltransférases sont retenues dans les différentes citernes. **2) Modèle de « maturation des citernes / transport rétrograde » :** les glycosyltransférases sont recyclées par transport rétrograde pour établir une différence de concentration entre les différentes citernes. D'après Caffall and Mohnen, (2009) et Opat et al. (2001).

(Ishii et al., 1999). Il n'y a pas d'évidence de liaison au apiose de la chaîne B ([figure 10](#) ; O'Neill et al., 2004). Il a même été montré que le RG-II ne pouvait pas exister sans bore, et vice versa (Matoh et al., 1996). De plus, la formation de dimères est un processus qui peut avoir lieu *in vitro*, sans la nécessité d'une protéine catalytique (Ridley et al., 2001). La complexation du RG-II au bore a été observée aussi bien chez les angiospermes et les gymnospermes (Kobayashi et al., 1996; Matoh et al., 1996; O'Neill et al., 1996; Shimokawa et al., 1999) que chez les lycophytes et les ptéridophytes (Matsunaga, 2004). Le fait que cette complexation du RG-II *via* le bore est présente dès le début de l'apparition des plantes terrestre témoigne de son rôle structurel fondamental au sein de la paroi primaire (O'Neill et al., 2004).

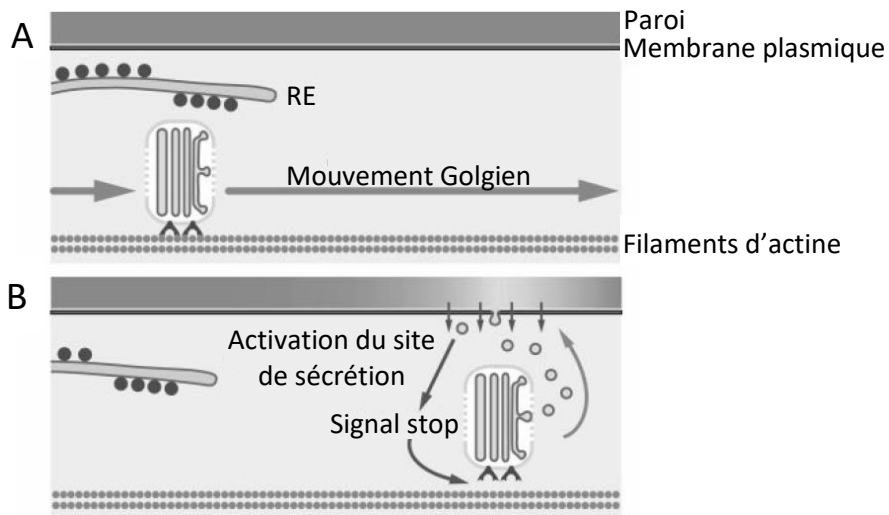
Afin d'étudier la présence de RG-II, l'anticorps CCRC-R1 peut être utilisé pour détecter le RG-II par immunolocalisation (Williams et al., 1996).

#### I.2.4.c. Synthèse des pectines

Tout comme les hémicelluloses, la synthèse des pectines a lieu dans l'appareil de Golgi, grâce à l'action de glycosyltransférases membranaires, qui nécessitent des nucléotides-sucres substrats et accepteurs spécifiques. Les polysaccharides sont alors triés et empaquetés dans des vésicules de transport, pour pouvoir être acheminés vers la membrane plasmique, la plaque de division des cellules en division, ou la vacuole. Une fois acheminé vers la membrane plasmique, ils sont sécrétés vers la paroi cellulaire (Caffall and Mohnen, 2009).

L'appareil de Golgi est composé de quatre régions distinctes : le *cis*, le *medial* et le *trans*-Golgi, ainsi que le « *trans*-Golgi network » (TGN), qui correspond aux vésicules de transport émises par l'appareil de Golgi ([figure 11](#)). Les glycosyltransférases y sont réparties de manière asymétrique, et chaque citerne possède des fonctionnalités spécifiques. Les polysaccharides pariétaux y sont continuellement synthétisés, et se déplacent depuis les citernes *cis* vers la citerne *trans*-Golgi. Le mouvement des polysaccharides et le maintien de la répartition asymétrique des glycosyltransférases n'est pas encore clairement établi, mais serait dû à deux mécanismes différents mais non mutuellement exclusifs, qui auraient lieu en même temps ([figure 11](#)). Il s'agit du modèle de « transport vésiculaire antérograde » et du modèle de « maturation des citernes / transport rétrograde ». Ce qui différencie les deux modèles est le mouvement des enzymes résidentes et du contenu. Dans le premier modèle, les glycosyltransférases membranaires sont retenues dans les différentes citernes, alors que les glycomolécules synthétisées sont transportées de citerne en citerne par des vésicules de transport. Selon le deuxième modèle, les enzymes résidentes sont recyclées par transport rétrograde pour établir une différence de concentration entre les différentes citernes, tandis que le contenu est transporté de manière passive à travers les différentes vésicules Golgiennes, à mesure que les citernes avancent, depuis les citernes *cis* vers le *trans*-Golgi (Caffall and Mohnen, 2009; Opat et al., 2001).

À l'aide d'anticorps spécifiques, le lieu de synthèse de différentes pectines à l'intérieur des vésicules de Golgi a pu être identifié. Les épitopes du RG-I et des HG déméthylestérifiés ont été identifiés dans le *cis*, le *medial* et le *trans*-Golgi. Les chaînes principales des HG et du RG-I sont assemblées dans les citernes *cis* et *médiales*, la méthylestérification des acides



**Figure 12 : Modèle de régulation des mouvements de l'appareil de Golgi et de la sécrétion contrôlée de polysaccharides.** **A)** Les vésicules de l'appareil de Golgi se déplacent le long des filaments d'actine, grâce à la myosine qui fait office de moteur. **B)** Les zones où la paroi nécessiterait un apport en polysaccharides seraient capables d'émettre un signal vers l'appareil de Golgi. Ce signal stopperait son mouvement, permettant ainsi la sécrétion de polysaccharides vers la paroi grâce aux vésicules de transport. D'après Nebenführ et al. (1999).

polygalacturoniques a lieu principalement dans la citerne *médiale*, et les chaînes latérales d'arabinose sont ajoutées dans la citerne *trans* (Zhang and Staehelin, 1992).

De nombreuses glycosyltransférases sont nécessaires pour synthétiser l'ensemble des pectines, énumérées dans la revue Caffall and Mohnen (2009). 4 glycosyltransférases sont référencées pour la synthèse des HG, 36 pour le RG-I, et 19 pour le RG-II.

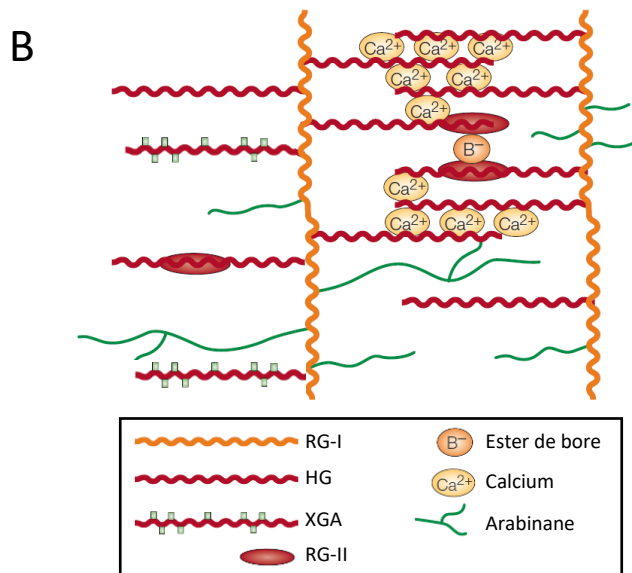
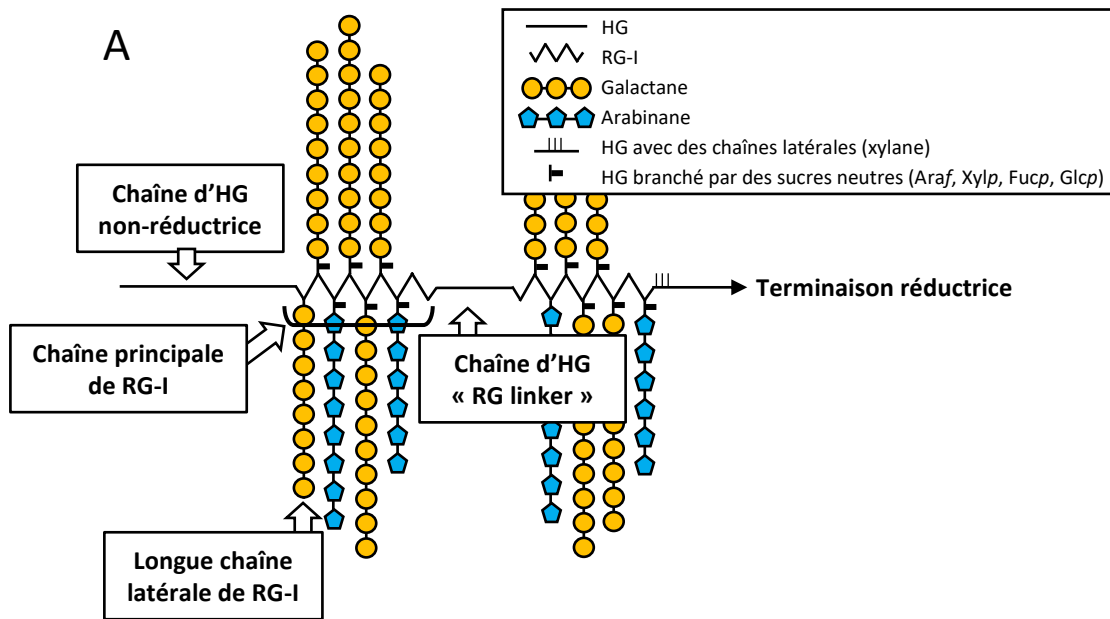
Les pectines ne sont pas présentes dans les mêmes proportions entre la paroi primaire et secondaire, et présentent des spécificités d'expressions cellulaires et à différents moments du développement. Leur sécrétion est donc régulée de manière temporelle, spatiale et développementale (Ridley et al., 2001).

L'acheminement des polysaccharides aux endroits nécessaires (sites d'expansion de la paroi, ou zones plus fragiles) serait régulés grâce à des signaux entre la paroi et l'appareil de Golgi. En effet, l'appareil de Golgi est mis en mouvement grâce aux filaments d'actines et à la myosine (**figure 12 A**). Nebenführ et al., 1999 ont émis l'hypothèse que les zones où la paroi nécessite l'apport de nouveaux polysaccharides serait capable d'émettre un signal vers l'appareil de Golgi. Ce signal, probablement un signal calcique, engendrerait un découplage entre l'appareil de Golgi et le réseau d'actine. L'appareil de Golgi deviendrait alors provisoirement immobile, et sécréterait *via* les vésicules du TGN les polysaccharides à cet endroit précis (**figure 12 B**).

#### I.2.4.d. La structure du réseau pectique

Les domaines des HG, RG-I et RG-II seraient liés de façon covalente pour former un réseau pectique au niveau de la paroi primaire et de la lamelle moyenne (Willats et al., 2001). Différents modèles de structure de pectines ont été proposés : i) la chaîne principale des pectines consisterait en une alternance de RG et d'HG (**figure 13 A**; Matsushashi et al., 1993; Nakamura et al., 2002; Willats et al., 2001). ii) la chaîne principale consisterait au contraire de RG-I, avec des chaînes latérales d'HG et de XGA (**figure 13 A**; Cosgrove, 2005; Ulvskov et al., 2005; Vincken, 2003). Quant au RG-II, il semblerait logique qu'il soit lié aux HG de façon covalente, puisqu'ils partagent le même squelette de  $\alpha(1\rightarrow4)$  D-GalA, et qu'ils sont tous les deux solubilisés suite au traitement de la paroi cellulaire par des endopolygalacturonases (Ridley et al., 2001).

Pour pouvoir élucider la structure des pectines, Coenen et al. (2007) ont étudié les fragments libérés lors de l'hydrolyse acide de pectines de pomme, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC-MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) et par spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), afin d'étudier les oligomères pouvant représenter les points d'interconnexion des pectines. Ils ont ainsi montré que les oligomères GalA<sub>3</sub>Rha<sub>1</sub>, GalA<sub>4</sub>Rha<sub>2</sub>, et GalA<sub>5</sub>Rha<sub>3</sub> détectés consistent en un segment d'HG et de RG-I connectés par une liaison GalA $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) Rha $\beta$ . De plus, un oligomère GalA<sub>6</sub>Rha<sub>3</sub>Xyl<sub>1</sub> a été identifié comme étant un segment de XGA et de RG-I. Ces oligomères indiquent que chez les pectines de pomme, les HG et le XGA sont liés de façon covalente au RG-I, ce qui n'avait pas encore été prouvé expérimentalement. De plus, les structures des



**Figure 13 : Différents modèles des complexes pectiques proposés dans la littérature. A) Modèle du réseau pectique selon Nakumura et al., 2002 et Matsushashi et al., 1993.** Ce schéma, adapté de Nakumara et al., 2002, correspond aux polysaccharides acides solubles de type pectique issus de cotylédons de soja. Le réseau pectique serait une alternance d'HG et de RG-I. Le RG-II n'apparaît pas dans ce type de modèle. **B) Modèle du réseau pectique d'après Cosgrove 2005, adapté de Vincken et al., 2003.** Les différents domaines pectiques seraient liés de façon covalente, mais la nature des liaisons n'a pas encore été établie. Cependant, des liaisons via le bore et le calcium seraient importantes aux liaisons du réseau pectique. Selon ce modèle, le RG-I correspond à la chaîne pectique principale, et les autres domaines pectiques (XGA, RG-II, arabinane) sont des chaînes latérales du RG-I. Araf : arabinofuranose ; Fucp : fucopyranose ; Glcp : glucopyranose ; HG : homogalacturonane ; RG linker : liaison entre deux parties de RG ; RG-I : rhamnogalacturonane de type I ; RG-II : rhamnogalacturonane de type II ; XGA : xylogalacturonane ; Xylp : xylopyranose.

oligomères montrent que les blocs de RG-I se trouvent en position terminale réductrice de l'oligomère, alors que les blocs d'HG/XGA sont à l'extrémité non réductrice. Les deux blocs sont liés par des liaisons  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2). Ces résultats sont partiellement en accord avec la première hypothèse i), où la chaîne principale des pectines consiste en une structure consécutive d'éléments HG et RG-I, sans pouvoir exclure totalement l'hypothèse ii), car tous les points de connexion n'ont pas pu être identifiés.

Plus récemment, Morris et al., (2011) suggèrent que les HG et le RG-I n'existent pas sous la forme d'une seule molécule, mais sous la forme d'un mélange structural.

Actuellement, il n'y a donc encore aucun consensus sur la structure des pectines clairement établi.

#### 1.2.4.e. Les multiples fonctions des pectines

Nous avons déjà vu que la paroi cellulaire possède de nombreux rôles dans la vie d'une plante, incluant son intégrité structurale, sa croissance et son développement, l'adhésion cellulaire, la communication des cellules entre-elles, et la protection face aux pathogènes ou herbivores. Le rôle spécifique des pectines dans ces fonctions est à l'étude. Les HG, le RG-I et le RG-II sont des polysaccharides avec des structures différentes, et chacun d'entre-eux apporte des caractéristiques différentes à la paroi. De plus, les fragments de ces polysaccharides appelés oligogalacturonides (OG) peuvent également avoir des fonctions spécifiques.

##### *Rôles des pectines au sein de la paroi*

###### ➤ *La structuration de la paroi*

Les pectines sont principalement situées au niveau de la paroi primaire, et en moindre quantité dans la paroi secondaire. Elles y jouent un rôle de structuration. En effet, elles permettent d'espacer les microfibrilles de cellulose par la formation d'un gel hydraté, facilitant ainsi leur glissement durant la croissance cellulaire. Une fois la croissance terminée, les pectines ont pour rôle de stabiliser ces mêmes microfibrilles (Cosgrove, 2005; Willats et al., 2001). Le gel hydraté que forment les pectines est donc un facteur important de la porosité, de l'hydratation, et de l'épaisseur de la paroi. Il permet également le mouvement et l'accès des enzymes de modifications des pectines à travers la matrice (Willats et al., 2001). Ce rôle est très important, puisque ces enzymes de remodelage des pectines sont responsables de modifications des propriétés physico-chimiques et mécaniques de la paroi (Wolf et al., 2009).

De manière plus détaillée, ce sont les structures en « boîtes à œuf » d'HG liés au calcium qui forment un gel hydraté, permettant à la fois d'espacer les microfibrilles lors de la croissance (Liners et al., 1989; Wolf et al., 2009), mais aussi de rigidifier la paroi une fois la croissance terminée (Caffall and Mohnen, 2009; Ezaki et al., 2005; Stolle-Smits et al., 1999). Mais les chaînes latérales de sucres neutres des pectines en général participeraient à la capacité de rétention d'eau. C'est tout du moins ce que proposent Ulvskov et al., (2005).





D'autre part, la rétention d'eau des pectines serait une faculté qui serait très importante lors de l'expansion cellulaire (Ulvskov et al., 2005).

Le RG-II permet également de structurer la paroi. Le mutant *mur1* (Reiter et al., 1993), déficient en L-fucose, contient des quantités normales de RG-II, mais présente seulement 50 % de RG-II liés au bore au niveau des feuilles de rosette, contre 95 % chez le sauvage (O'Neill, 2001). Il en résulte des plantes anormalement petites par rapport au sauvage, ainsi que des inflorescences fragiles et plus facilement cassantes. L'observation au microscope électronique a permis de mettre en évidence que les cassures des inflorescences sont dues à la rupture de la paroi, et non à la séparation cellulaire au niveau des lamelles moyennes. La quantification en cellulose et autres polysaccharides pariétaux n'a pas révélé de différences entre le sauvage et le mutant, indiquant que la mutation *mur1* n'altère pas les autres composants de la paroi, en revanche elle affecte les propriétés mécaniques de celle-ci (Reiter et al., 1993).

Le RG-I apporte aussi sa contribution à la structuration de la paroi. C'est ce que des lignées transgéniques de pommes de terre (*Solanum tuberosum* L. ; Oomen et al., 2002; Ulvskov et al., 2005) ont permis de démontrer. La structure du RG-I de ces lignées est modifiée *in vivo* grâce à des enzymes fongiques (McCann et al., 2001; Vincken et al., 2000). Trois lignées sont disponibles : l'une avec la chaîne principale du RG-I fragmentée après dépôt à la paroi (Oomen et al., 2002), une deuxième dont les chaînes d'arabinanes sont éliminées dans l'appareil de Golgi (T7.2), et une troisième dont les chaînes de galactanes sont réduites après dépôt à la paroi (T13.1) par rapport au sauvage (Ulvskov et al., 2005).

La lignée dont la chaîne principale du RG-I est touchée présente des tubercules avec une altération de la morphologie, ce qui a notamment pour origine un gonflement radial des cellules du périoderme et le développement d'espaces intercellulaires au niveau du cortex. En plus de l'altération de la chaîne principale du RG-I, les transformants présentent une diminution importante des chaînes latérales de galactanes et d'arabinanes. Les chaînes d'arabinanes résiduelles sont observées au niveau de la lamelle moyenne et dans les méats cellulaires, alors qu'elles sont habituellement situées au niveau de la paroi primaire. Ces données suggèrent que le RG-I a pour rôle de maintenir les chaînes d'arabinanes et de galactanes à des localisations spécifiques de la paroi, et est requis pour le développement normal du périoderme (Oomen et al., 2002).

Ulvskov et al., (2005) ont analysé uniquement les tubercules des lignées T7.2 et T13.1. Peu de différences significatives ont été observées entre les tubercules sauvages et mutants. Cependant, ils ont remarqué que l'eau s'évaporait plus facilement des disques de tubercules provenant de la lignée T13.1 par rapport au sauvage, ce qui serait lié au rôle de rétention d'eau des pectines, et notamment des chaînes latérales de sucres neutres. Ils ont également constaté que les tubercules issus des deux lignées transformées soumises à une compression uni-axiale sont plus fragiles que ceux du sauvage. Leur hypothèse est que la matrice pectique joue un rôle dans la transmission des stress à la cellulose, et que le moindre changement des propriétés rhéologiques de la matrice a des conséquences sur les propriétés biophysiques de la paroi.



Enfin, les pectines influencent le pH de la paroi, grâce à l'action des HGME, notamment les PME, par la libération de protons qu'elles engendrent. L'acidification de la paroi suite à l'action des PME pourrait permettre à d'autres enzymes de pouvoir exercer leur rôle, comme les PG, qui sont actives à pH acide (Hocq et al., 2017; Pelloux et al., 2007; Senechal and Wattier et al., 2014).

Le rôle des pectines dans la structuration de la paroi implique qu'elles ont également des fonctions dans l'expansion cellulaire, puisque le réseau pectique connaît des modifications durant les différentes étapes de croissance. Voir partie II.2.2.

#### ➤ *La cohésion cellulaire*

La présence des pectines au niveau de la lamelle moyenne, leurs liaisons aux pectines de la paroi ainsi qu'au calcium permet la cohésion des cellules entre elles. En effet, l'action d'enzymes de dégradation des pectines et de chélateurs de calcium résulte en la séparation cellulaire de certains tissus (Knox, 1992). Cependant, l'idée que la lamelle moyenne agit comme une glue liant deux cellules entre elles n'est pas représentative de la réalité. Effectivement, la glue est généralement utilisée pour assembler deux éléments initialement séparés, or deux cellules jointes par la lamelle moyenne n'ont jamais été séparées. D'autre part, les contraintes qui tendent à séparer les cellules ne sont pas réparties uniformément sur la surface cellulaire, mais sont concentrées au niveau des méats cellulaires (jonctions tricellulaires) et des coins des espaces intercellulaires. C'est à ces points que se situent des zones de renforcement, qui sont reconnaissables en microscopie électronique, car leur composition en polymères diffère de la lamelle moyenne et de la paroi cellulaire primaire. Ce sont ces zones de renforcement qui supportent les contraintes de turgescence et qui empêchent la séparation cellulaire en premier lieu (Jarvis et al., 2003). Des analyses immuno-histochimiques révèlent que les pectines de la lamelle moyenne et des zones de renforcement sont caractérisées par de faibles quantités, voire une absence totale, de RG-I (Jones et al., 1997) et de RG-II (Matoh et al., 1998). En revanche, chez un large panel de tissus végétaux de plantes dicotylédones, les HG faiblement méthylestérifiés sont plus abondants au niveau de la lamelle moyenne, et plus particulièrement au niveau des zones de renforcement (Iwai et al., 2001; Jarvis et al., 2003; Knox et al., 1990).

Malgré les résultats immuno-histochimiques qui concluent de l'absence de RG-I et de RG-II à la lamelle moyenne, Iwai et al. (2001, 2002) ont démontré que le RG-I et le complexe du RG-II au bore ont un rôle crucial dans l'adhésion intercellulaire. Comme l'indiquent les résultats immuno-histochimiques, il se peut que le RG-I et le RG-II soient en effet uniquement présents au niveau de la paroi, mais qu'ils soient liés aux HG de la lamelle moyenne, permettant l'adhésion cellulaire. Il est également possible que contrairement à ce qu'indiquent les résultats immunohistochimiques, le RG-I et le complexe du RG-II au bore soient bel et bien présents dans la lamelle moyenne, puisqu'il a été démontré qu'ils ont un rôle dans l'adhésion cellulaire (Iwai et al., 2001, 2002), et que celle-ci est due à la lamelle moyenne (Reece et al., 2011a). Les différences de conclusions pourraient alors avoir pour origine un masquage d'épitope lors des analyses immuno-histochimiques. Il est en effet décrit



dans la littérature que les trois domaines pectiques, les HG, le RG-I et le RG-II sont liés de façon covalente dans la paroi primaire ainsi que dans la lamelle moyenne (Willats et al., 2001).

Il est intéressant de noter la méthode utilisée par Iwai et al. (2001, 2002) pour étudier le RG-I et le RG-II. Ils ont démontré les rôles du RG-I et du complexe RG-II au bore grâce à des mutants *nolac* (*non-organogenic callus with loosely attached cells*; Iwai et al. 2001, 2002). Les auteurs ont réussi à contourner un problème fréquemment observé lors de mutations touchant les polysaccharides pariétaux : l'obtention de mutations létales à l'état embryonnaire. Pour détourner ce problème, ils ont étudié des mutants obtenus par transformation de disques de feuilles de tabac haploïde *Nicotiana plumbaginifolia* et conservé sous forme de cals (Iwai et al., 2001, 2002; Marion-Poll et al., 1993).

Une autre équipe a démontré l'implication du RG-I dans la cohésion cellulaire, en établissant un lien entre la perte des chaînes latérales du RG-I et la perte de fermeté des fruits ainsi que la séparation cellulaire durant le stockage prolongé des pommes (Pena, 2004).

Enfin pour finir, les HG ont eux aussi prouvé leur contribution dans l'adhésion cellulaire, grâce aux mutants *quasimodo1* et *quasimodo2* (Bouton, 2002; Mouille et al., 2007), qui présentent une taille et une adhésion cellulaire réduite par rapport au sauvage, ainsi qu'une quantité d'HG fortement diminuée. Le degré de méthylestérfication n'est cependant pas modifié.

#### ➤ *La dissociation cellulaire contrôlée*

La dissociation contrôlée des liaisons entre la lamelle moyenne et la paroi par la dégradation des pectines est requise pour de nombreux évènements qui font partie de la vie de la plante. Notamment, elle est responsable ou participe à la formation de l'espace intercellulaire des tissus parenchymateux (Willats et al., 2001), au développement des fruits (Brecht and Huber, 1988), à la déhiscence des gousses et à la différenciation des cellules de la coiffe racinaire (Roberts, 2000), ainsi qu'aux différents phénomènes d'abscission (Bonghi et al., 1992; Kalaitzis et al., 1997; Morre, 1968; Roberts, 2000).

L'abscission est un mécanisme utilisé par la plante pour se séparer de certains organes, notamment les fleurs, les fruits ou les feuilles, en réponse à des signaux développementaux (fleurs infertiles ou fruits mûrs). L'abscission a également lieu pour que la plante puisse s'adapter à des stress environnementaux tels que le froid, la sécheresse ou une insuffisance de lumière. Enfin, elle peut se produire en tant que réponse de défense suite à l'attaque d'un pathogène ou d'un herbivore. Elle ne concerne pas uniquement les feuilles et les fruits, mais également de nombreuses parties de la plante comme les branches, les racines, les bourgeons végétatifs, etc. (Kalaitzis et al., 1997).

L'abscission et la maturation des fruits possèdent des similitudes. Dans un premier temps une production d'éthylène (hormone nécessaire à la maturation des fruits climactériques comme la tomate, Smith et al., 1990) est observée, puis une apparition de l'activité PG, responsable de la dissolution des HG de la lamelle moyenne, qui permet la séparation cellulaire dans le cas de l'abscission des feuilles, ou la maturation des fruits (Hobson, 1965;



Morre, 1968). D'autres enzymes de dégradation de la paroi peuvent être nécessaires, telles que des endoglycanases ayant pour cibles la cellulose et les hémicelluloses (Rose and Bennett, 1999). L'activité PG n'est d'ailleurs pas toujours observée (Bonghi et al., 1992). Malgré le fait que l'importance du RG-I et du RG-II dans la cohésion cellulaire ait été démontré (cf paragraphe précédent), les articles traitant l'abscission des feuilles et des fruits ou de la maturation des fruits ne mentionnent que l'activité PG, visant les HG (Bonghi et al., 1992; Cárdenas-Pérez et al., 2018; Kalaitzis et al., 1997; Morre, 1968; Smith et al., 1990).

L'augmentation de l'activité enzymatique précédant les phénomènes de séparations cellulaires serait plus probablement due à une production *de novo* des enzymes pectinolytiques, plutôt qu'à l'activation de précurseurs enzymatiques, ou à la libération d'enzymes liées à la paroi en attendant d'accomplir leurs rôles (Brady et al., 1982; Morre, 1968; Tucker and Grierson, 1982). Il existerait cependant des étapes intermédiaires entre la production d'éthylène et la production de protéines pectinolytiques, si l'on étudie le mutant de tomate *non-ripening* (Brady et al., 1982; Buescher et al., 1976). Ce mutant est déficient en polygalacturonases, bien qu'il possède une faible augmentation de la production d'éthylène, permettant d'obtenir des fruits jaunes. Lorsque les fruits du mutant *non-ripening* sont traités avec de l'éthylène, on observe une augmentation du taux de respiration et un changement de couleur, mais le mûrissement n'est pas total, et aucune activité polygalacturonase n'est observée. C'est pourquoi il est conclu qu'il existe des étapes intermédiaires entre le pic de production d'éthylène et la synthèse d'enzymes pectinolytiques (Brady et al., 1982).

➤ *Reproduction : croissance du tube pollinique et hydratation des graines*

Les pectines jouent également un rôle dans le développement des tubes polliniques. Des HG hautement méthylestérifiés s'accumulent dans la paroi à la pointe du tube pollinique, alors que les HG faiblement méthylestérifiés sont soit observés sur l'intégralité du tube pollinique, soit sur l'intégralité du tube pollinique excepté à la pointe, comme chez diverses familles de plante, dont *A. thaliana* (Mollet et al., 2013). Cette différence de méthylestérification entre la pointe et la longueur du tube pollinique pourrait suggérer la présence de renforcement de la paroi le long du tube pollinique par la formation de boîtes à œuf entre les HG et le calcium, alors qu'au niveau de la pointe du tube pollinique, les HG seraient susceptibles d'être dégradés par des polygalacturonases et des pectates lyases, afin de permettre l'allongement du tube pollinique. La présence de chaînes latérales du RG-I, notamment les arabinanes, a également été détectée dans la paroi des tubes polliniques d'*A. thaliana*, distribués tout autour du tube pollinique. Quant au RG-II, il est également détecté sur toute la longueur de la paroi du tube pollinique du lis, mais pas chez l'épicéa.

Récemment, trois gènes impliqués dans la synthèse du RG-II (*KDO-8-P SYNTHASE*, Delmas et al., 2008 ; *RG-II XYLOSYLTRANSFERASE*, Liu et al., 2011 et *SIALYLTRANSFERASE-LIKE*, Deng et al., 2010) ont été caractérisés pour jouer un rôle important durant l'élongation du tube pollinique chez *A. thaliana*, puisque les mutants ou doubles mutants de ces gènes sont incapables de former un tube pollinique allongé, et d'assurer la fécondation (Mollet et al., 2013). Un autre gène, codant pour une enzyme nécessaire à l'activation du Kdo en nucléotide-





sucres pour la synthèse de RG-II (CTP:Kdo cytidyltransferase), a également prouvé la nécessité du RG-II dans la croissance du tube pollinique, puisque la mutation de ce gène induit une inhibition de l'élongation du tube pollinique (Kobayashi et al., 2011).

La capacité de rétention d'eau des pectines du mucilage séminal leur donne également un rôle dans l'hydratation des graines, la médiation de la germination des graines, la prévention de la dispersion des graines ou de la prédation par entrave des graines au sol, mais aussi la promotion de la dispersion des graines par attachement aux animaux (Western, 2012). De plus, les pectines et la régulation de leur DM semblent avoir un lien avec le contrôle de la libération de mucilage. En effet, PME16 favorise la libération du mucilage d'*A. thaliana* en limitant la méthylestérification des HG des cellules épidermiques du manteau des graines (Saez-Aguayo et al., 2013).

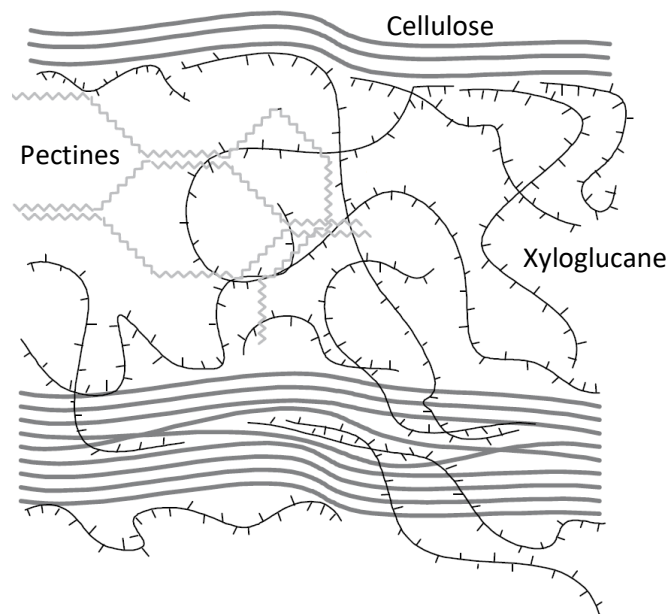
### *Rôles des oligogalacturonides*

#### ➤ *La production d'éthylène ?*

Certaines publications ont recherché si les OG relargués suite à la dégradation des HG par des endopolygalacturonases et des endopectates lyases, étaient à l'origine du mûrissement des fruits, grâce à leur capacité à induire la production d'éthylène (Brecht and Huber, 1988; Campbell and Labavitch, 1991). En effet, les différents auteurs qui ont étudié le sujet n'ont pas observé la même chronologie entre la production d'éthylène et la production des enzymes responsables du mûrissement des fruits. Pour certains auteurs, la production d'éthylène chez les tomates en maturation a lieu avant l'apparition des transcrits de polygalacturonases et de leurs protéines (Brady et al., 1982), mais d'autres ont observé le contraire (Poovaiah and Nukaya, 1979). Brecht et Huber (1988) ont pu démontrer que l'infiltration de pectines dans des tomates immatures entraînait une augmentation de la production d'éthylène chez ces fruits, comparé aux fruits infiltrés par du tampon. Cependant, en infiltrant des fruits immatures par des PGs actives ou des PGs dénaturées, provenant de périsperme de fruit mûr, ils ont observé peu de différences en termes de différence maturation entre les fruits. Ces résultats ne soutiennent pas l'hypothèse que les fragments pectiques générés par les PGs stimulent le mûrissement. De plus, des fruits de tomate exprimant des ARN antisens de polygalacturonase, présentent une réduction de 99 % de l'activité polygalacturonase ainsi qu'une réduction de la dégradation des pectines, mais ni leur production d'éthylène, ni le mûrissement des fruits ne sont affectés (Smith et al., 1990).

#### ➤ *La défense et la signalisation*

Les OG possèdent un rôle fondamental dans la défense de la plante et dans la signalisation. En effet, ils sont produits suite à la dégradation des HG de la paroi végétale par des enzymes produites par les pathogènes. Ces fragments pectiques, reconnus comme étant des marqueurs de dommages de la plante (DAMPs : damage associated molecular patterns) agissent comme éliciteurs des réponses de défenses des plantes (Brutus et al., 2010; Cervone et al., 2015; Ferrari, 2013). Ils sont constitués de deux à vingt résidus  $\alpha(1\rightarrow4)$  D-GalA linéaires. La plante est capable de les détecter, et met alors en place différents mécanismes de défense, dont le renforcement de la paroi. Ce renforcement pariétal est dû à



**Figure 14 : Ancien modèle de la structure de la paroi cellulaire.** Les microfibrilles de cellulose contiennent des régions non-cristallines qui se forment suite au piégeage d'hémicelluloses comme le xyloglucane. Le xyloglucane peut également se lier à la surface de la cellulose, ce qui permet d'unir deux microfibrilles adjacentes entre elles. Enfin, les pectines forment un gel hydraté qui remplit les espaces entre les microfibrilles. D'après Cosgrove (1997).

la réticulation de lignine, de protéines et de carbohydrates, grâce à la présence de peroxydases et de formes réactives de l'oxygène (Ridley et al., 2001).

Les OG relargués suite à une attaque de pathogène n'influent pas seulement sur la défense de la plante, mais aussi sa croissance et son développement, en inhibant l'élongation des tiges (étude menée sur le pois), la formation des racines, et en augmentant la formation des stomates (observés sur des explants de feuilles de tabac). Les effets observés des OG sur la morphogenèse d'explants de tabac peuvent être reproduits en cultivant les explants sur un milieu contenant des concentrations d'auxine réduites (Ridley et al., 2001).

### I.3. Agencement des polysaccharides pariétaux

Le premier modèle structurel d'agencement des polysaccharides pariétaux qui a été communément accepté est que la paroi est composée de deux réseaux : un réseau de cellulose lié aux hémicelluloses, formant un ensemble fort et résistant, intégré dans une matrice hydratée de pectines ([figure 14](#) ; Carpita and Gibeaut, 1993; Cosgrove, 1997, 2001).

Cependant, les premiers modèles de la structure de la paroi sont basés uniquement sur des observations en microscopie électronique, ou sur des digestions chimiques ou enzymatiques, qui sont des approches limitées pour analyser des interactions non-covalentes, et qui perturbent considérablement la structure native de la paroi (Wang et al., 2018). Les nouvelles méthodes d'analyse, notamment la RMN à plusieurs dimensions, et également la caractérisation de nouveaux mutants ont permis de remettre à jour le modèle structural de la paroi (Broxterman and Schols, 2018; Dick-Pérez et al., 2011; Höfte et al., 2012; Park and Cosgrove, 2012a, 2012b; Wang et al., 2015).

Un premier élément frappant est le fait qu'un mutant déficient en xyloglucane, le principal type d'hémicellulose, (*xylosyltransferase1 / xylosyltransferase2* [*xxt1 / xxt2*]; Park and Cosgrove, 2012b) présente un développement plutôt similaire au sauvage, hormis une taille plus petite. Ces résultats remettent en cause le rôle porteur du xyloglucane dans la structuration de la paroi. De plus les parois du double mutant sont plus extensibles que celles du sauvage, ce qui sous-entend que le xyloglucane a plutôt un rôle de renforcement de la paroi.

De plus, des analyses sur la structure de la paroi par RMN ont révélé que contrairement à ce qui était communément admis, les pectines présentent des interactions étendues avec la cellulose et les hémicelluloses, alors que les liaisons entre le xyloglucane et la cellulose sont présentes mais limitées par rapport à ce qui pouvait être attendu (Dick-Pérez et al., 2011; Wang et al., 2015). Les premières analyses par RMN indiquaient que seuls 8 % de la surface totale de la cellulose était recouverte de xyloglucane (Bootten, 2004). Mais les premières analyses par RMN à l'état solide ne seraient pas aussi fiables que les analyses de RMN à l'état solide à deux ou à trois dimensions plus récentes (Dick-Pérez et al., 2011), qui montrent que le xyloglucane ne recouvre pas uniformément les microfibrilles de cellulose, mais serait uniquement et partiellement intercalé dans celles-ci (Dick-Pérez et al., 2011).

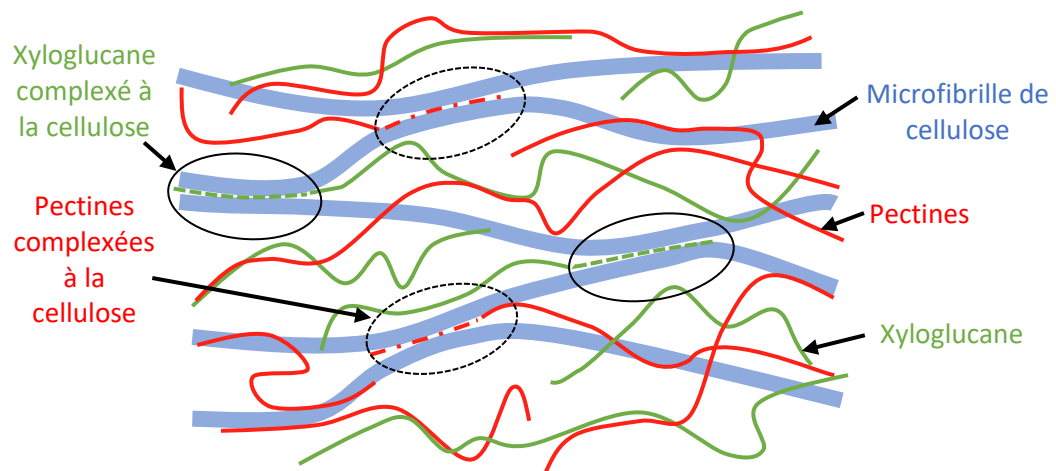


Ces conclusions sur les interactions entre le xyloglucane et la cellulose sont les mêmes que Park and Cosgrove (2012a), obtenues en mesurant le fluage (extension irréversible) de la paroi d'hypocotyles de concombre (*Cucumis sativus*) après traitement avec diverses  $\beta$ -1,4-endoglucanases, capables d'hydrolyser le xyloglucane, la cellulose, ou les deux. Ils ont observé que, pour induire une déformation de la paroi, une endoglucanase capable d'hydrolyser à la fois le xyloglucane et la cellulose est nécessaire, puisque les endoglucanases spécifiques du xyloglucane ou de la cellulose permettent bien d'hydrolyser leurs cibles, mais n'induisent pas de fluage. Les auteurs en déduisent qu'une partie mineure de xyloglucane et relativement inaccessible est entrelacée ou complexée avec la cellulose, et agirait comme liant moléculaire entre deux microfibrilles adjacentes très proches.

Une autre équipe s'est intéressée aux interactions entre la cellulose et les pectines, en étudiant la paroi de trois espèces différentes : la carotte (*Daucus carota*), la tomate (*Solanum lycopersicum*) et la fraise (*Fragaria ananassa*). Ils ont pour cela analysé les interactions des résidus obtenus par extraction séquentielle de la paroi. Les résultats indiquent qu'il existe chez la carotte des interactions uniques entre la cellulose et les pectines, en particulier les chaînes latérales du RG-I. En revanche, ces interactions ne semblent pas être présentes chez la tomate et la fraise. Dans le cas de la carotte, les pectines ne seraient pas emprisonnées dans les microfibrilles de cellulose, mais y seraient liées de façon covalente (Broxterman and Schols, 2018).

Ces résultats rejoignent ceux de Dick-Pérez et al., (2011) vus précédemment, ainsi que ceux de Wang et al., (2015) qui ont analysé spécifiquement les interactions entre la cellulose et les pectines, chez *A. thaliana*, également par RMN à l'état solide à plusieurs dimensions. Leurs travaux révèlent que les liaisons observées entre les pectines, notamment le RG-I et probablement une portion d'HG, ne sont pas dues à un encombrement moléculaire, mais bien à une interaction physique. L'association pectine-cellulose se mettrait en place au moment de la synthèse de la paroi. En revanche, contrairement aux conclusions de Broxterman et Schols (2018), Wang et al., (2015) suggèrent que ces liaisons pourraient impliquer l'emprisonnement des pectines à l'intérieur ou entre les faisceaux de cellulose. La nature des interactions intramoléculaires reste donc à déterminer.

Enfin, ces conclusions sont les mêmes que celles de Zykwincka (2005) qui a observé la liaison *in vitro* entre la cellulose et des pectines riches en chaînes latérales, ainsi que de chaînes d'arabinanes et de galactanes isolées. Cependant, les résultats obtenus *in vitro*, de manière générale, sont à interpréter avec précaution. En effet, Zykwincka (2005) observe également que le xyloglucane est capable d'être adsorbé *in vitro* sur la cellulose, ce qui est en désaccord avec les résultats de Bootten et al., (2009). Ces derniers ont étudié un composite modèle constitué de cellulose de la bactérie *Gluconacetobacter xylinus*, et de xyloglucane de culture de cellules en suspension de tabac. Tout comme Dick-Pérez et al., (2011), ils n'ont pas détecté de signaux de xyloglucane à la surface de la cellulose. La structure de la cellulose d'origine bactérienne ne serait cependant pas exactement la même que chez les plantes (Wang et al., 2015), les résultats de Bootten et al., (2009) doivent donc être pris en compte avec précaution.

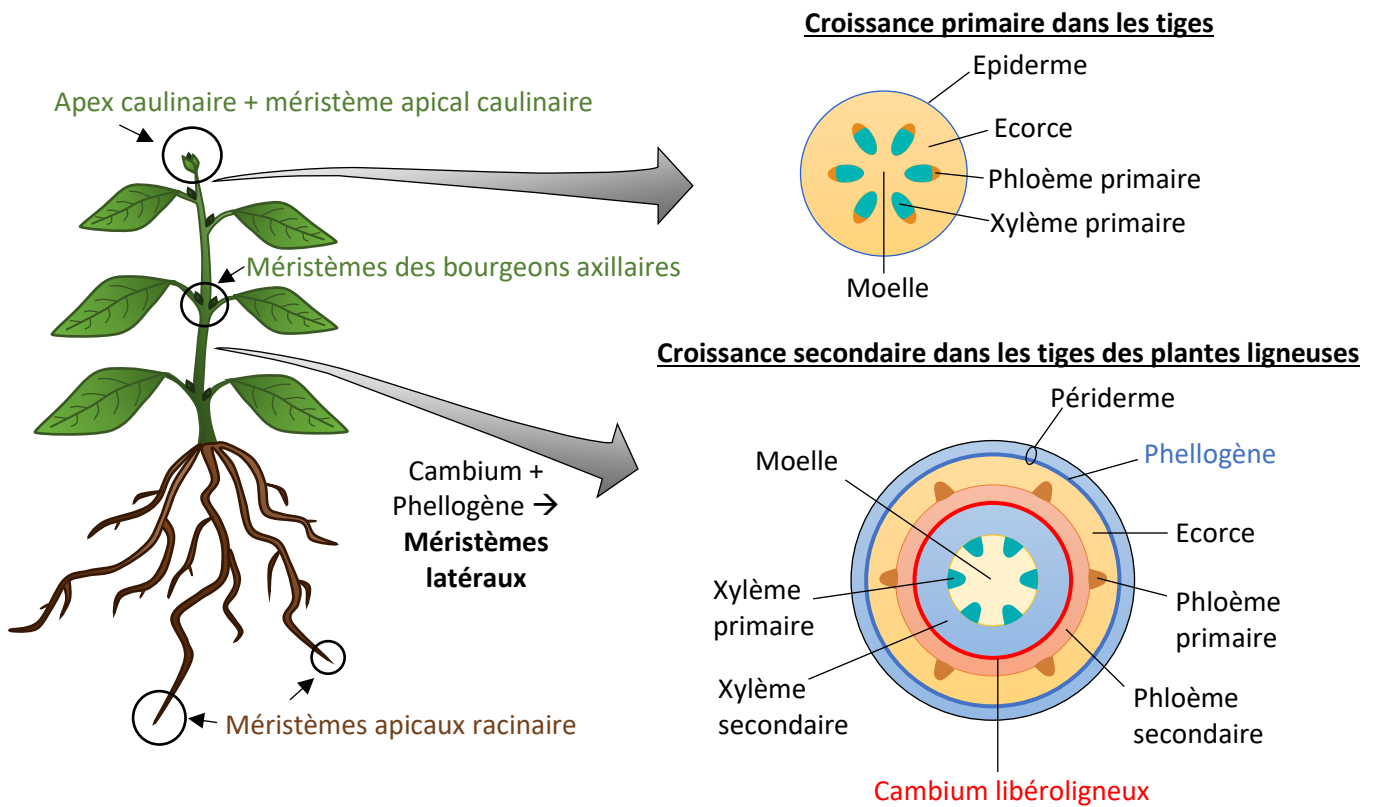


**Figure 15 : Nouveau modèle théorique de la structure de la paroi cellulaire.** Une petite proportion du xyloglucane est entrelacée ou complexée avec deux microfibrilles de cellulose adjacentes. Les pectines présentent une interaction étendue à la fois avec la cellulose et les hémicelluloses (Dick-Pérez et al., 2011; Wang et al., 2015), et une petite portion pourrait être partiellement emprisonnée dans les microfibrilles de cellulose (Wang et al., 2015), tout comme le xyloglucane. Adaptation du schéma de Park and Cosgrove, (2012).

Chebli et Geitmann (2017) mettent en avant que bien que les interactions entre les pectines et la cellulose ou le xyloglucane semblent être nombreuses, la force de ces liaisons individuelles est plus faible que celle entre le xyloglucane et la cellulose, d'après plusieurs publications. De plus, les liaisons pectines-cellulose seraient plus abondantes et plus stables que les liaisons pectines-xyloglucane.

Ces récentes découvertes ont amené à l'établissement d'un nouveau modèle d'architecture pariétale, où il n'y aurait plus qu'un seul réseau : les pectines seraient liées à la fois à la cellulose et aux hémicelluloses, et les microfibrilles de cellulose seraient ponctuellement liées par du xyloglucane par la formation de complexes, et peut être également par des pectines. ([figure 15](#) ; Dick-Pérez et al., 2011; Höfte et al., 2012; Park and Cosgrove, 2012a, 2012b; Wang et al., 2015). Ainsi, l'extension de la paroi serait contrôlée par certains points spécifiques, où les microfibrilles seraient reliées (Cosgrove, 2014).

Comme le propose Iwai et al., (2001), ces observations permettent de reconsidérer la façon dont les pectines cimentent les cellules entre elles. Ainsi, la cohésion cellulaire pourrait être non seulement due à la formation de complexes rigides entre les HG et le calcium, mais également aux interactions entre les pectines et les autres polysaccharides pariétaux. Wang et al., (2015) soulignent en effet que les pectines liées à la cellulose seraient plus rigides que la fraction pectique qui ne l'est pas.



**Figure 16 : La croissance primaire et secondaire chez les végétaux.** La croissance des plantes est due à une division active des cellules au niveau des méristèmes. Les méristèmes apicaux, situés aux extrémités des tiges et des racines, ainsi qu'au niveau des bourgeons axillaires, permettent une croissance en longueur, appelée croissance primaire. Les méristèmes latéraux, qui regroupent le cambium et le phellogène, permettent la croissance en diamètre des tiges et des racines des plantes ligneuses, dont la croissance primaire est terminée. Le phellogène produit des tissus de revêtement secondaires, et le cambium produit du phloème et du xylème secondaire (bois). D'après Reece et al. (2011b).



## Chapitre II. La croissance des plantes et l'élongation cellulaire

Contrairement à la plupart des animaux, qui présentent une croissance embryonnaire et juvénile, les végétaux, dans des conditions propices, peuvent avoir une croissance indéfinie (ou indéterminée). À tout moment de leur vie, ils possèdent des organes embryonnaires, des organes en croissance, et des organes matures. En revanche, certains organes possèdent une croissance définie (ou déterminée) comme les feuilles, les épines et les fleurs. Ces organes cessent de croître une fois une certaine taille atteinte (Reece et al., 2011b).

La croissance quasiment continue des végétaux est due à des tissus indifférenciés appelés méristèmes, dont les cellules se divisent lorsque les conditions le permettent, pour pouvoir ensuite s'allonger et se différencier. Il existe deux types de méristème : les méristèmes apicaux et latéraux (**figure 16**). Les méristèmes apicaux sont situés à l'apex des racines et des tiges, et dans les bourgeons axillaires des pousses. Ils permettent la croissance en longueur, appelée croissance primaire. Grâce à cette croissance, les racines étendent leurs ramifications dans le sol afin de puiser de l'eau, et les parties aériennes accroissent leur exposition à la lumière. La structure des plantes herbacées (non ligneuses) est presque entièrement produite par la croissance primaire, à l'inverse des plantes ligneuses qui présentent une croissance secondaire. Cette croissance correspond à une augmentation de diamètre de certaines zones des tiges et des racines, lorsque la croissance primaire est terminée. La croissance secondaire est due aux méristèmes latéraux, plus précisément au cambium et au phellogène (**figure 16**). Ces structures cylindriques, constituées de cellules en division, s'étendent le long des racines et des tiges. Le cambium est à l'origine du xylème secondaire (le bois) et du phloème secondaire. Le phellogène remplace l'épiderme par le périderme, plus épais et plus solide (Reece et al., 2011b).

Les méristèmes comportent des cellules qui se divisent pour donner de nouvelles cellules, qui vont se spécialiser, et devenir une part intégrante des nouveaux organes formés. Mais certaines cellules restent au niveau des méristèmes en tant que source de cellules : ce sont les cellules initiales, ou cellules souches. Les cellules qui vont s'allonger et se différencier sont les cellules dérivées (Reece et al., 2011b). Les cellules méristématiques en division sont petites (environ 5  $\mu\text{m}$ ) et ont un cytoplasme fortement compact. Puis en s'éloignant du méristème, les cellules entrent en phase d'agrandissement, au cours de laquelle le volume cellulaire augmente considérablement. Par exemple, les cellules conductrices d'eau du xylème vont devenir jusqu'à un million de fois plus volumineuses par rapport au volume de leurs cellules méristématiques initiales (Cosgrove, 2000). Cette croissance est due à l'augmentation du volume cellulaire par le remplissage de la vacuole de la cellule d'eau et de solutés, et par l'extension irréversible de la paroi cellulaire préexistante. De nouveaux polymères sont alors intégrés simultanément à la paroi, pour ne pas qu'elle s'affine et devienne fragile (Cosgrove, 2000, 2005). Pour finir, les cellules accèdent à la phase de différenciation, où leur allongement est nul (Dolan and Davies, 2004).



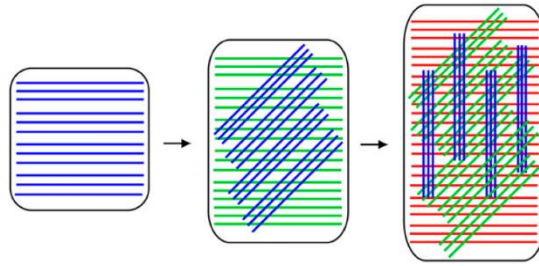
## II.1. Mécanismes et contrôles de l'élongation cellulaire

Deux types d'expansions cellulaires peuvent être recensés : une expansion globale ou locale de la cellule. L'expansion globale concerne aussi bien les expansions isotropiques (symétriques) ou anisotropiques (selon un axe de croissance). L'expansion locale a lieu uniquement chez certaines cellules telles que les tubes polliniques, les poils absorbants racinaires ou les trichomes. Dans ce cas, l'expansion se fait uniquement à l'extrémité de la cellule (Chebli and Geitmann, 2017).

L'élongation cellulaire est due à plusieurs paramètres : la pression de turgescence, l'extensibilité de la paroi, et l'ajout de nouveaux matériaux pariétaux. Elle est initiée par la relaxation pariétale, qui permet à la cellule d'emmagasiner de l'eau à l'intérieur de la vacuole, provoquant l'augmentation de la pression de turgescence interne à la cellule. La paroi cellulaire doit à la fois permettre l'augmentation de la pression de turgescence, tout en assurant la stabilité du tissu. La paroi va alors s'étirer, engendrant une augmentation de la surface cellulaire. Puis de nouveaux matériaux pariétaux vont être assemblés, afin de maintenir l'intégrité de la paroi. Cependant, la paroi étant relativement épaisse et étirable, l'augmentation de la surface pariétale n'est pas strictement corrélée à l'addition de nouveaux matériaux (Chebli and Geitmann, 2017).

L'agrandissement cellulaire est dans un premier temps isotropique, puis pour initier la morphogénèse et la structuration des organes, les cellules indifférenciées vont subir des modifications chimiques et mécaniques pour passer à une croissance orientée, c'est à dire anisotropique. Ainsi, la forme de la cellule est déterminée grâce aux agents de relaxation ou de rigidification de la paroi qui vont agir localement, ainsi qu'à l'addition de nouveaux matériaux pariétaux, et à la modification de leur configuration chimique (Chebli and Geitmann, 2017). Dans le cas de l'organogenèse caulinaire, qui nécessite la formation d'organes latéraux, l'élongation cellulaire redevient ensuite isotropique, grâce à l'auxine (Sassi et al., 2014).

L'auxine a démontré qu'elle influençait l'organogenèse, en induisant une relaxation locale de la paroi, au niveau des zones d'émergence des nouveaux organes, et à la réorganisation des microtubules corticaux (Murray et al., 2012; Sassi et al., 2014). La relaxation locale est due à l'acidification de la paroi. En effet, l'apport exogène d'auxine sur des cellules non-méristématiques induit une extrusion de protons du cytosol vers la paroi, grâce à l'activation par phosphorylation de pompes à proton de la membrane plasmique. Or l'acidification de la paroi est nécessaire à l'activation de protéines qui vont permettre le relâchement pariétal. C'est ce que l'on appelle « la croissance acide » (Hocq et al., 2017; Murray et al., 2012). D'autre part, l'auxine permet la réorganisation des microtubules corticaux, ce qui va engendrer la rupture de la croissance anisotropique des cellules en faveur d'une croissance isotropique, nécessaire à la formation des organes caulinaires, puisque le réseau de microtubule corticaux contrôle l'organisation des microfibrilles de cellulose (Sassi et al., 2014).



**Figure 17: Modèle de la dynamique des microfibrilles de cellulose durant l'extension longitudinale de la paroi cellulaire.** Dans une cellule en expansion longitudinale, les nouvelles microfibrilles de cellulose sont synthétisées de façon transversale à l'axe de croissance, puis sont peu à peu réorientées en position longitudinale (en bleu). La synthèse et la rotation des couches de cellulose suivantes (en vert, puis en rouge), sous la couche initiale de cellulose, résulte en l'obtention d'une paroi avec des microfibrilles de cellulose possédant différents angles. La rotation de la cellulose n'a pas forcément lieu immédiatement après sa synthèse. D'après Anderson et al. (2010).

Les modifications engendrées par l'auxine dépendent cependant de sa concentration et du tissu concerné. En effet, des concentrations faibles ou modérées d'auxine induisent l'élargissement cellulaire, alors que de fortes concentrations d'auxine induisent la répression de la croissance. A des concentrations physiologiques, l'auxine induit préférentiellement la croissance des tissus aériens, et réprime la croissance des tissus racinaires (Dünser and Kleine-Vehn, 2015).

## II.2. La paroi des cellules en expansion

Comme cela a été introduit au paragraphe précédent, des modifications s'opèrent au niveau de la paroi au moment de l'expansion cellulaire. Ces modifications concernent aussi bien la cellulose, les hémicelluloses et les pectines. Elles sont opérées par des enzymes, des protéines non-enzymatiques, des ROS (reactive oxygen species), et peuvent également être passives (Anderson et al., 2010; Chebli and Geitmann, 2017; Hocq et al., 2017; Somssich et al., 2016).

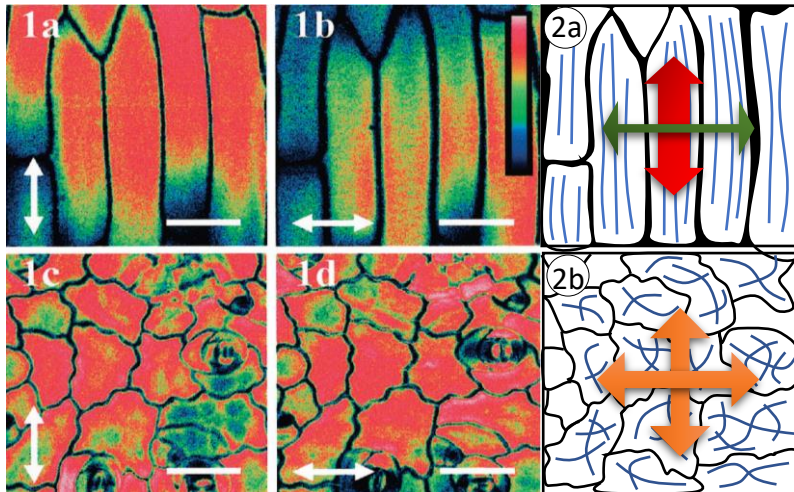
### II.2.1. Modifications du réseau de cellulose et d'hémicellulose

En ce qui concerne la cellulose et les hémicelluloses, deux aspects sont à prendre en considération : la réorientation du réseau de cellulose après sa synthèse, et d'autre part la modification du réseau cellulose / hémicellulose par différentes protéines, qui aident à la réorganisation de la cellulose (Anderson et al., 2010).

#### II.2.1.a. Réorganisation des microfibrilles de cellulose

L'orientation des microfibrilles de cellulose est un paramètre important pour déterminer le sens de croissance de la cellule. L'orientation de la cellulose est due à deux facteurs : sa synthèse, puis sa réorientation. C'est le réseau de microtubules corticaux qui contrôle l'organisation du réseau de cellulose dès sa formation, en guidant la trajectoire des celluloses synthèses CESA de la membrane plasmique (Gutierrez et al., 2009). Puis après leurs synthèses, les microfibrilles sont réorientées de manière passive grâce à la pression de turgescence. Anderson et al., (2010) ont en effet démontré que la cellulose était d'abord déposée de façon transversale pour s'accommoder à l'élongation longitudinale, puis les microfibrilles seraient réorientées progressivement et passivement durant l'expansion de la cellule, jusqu'à une position longitudinale, afin de fortifier la paroi, pour qu'elle puisse résister contre la pression interne, dans des directions variées. Les auteurs proposent donc un modèle de la dynamique des microfibrilles de cellulose durant la croissance, avec de multiples couches de cellulose possédant différentes orientations ([figure 17](#)).

Malgré l'existence de plusieurs couches de cellulose possédant différentes orientations (Anderson et al., 2010), l'équipe de Kerstens et al., (2001) avaient démontré par coloration de la cellulose au Rouge Congo et par microscopie confocale polarisante qu'il y a une orientation préférentielle de la cellulose, et qu'elle est en lien avec la forme de la cellule (isotrope ou anisotrope). Il en résulte que les cellules d'épiderme de bulbe d'oignon (*Allium sativum*), qui ont une forme anisotrope, ont des microfibrilles de cellulose orientées de manière parallèle à



**Figure 18 : Mise en évidence de la relation entre la forme des cellules, l'orientation des microfibrilles de cellulose, et la résistance mécanique des tissus. 1) Microscopie au confocal polarisant sur épiderme de bulbe d'oignon (1a et 1b) et sur feuille de Kalanchoe (1c et 1d) après coloration au Rouge Congo (spécifique des polymères de glucanes liés en  $\beta$ -1,4). Les doubles flèches représentent le vecteur électrique du laser polarisant. Si les microfibrilles sont parallèles, l'intensité de fluorescence est maximale (rouge) lorsque le vecteur électrique du laser polarisant est parallèle à la cellulose. La fluorescence est minimale (bleue) lorsque le vecteur est perpendiculaire à la cellulose. La cellulose est organisée de façon aléatoire s'il n'y a pas d'orientation d'excitation prédominante, et que l'intensité de fluorescence ne dépend pas de l'orientation du vecteur (figure 16). Echelle : 100  $\mu$ m. D'après Kerstens et al. (2001).**

**2) Schématisation du réseau de cellulose (en bleu) et de la résistance à la tension du tissu. 2a) Représentation de l'épiderme d'oignon. La cellulose est parallèle et longitudinale par rapport à l'axe de la cellule. La rigidité est maximale dans le sens longitudinal par rapport à la cellulose (flèche rouge). Le tissu est plus élastique dans le sens transversal (flèche verte). 2b) Représentation de la feuille de Kalanchoe. La cellulose est organisée de façon aléatoire. Le tissu est uniformément peu élastique, quelle que soit la direction de la tension appliquée.**

l'axe longitudinale des cellules ([figure 18 : 1a, 1b](#)). Au contraire, chez les cellules de feuilles de Kalanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana*), qui ont une forme isotrope, la cellulose est orientée de manière aléatoire ([figure 18 : 1c, 1d](#)). Puis par application d'une tension uni-axiale sur des bandes de tissus végétaux, ils ont démontré chez l'épiderme d'oignon qu'il y avait des différences de propriétés mécaniques du tissu, selon l'orientation de la cellulose. L'épiderme d'oignon est plus rigide lorsque la tension est appliquée de manière parallèle à l'orientation des microfibrilles de cellulose, par rapport à une tension appliquée de façon transversale ([figure 18 : 2a](#)). Les cellules d'épiderme d'oignon, donc leurs parois possèdent donc une mécanique anisotrope. A l'inverse, chez les feuilles de Kalanchoe, il n'y a pas de différences mécaniques entre les deux directions d'application de la tension ([figure 18 : 2b](#)).

En conclusion, sous tension, un épiderme dont les parois cellulaires possèdent des microfibrilles de cellulose disposées de façon parallèle s'étirera facilement dans la direction transversale par rapport à l'axe d'orientation des microfibrilles, car dans cette direction, la paroi est très élastique. Dans la direction parallèle aux microfibrilles, la paroi est au contraire très rigide, et la tension provoquera des déformations plastiques. Quant aux parois avec des microfibrilles orientées de manière aléatoire comme chez les cellules isotropes, la paroi présente des déformations plastiques quel que soit le sens de la tension appliquée, car elle possède une élasticité limitée.

La direction de l'extension maximale est donc globalement perpendiculaire à l'orientation des microfibrilles de cellulose, et l'extension de la paroi a pour effet de séparer les microfibrilles transversales les unes des autres. Il est important de souligner que si les parois cellulaires d'épiderme d'oignon possèdent des microfibrilles longitudinales par rapport l'axe de la cellule, ce n'est pas le cas de la plupart des cellules. Mais c'est également le cas pour les cellules d'épiderme de tige (Baskin, 2005).

### II.2.1.b. Protéines de remodelage du réseau cellulose/hémicellulose

Pour pouvoir se réorienter progressivement, les microfibrilles de cellulose nécessitent des modifications pariétales, notamment des remaniements du réseau de cellulose/hémicellulose, grâce à différentes protéines (Anderson et al., 2010). Ces protéines sont principalement des expansines et des endoglucanases (Chebli and Geitmann, 2017).

Il existe deux catégories d'expansines : les  $\alpha$ -expansines, découvertes chez le concombre (*Cucumis sativus* ; McQueen-Mason et al., 1992), et les  $\beta$ -expansines, correspondant à des allergènes de pollen d'herbe, identifiées plus tardivement, et classées dans une autre catégorie ( $\beta$ -expansines) pour les différencier des premières. Les  $\alpha$ -expansines et  $\beta$ -expansines sont codées par de grandes familles multigéniques, et font partie des agents médiateurs de la « croissance acide », puisqu'elles ont une activité optimum à pH acide (Cosgrove, 1997).

Les expansines et les endoglucanases ont prouvé leurs capacités à induire un relâchement pariétal sur des hypocotyles de concombre (Takahashi et al., 2006; Yuan et al., 2001). Bien qu'elles aient une fonction similaire, ces protéines possèdent des caractéristiques et des





modes d'action différents. En effet, les endoglucanases permettent le relâchement de la paroi par leur activité hydrolytique enzymatique, alors que chez les expansines, aucune activité enzymatique n'a été observée (Chebli and Geitmann, 2017; Park and Cosgrove, 2012a; Yuan et al., 2001). De plus, l'endoglucanase fongique Cel12A (provenant de *Trichoderma reesei*) possède une activité d'extension exceptionnellement élevée, environ 4 fois plus importante que ce que peuvent atteindre les  $\alpha$ -expansines dans les mêmes conditions. Cependant, Cel12A marque un temps de latence de 6 min avant l'observation de l'expansion de la paroi, contrairement aux expansines. La raison de celle-ci est inconnue, mais les auteurs suggèrent qu'une partie de glucanes relativement inaccessibles doit être attaquée par Cel12A avant que la paroi ne puisse s'étendre (Yuan et al., 2001). Enfin, les effets de ces protéines sur la paroi sont différents. Cel12A provoque des changements plastiques (irréversibles) et élastiques (réversibles) de la paroi cellulaire, mais n'accélère pas la relaxation de la paroi face au stress, excepté sur des temps très courts (inférieurs à 200 ms). Au contraire, les  $\alpha$ -expansines accélèrent la relaxation de la paroi face au stress sur des temps longs, mais possèdent des effets négligeables voire nuls sur les caractéristiques plastiques et élastiques de la paroi.

C'est à cause de ces différences que Cel12A n'est pas considérée comme une expansine (Yuan et al., 2001). Effectivement, les expansines induiraient un glissement des polysaccharides, sans modifier de façon majeure la structure de la paroi, mais en éliminant des liaisons non-covalentes (comme des liaisons hydrogènes) entre la cellulose et la matrice de glucanes (Takahashi et al., 2006). A l'inverse, Cel12A hydrolyse à la fois la cellulose et le xyloglucane (Park and Cosgrove, 2012a), ce qui induit un affaiblissement structurel important de la paroi, détecté comme une augmentation de la plasticité et de l'élasticité de la paroi (Yuan et al., 2001).

D'autres protéines, les « yieldines », seraient également impliquées dans l'extension de la paroi induite par pH acide. Elles permettraient exclusivement de diminuer la « tension seuil de rendement », qui participe à la définition du taux d'élongation relative ( $v$ ), selon l'équation de Lockhart (1965) :

$$v = \phi(P - Y)$$

Où  $\phi$  l'extensibilité de la paroi,  $P$  la pression de turgescence, et  $Y$  la tension seuil de rendement. Le mécanisme moléculaire des yieldines n'est pas encore déterminé, mais elles permettraient tout du moins d'ajuster les forces motrices de turgescence. De plus, elles possèderaient une faible homologie avec les expansines (Okamoto-Nakazato et al., 2000).

Enfin, le réseau d'hémicellulose est remodelé grâce aux xyloglucanes endotransglucosylases / hydrolases (XTH). Ces enzymes, codées par une large famille multigénique, sont capables de couper le xyloglucane, et de joindre la nouvelle extrémité réductrice soit à l'extrémité non-réductrice d'une autre molécule de xyloglucane (c'est la transglucosylation), soit à une molécule d'eau (c'est l'hydrolyse). Lorsque les XTH ont été découvertes, l'hypothèse qu'elles soient des agents de relâchement de la paroi a été émise. Certaines publications soutiennent cette hypothèse (Chebli and Geitmann, 2017; Miedes et



al., 2013). L'action xyloglucane endotransglucosylase (XET) des XTH a été localisée au niveau de la zone d'élongation des racines, suggérant un rôle des XTH dans l'élongation des cellules de cette zone (Vissenberg et al., 2003). Par ailleurs, la sur-expression d'XTH d'*A. thaliana* stimulerait la croissance d'hypocotyles étiolés. Ils seraient également plus souples que les hypocotyles sauvages (Miedes et al., 2013). Enfin, une réduction de seulement 14 % du niveau d'expression de *AtXTH18* conduit à une inhibition significative de la croissance des racines d'*A. thaliana*, ce qui signifie qu'elle aurait un rôle important durant la croissance racinaire. Néanmoins, d'autres études témoignent d'une absence de corrélation entre l'activité des XTH et la croissance, suggérant que les XTH seraient des agents de relâchement pariétal indirects ou secondaires, ou que la capacité à moduler la croissance serait spécifique à certaines XTH (Cosgrove, 2016; Miedes et al., 2013).

Un peu à l'écart des enzymes et des protéines non-enzymatiques de relâchement de la paroi, se trouvent les ROS tels que  $\cdot\text{OH}$ , qui permettent la scission des polymères pariétaux, et peuvent donc être impliqués dans le relâchement pariétal (Hocq et al., 2017).

## II.2.2. Rôles des pectines et des enzymes de modification des pectines

Nous avons déjà vu dans la partie I.2.4.e. que les pectines permettaient de structurer la paroi, en espaçant les microfibrilles de cellulose lors de la croissance par la formation d'un gel hydraté, ou en rigidifiant la paroi une fois la croissance terminée. Effectivement, les caractéristiques physico-chimiques des pectines peuvent varier, en fonction du stade de croissance des cellules et des tissus. Les enzymes de remodelage des pectines font donc partie des facteurs de régulation de la croissance. Cette famille comprend notamment les PME, les PAE et les enzymes pectinolytiques comme les PG, qui ont démontré leurs rôles dans la croissance cellulaire.

### II.2.2.a. Contrôle du degré de méthylation et conséquences sur l'élongation

Le remodelage des pectines par les PME est le modèle le plus étudié. Les PME peuvent agir selon deux modes d'actions pour déméthylestérifier les HG : elles peuvent soit agir en bloc, soit de façon aléatoire. Un minimum de 9 résidus d'acides galacturoniques suffit à la formation de liaisons des chaînes d'HG avec le calcium, menant à la rigidification de la paroi. Les HG déméthylés de façon aléatoire deviennent au contraire la cible d'enzymes de dégradation telles que les polygalacturonases et les pectates lyases, résultant en un assouplissement de la paroi (Hocq et al., 2017; Wolf et al., 2009). Ainsi, au niveau des primordia des organes aériens, un assouplissement de la paroi a été observé suite à la déméthylestérification des pectines, menant à la croissance cellulaire et à la formation d'organes (Peaucelle et al., 2011, 2015). De même, la sur-expression de *PME1* a pour conséquence d'inhiber la formation d'organes ou de retarder la croissance d'hypocotyles étiolés, ce qui pourrait être dû à une rigidification de la paroi, suite à l'augmentation du degré de méthylestérification des pectines (Peaucelle et al., 2011; Pelletier et al., 2010). Toujours en accord avec ces résultats, les lignées sur-exprimant de *PME3* présentent des racines plus longues que le sauvage, alors que le mutant *pme3* montre des phénotypes opposés (Hewezi et al., 2008). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation du degré de méthylestérification



des pectines est en corrélation avec une diminution de la croissance, et inversement (Hocq et al., 2017).

Peaucelle et al., (2015) ont également démontré que la croissance anisotropique de cellules d'hypocotyles en élongation est observée après un relâchement des parois longitudinales des cellules, par rapport aux parois transversales. Les auteurs suggèrent que le relâchement sélectif est dû à la déméthylestérification des HG, par des PME, au niveau des parois longitudinales des cellules en élongation. En effet, les cellules à croissance anisotropique présenteraient une localisation asymétrique des épitopes de l'anticorps 2F4, spécifique des structures en boîtes à œufs, et des HG faiblement méthylestérifiés (le 2F4 reconnaît les HG déméthylestérifiés de façon aléatoire si le DM est inférieur à 30 %, ainsi que les HG déméthylestérifiés en blocs si le DM est inférieur à 40 % ; Liners et al., 1989). En revanche, les parois des jeunes cellules symétriques ne seraient pas reconnues par l'anticorps 2F4. Ils ont également prouvé que la déméthylestérification des parois longitudinales intervient avant la réorganisation du réseau de microtubules. Ils concluent donc que la réorganisation des microtubules, et donc de la cellulose, contribue à consolider l'axe de croissance, mais n'est pas strictement requise pour la rupture de la croissance symétrique. Ces résultats mettent en évidence l'importance du remodelage des pectines pour la mise en place de la croissance anisotropique.

En parallèle, plusieurs études ont mis en lien l'activité d'enzymes pectinolytiques avec la croissance cellulaire et le développement. En effet, Stolle-Smits et al., (1999) ont démontré qu'au cours de l'élongation des gousses du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.), le niveau d'HG augmente constamment, et l'activité pectinase est plutôt élevée, ce qui suggère que la dégradation de certaines régions pectiques a lieu en même temps que la synthèse des pectines au cours de la croissance des gousses. De plus, la sur-expression de trois polygalacturonases d'*A. thaliana*, *PGX1-3* (POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION), entraîne l'augmentation de certains organes, tels que les hypocotyles étioles et les rosettes. Par ailleurs, les sur-expresses ne présentent pas de phénotype d'abscission ou de déhiscence prématuré, ce qui suggère que la fonction de cette protéine est de promouvoir l'expansion cellulaire, mais n'influence pas la séparation cellulaire (Rui et al., 2017; Xiao et al., 2014, 2017).

*A contrario*, un faible degré de méthylestérification a également été mis en lien avec une réduction de l'élongation cellulaire et du développement. C'est ce qu'ont montré Derbyshire et al., (2007) en exprimant une PME d'*Aspergillus aculeatus* chez *A. thaliana*. Une diminution du degré de méthylestérification a été observé en corrélation d'une réduction de l'allongement des hypocotyles étioles. De même, l'expression d'une PME d'*Aspergillus niger* chez le tabac (*Nicotiana tabacum* L.) produit des lignées transgéniques avec des entre-noeuds plus courts, des petites feuilles et des plantes naines (Hasunuma et al., 2004). Une explication possible est que la diminution de la croissance soit due à l'augmentation de la rigidité de la paroi, puisqu'une diminution du degré de méthylestérification augmente les chances de liaisons entre les HG et le calcium. Il est donc probable que cela affecte de façon indépendante l'extensibilité de la paroi. Mais il est également concevable que le remodelage des pectines



influence les autres réseaux polysaccharidiques, tels que la cellulose et les hémicelluloses (Derbyshire et al., 2007). Les analyses de Hasunuma et al., (2004) supportent cette hypothèse, puisqu'ils ont observé une diminution de l'expression des gènes codant des endo-1,4- $\beta$ -glucanases, des celluloses synthases, des endo-xyloglucanes transférases et des expansines dans les plantes naines sur-exprimant des gènes codant des PME. Il pourrait également y avoir des phénomènes de compensation entre isoformes au sein des familles de gènes codant des PME et des PME1 (Hocq et al., 2017).

### II.2.2.b. Contrôle du degré d'acétylation et conséquences sur l'élongation

Bien que moins étudiée que la déméthylestérification, l'acétylation des pectines a également prouvé avoir un impact sur la croissance cellulaire. Mais les pectines n'étant pas les seuls polysaccharides acétylés, il est peut-être difficile de déterminer lesquels sont impliqués.

La famille protéique RWA (« reduced wall acetylation » pour « acétylation réduite des parois ») est impliquée dans l'acétylation de la paroi cellulaire chez *A. thaliana*. Les triples et quadruples mutants *rwa* présentent jusqu'à 63 % de diminution du degré d'acétylation de la paroi, ainsi que de sévères phénotypes de croissance (Manabe et al., 2013).

De plus, PAE8 et PAE9 présentent une activité pectine acétylase, et semblent avoir comme substrat préférentiel *in planta* le RG-I, bien qu'on ne puisse pas exclure la possibilité qu'elles agissent sur d'autres polymères pariétaux. Les inflorescences de *pae8* et du double mutant *pae8/pae9* arborent une taille réduite par rapport au sauvage, et des quantités substantielles d'acétate sont accumulées dans les parois. Ces observations suggèrent que l'acétylation des pectines joue un rôle important dans le développement des tissus, même si les pectines y sont peu abondantes. En effet, les inflorescences possèdent peu de pectines en comparaison aux feuilles. En revanche, les gènes de biosynthèse des pectines seraient hautement exprimés au niveau du système vasculaire (de Souza et al., 2014).

Enfin, la sur-expression d'un gène codant une PAE de peuplier spécifique des pectines chez le tabac induit des perturbations de différents processus de développement de la plante. Il est observé dans ces plantes une déacétylation des pectines, à l'origine de changements de conformation et/ou de structure des polysaccharides pariétaux. Ces modifications provoquent l'altération de l'élongation cellulaire des styles et des filets des étamines, de la germination des grains de pollen et de la croissance des tubes polliniques, engendrant ainsi une stérilité mâle (Gou et al., 2012).

Ensemble, ces résultats révèlent l'importance de la chimie des pectines (degré de méthylation et d'acétylation) pour le développement et la croissance de la plante (Chebli and Geitmann, 2017).





### II.2.2.c. Contribution spécifique du RG-II durant l'élongation

La déficience en bore a permis de mettre en évidence l'importance des liaisons du RG-II au bore pour le développement des plantes, la croissance, le fonctionnement des méristèmes et des organes reproductifs (Caffall and Mohnen, 2009; O'Neill et al., 2004).

En revanche, il n'y a pas d'évidences observées entre l'élongation cellulaire et le RG-I. Il semblerait davantage que le RG-I et ses chaînes latérales soient requises pour l'adhésion cellulaire et le fonctionnement des stomates, plutôt que dans l'élongation (Caffall and Mohnen, 2009).

### II.3. Mécanismes qui interviennent après l'élongation cellulaire

Une fois l'élongation cellulaire terminée, les cellules matures perdent leur habilité à s'allonger, généralement de manière irréversible. Elles gagnent également en rigidité (Zhao et al., 2008). De plus, l'absence d'activité expansine dans les régions qui ne sont pas en croissance d'hypocotyles de concombre (*Cucumis sativus*) a été rapportée, et l'extension de la paroi peut être restaurée par l'addition d'expansines exogènes (McQueen-Mason et al., 1992). Cependant dans les racines de maïs (*Zea mays*), les parois des cellules matures adjacentes aux zones d'élongation ne sont pas capables de s'allonger en dépit de quantités d'expansines extractibles plus importantes par rapport aux zones d'élongation. Il a donc été proposé que des modifications de la paroi, comme des liaisons entre les polymères pariétaux, sont une cause majeure de l'absence de réponse aux expansines dans les zones matures non-expansives (Cosgrove, 1997; Zhao et al., 2008).

Zhao et al., (2008) ont donc cherché à identifier les modifications qui ont lieu dans les parois des cellules ayant terminé leur expansion, causant une absence de réaction aux expansines. Ils ont pour cela examiné les agents capables de restaurer l'extension de la paroi par des expansines exogènes, sur des régions d'hypocotyles de concombre (*Cucumis sativus*) qui ne sont pas en élongation, et qui ont subi un traitement thermique pour inactiver les expansines endogènes. Il en résulte que l'application de PG et de PL (pectate lyase) d'*Aspergillus* sur la partie basale des hypocotyles, où les pectines sont peu méthylestérifiées, restaure l'extension de la paroi par des expansines. L'application de PNL (pectine lyase) restaure également l'extension, mais après application sur la partie apicale des hypocotyles, là où les pectines sont davantage méthylestérifiées. De même, un prétraitement avec un chélateur de calcium restaure tout autant l'extension de la paroi, par élimination du calcium des structures en boîtes à œufs. En revanche, les endoglucanases, xylanases et protéases ne sont pas capables de restaurer l'extension des parois matures. Le réseau pectique, en particulier les liaisons au calcium, serait donc un facteur primaire déterminant l'absence de réponse de la paroi aux expansines dans les cellules matures (Zhao et al., 2008).

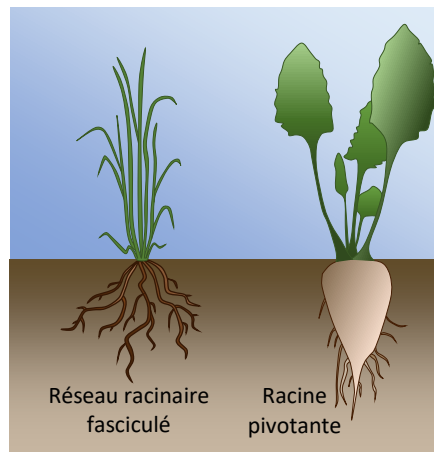
De plus, l'augmentation de la rigidité de la paroi ainsi que la diminution de l'expansion pariétale ont été observés en corrélation avec une diminution de degré de méthylestérification des HG, permettant l'augmentation du nombre de complexation des HG



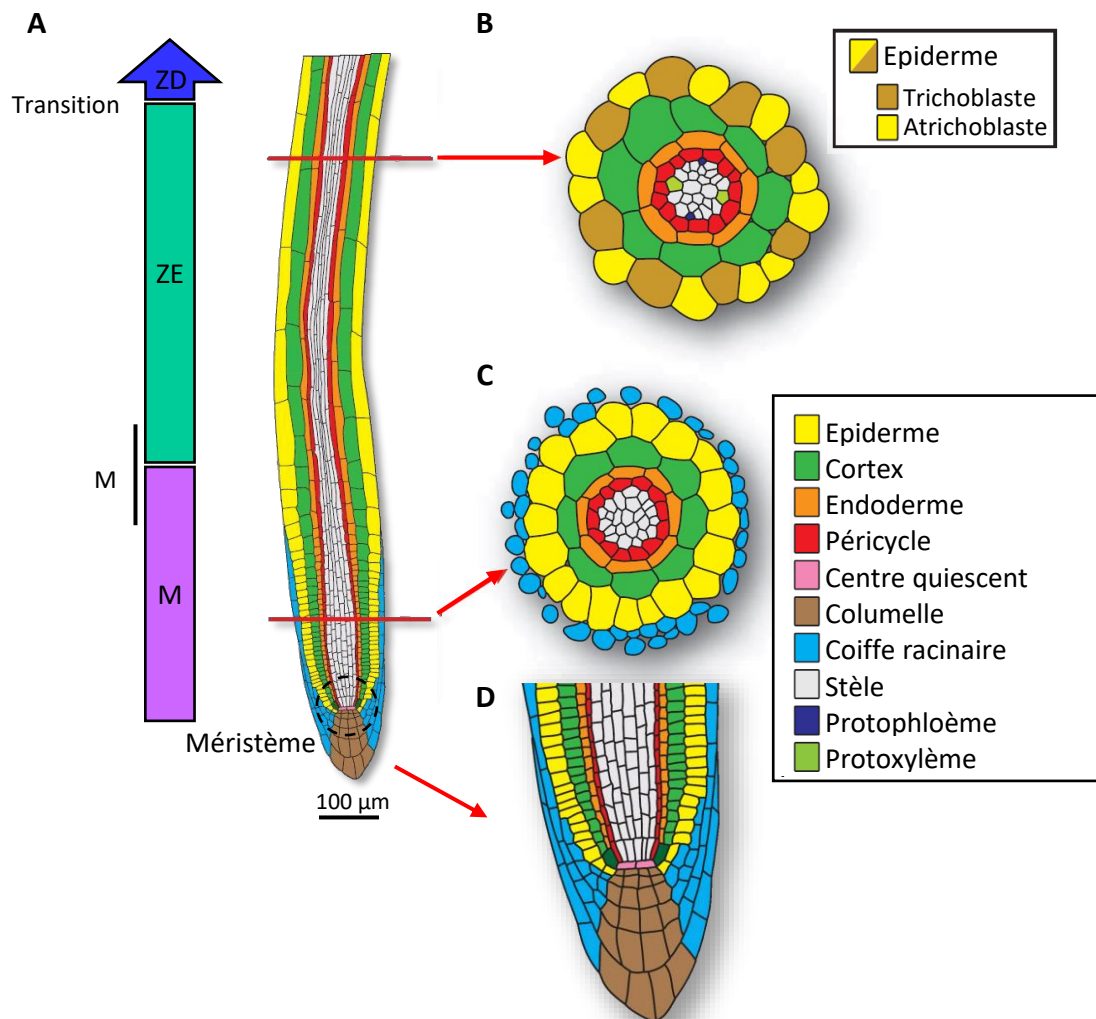
au calcium, et de la diminution en chaînes latérales d'arabinanes et de galactanes du RG-I. (Stolle-Smits et al., 1999).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ezaki et al., (2005), qui ont travaillé sur un modèle *in vitro* : des cylindres creux d'hypocotyles de soja (*Glycine max*) provenant de régions en élongation d'hypocotyles, infiltrés par du glycérol. Monté sur un extensiomètre et plongé dans un tampon, ce système permet de mesurer le taux d'extension des cylindres, après incubation avec différents réactifs ajoutés au tampon. Ils ont ainsi montré que l'addition d'un chélateur de calcium engendrait une extension de la paroi. Cet effet est réversible par l'ajout de calcium exogène.

On peut en conclure que les HG, par leur capacité à se lier au calcium, entraînent la rigidité de la paroi et la stabilisation des composants de la paroi après l'élongation cellulaire (Caffall and Mohnen, 2009).



**Figure 20 : Différenciation entre le réseau racinaire fasciculé et le système racinaire pivotant.** D'après <https://www.britannica.com/science/fibrous-root-system>.



**Figure 19 : Organisation tissulaire d'un apex racinaire d'*A. thaliana*.** A) Vue globale de l'axe proximal-distal d'un apex racinaire. MA : méristème apical ; MB : méristème basal ; ZE : zone d'élongation ; ZD : zone de différenciation. B) Coupe transversale de la zone d'élongation. C) coupe transversale de la zone méristématique. D) Agrandissement du méristème. D'après Overvoorde et al. (2010), et Somssich et al. (2016).

## Chapitre III. Les racines

### III.1. Fonction et structure du système racinaire

Les racines permettent de fixer les plantes vasculaires au sol, d'absorber l'eau et les minéraux, et dans beaucoup de cas, d'emmagasiner des glucides. Hormis les adaptations des racines au cours de l'évolution, qui ont permis l'apparition de racines de stockage comme la betterave, ou des racines aériennes de maintien comme les racines échasses du hala (*Pandanus tectorius*), il existe deux types de systèmes racinaires : les racines pivotantes et les systèmes racinaires fasciculés (Reece et al., 2011b).

La plupart des Eudicotylédones et des Gymnospermes possèdent une racine pivotante, qui se développe à partir d'une racine embryonnaire. Sur celle-ci apparaissent ensuite des racines latérales, ou racines fasciculées. Ce type de système racinaire pénètre profondément dans le sol, et peut ainsi atteindre des eaux souterraines éloignées de la surface ([figure 19](#) ; Reece et al., 2011b).

La plupart des monocotylédones ne possèdent pas de racines pivotantes, mais plusieurs racines qui se développent à partir de la tige. Ce sont donc des racines adventives, puisque ce terme désigne tout organe qui se forme à un endroit inhabituel, comme des racines qui se développent sur des tiges ou des feuilles. Chaque racine adventive forme des racines latérales, permettant la formation d'un réseau racinaire fasciculé, composé de fines racines qui se répandent sous la surface du sol. Ce système racinaire est donc adapté aux chutes de pluie légères qui n'imbibent que la surface du sol, et permet de prévenir l'érosion, en maintenant la couche superficielle du sol ([figure 19](#) ; Reece et al., 2011b).

### III.2. Structure d'une racine primaire d'*A. thaliana*

L'étude du système racinaire est rendue difficile par l'inaccessibilité des racines, ce qui demande donc l'utilisation de mesures invasives. Par ailleurs, le système racinaire de nombreuses espèces de plante est très complexe, ce qui rend la caractérisation de mécanismes développementaux difficile à réaliser. L'étude du développement racinaire est en revanche hautement avancé chez la plante modèle *A. thaliana*, qui possède des racines avec une organisation cellulaire très simple et qui est facilement étudiable *in vitro* (Petricka et al., 2012).

La racine est caractérisée par trois zones, à la fois distinctes et chevauchantes : une zone méristématique, une zone d'élongation, et une zone de différenciation ([figure 20 A](#)). La zone méristématique est située à 250  $\mu\text{m}$  de la pointe racinaire. Cette zone est caractérisée par de petites cellules isodiamétriques, recouvertes par la coiffe racinaire (Dolan et al., 1993). En s'éloignant de la pointe racinaire, on trouve ensuite la zone d'élongation caractérisée par l'augmentation progressive de la taille des cellules selon leur axe longitudinal. La transition entre la zone méristématique et la zone d'élongation est marquée par le début de l'élongation des cellules épidermiques (Overvoorde et al., 2010). Ce processus d'allongement cellulaire, également appelé auxèse, est le premier indicateur de l'initiation du processus de



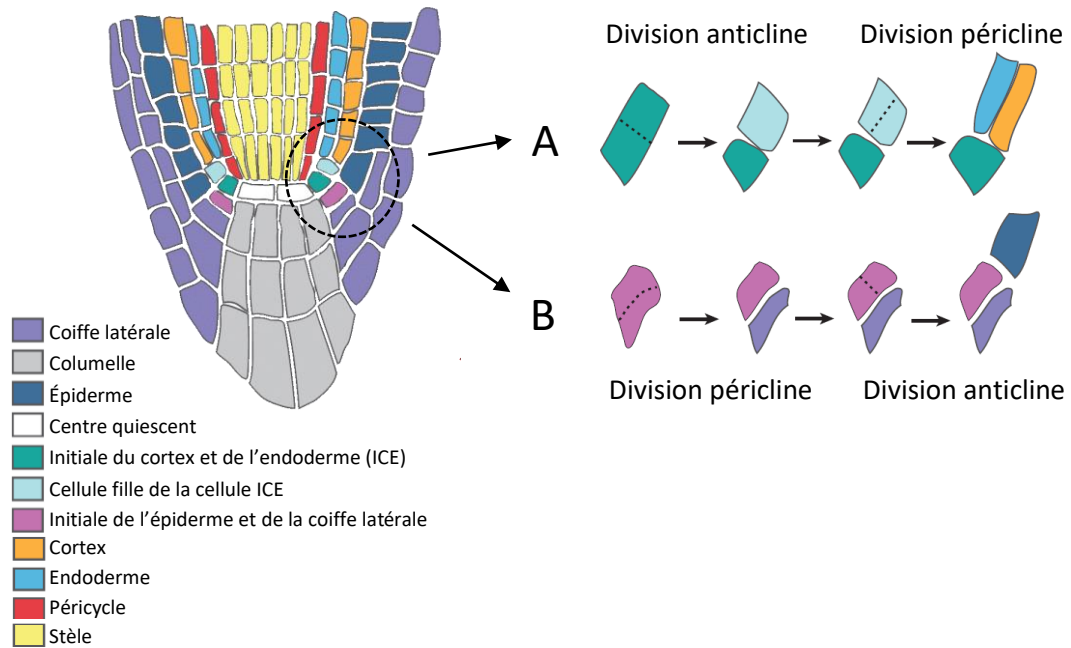
différenciation des cellules issues de la zone méristématique. Enfin on trouve ensuite, toujours selon l'axe longitudinal, la zone de différenciation, dans laquelle les cellules allongées se différencient totalement pour former les différents tissus primaires caractéristiques de la racine. La zone de transition entre la zone d'élongation et la zone de différenciation est également caractérisée par le gonflement de certaines cellules épidermiques, qui deviendront ensuite des poils absorbants (Dolan et al., 1993). Ces poils permettent l'absorption de l'eau et des minéraux, en augmentant considérablement la surface d'absorption racinaire (Reece et al., 2011b). La zone méristématique, ainsi que la zone d'élongation proximale, sont protégées par la columelle et la coiffe racinaire latérale, situées à la pointe racinaire. Toutes deux forment une structure cellulaire protectrice qui se détache continuellement de la pointe racinaire. La columelle a également pour fonction la perception de la gravité grâce à la présence de cellules spécialisées appelées statocytes, qui distinguent la gravité grâce à la présence d'amyloplastés spécialisés appelés statolithes (Petricka et al., 2012).

Selon une coupe transversale, les tissus racinaires sont organisés en cylindres concentriques, comprenant de l'extérieur vers l'intérieur l'épiderme (ou rhizoderme), le cortex, l'endoderme, le péricycle et la stèle ([figure 20 B et C](#)). Les sections racinaires longitudinales médianes présentent des lignes de cellules qui ont pour origine des cellules du méristème, appelées cellules initiales ou cellules souches ([figure 20 A](#)). A la pointe racinaire, la columelle et la coiffe latérale sont également produites par l'activité de cellules initiales. Ensemble, les initiales de chacun de ces tissus entourent un groupe de quatre à sept cellules mitotiquement moins actives qui constituent le centre quiescent ([figure 20 D](#) ; Nawy, 2005; Overvoorde et al., 2010).

Les sections transversales des racines primaires révèlent que l'organisation et le nombre de cellules est remarquablement constant d'une racine à une autre ([figure 20 B et C](#)). Au niveau de la zone d'élongation, la stèle, qui compose de cylindre central, possède deux éléments de protoxylème, et deux éléments de protophloème, à 90° les uns des autres ([figure 20 B](#)). La stèle est recouverte par une couche de cellules du péricycle, elle-même recouverte d'une couche de 8 cellules correspondant à l'endoderme. Le cortex, composé d'une couche cellulaire qui entoure l'endoderme, est également composé de 8 cellules. L'épiderme compte deux types de cellules, dont l'identité dépend de leur position relative par rapport aux jonctions entre les cellules du cortex. Les cellules épidermiques situées au niveau des parois anticlinales des cellules corticales adjacentes se différencieront en cellules productrices de poils absorbants. Ces cellules sont appelées trichoblastes ([figure 20 B](#)). Les cellules épidermiques adjacentes à seulement une cellule corticale ne produisent généralement pas de poils absorbants, et sont nommées atrichoblastes (Dolan et al., 1993).

### III.3. La croissance racinaire

La croissance de la racine est due à deux phénomènes : la division cellulaire au niveau de la zone méristématique, puis à l'allongement des nouvelles cellules.



**Figure 21 : Formation du cortex, de l'endoderme, de l'épiderme et, de la coiffe latérale par division anticline puis péricline. A)** L'endoderme et le cortex sont issue de la même cellule initiale (ICE). Celle-ci subit une première division, perpendiculaire aux parois les plus allongées de la cellule. Puis la cellule fille de la cellule ICE subit une division péricline, parallèle aux parois les plus allongées de la cellule. Les cellules filles formeront respectivement l'endoderme et le cortex. **B)** La cellule initiale de l'épiderme et de la coiffe latérale se divise dans un premier temps de façon péricline, pour produire deux cellules filles. L'une des cellules filles formera la coiffe latérale, alors que la deuxième subit une division anticline afin de produire l'épiderme. D'après Petricka et al. (2012).



### III.3.1. Division cellulaire au niveau du méristème racinaire

On distingue le méristème apical racinaire (RAM : « root apical meristem ») qui comporte la zone de division active, et le méristème basal où les divisions cellulaires ralentissent et où la croissance cellulaire débute. Le RAM contient un ensemble de cellules souches qui entourent le centre quiescent. Ensemble, ils forment la niche de cellules souches (Petricka et al., 2012).

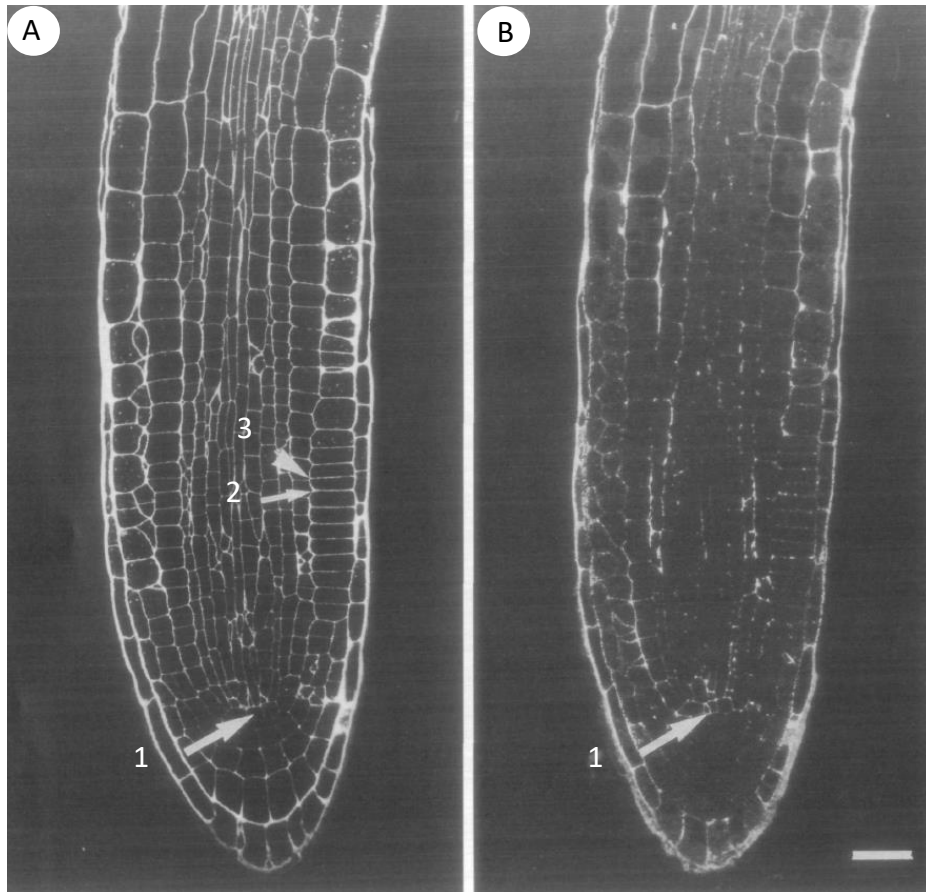
Les cellules initiales au-dessus du centre quiescent donnent naissance aux tissus vasculaires et au péricycle. L'endoderme et le cortex proviennent d'une même cellule initiale, qui subit dans un premier temps une division anticlinale puis péricleinale (**figure 21 A**). De façon similaire, la coiffe latérale et l'épiderme sont issus de la même cellule initiale, qui se divise dans un premier temps de façon péricleinale pour former la coiffe latérale, puis de façon anticlinale pour former l'épiderme (**figure 21 B**). Les cellules souches en dessous du centre quiescent permettent de former la columelle (Petricka et al., 2012).

En ce qui concerne les cellules initiales de la stèle, du péricycle et de la columelle, elles se divisent asymétriquement pour produire deux cellules : une cellule initiale régénérée et une cellule fille qui subit par la suite d'autres divisions. Ces cellules seront petit à petit déplacées jusqu'à la zone d'élongation puis dans la zone de différenciation. Le maintien des cellules initiales assure la création continue de nouvelles cellules et permet la croissance indéterminée des racines. Les cellules filles forment des files cellulaires qui s'étendent le long de l'axe longitudinal, et forment des couches distinctes de tissus (Overvoorde et al., 2010; Petricka et al., 2012; Santuari et al., 2016).

### III.3.2. Élongation cellulaire dans la zone d'élongation

Une fois que les cellules ont quitté la zone méristématique, les cellules entrent en expansion, en absence de division. L'orientation de la croissance détermine la forme de la cellule et de l'organe. C'est donc un élément central dans le développement et la fonction des racines (Dolan and Davies, 2004).

Dans la zone d'élongation des racines d'*A. thaliana*, l'expansion cellulaire est restreinte aux faces longitudinales des cellules, selon un axe directionnel unique. La croissance des cellules est donc anisotrope, d'où le terme d'élongation. Occasionnellement, en réponse à des stimuli environnementaux (gravité, lumière, présence d'eau, stimuli tactiles, ou stress abiotiques) ou encore suite à des traitements exogènes qui régulent la croissance, la symétrie de l'élongation est rompue au profit d'une élongation asymétrique, afin de permettre un changement de direction de la croissance racinaire. Par exemple, c'est ce qui se produit en réponse à la gravité. La position perpendiculaire de la racine par rapport à l'axe gravitationnel initial va résulter en une modification de la sédimentation des statolithes présents dans certaines cellules de la columelle. Ce phénomène, au travers d'une voie dépendante de l'auxine, va induire une élongation plus importante des cellules de la partie supérieure de la racine comparativement à la partie inférieure, entraînant ainsi une réorientation de la pointe



**Figure 22 : Différences d'épitopes (pectines hautement ou faiblement méthylestérifiées) à l'apex racinaire.** Immunomarcage de coupes longitudinales d'apex racinaires avec les anticorps JIM7 (A) et JIM5 (B), qui reconnaissent respectivement les HG méthylestérifiés et les HG faiblement méthylestérifiés. **1)** Cellules du centre quiescent. **2)** Paroi transversale formant une jonction en Y avec les parois des cellules adjacentes (ancienne séparation cellulaire). **3)** Paroi transversale formant une jonction en T avec la paroi longitudinale adjacente (nouvelle séparation cellulaire). Echelle : 10  $\mu$ m (Dolan et al., 1997).

racinaire vers le bas, parallèlement à l'axe de la force de gravité (Dolan and Davies, 2004; Petricka et al., 2012).

Il existe donc deux régions distinctes de croissance à l'apex racinaire : au niveau du méristème, où l'élongation est faible mais uniforme, et au niveau de la zone d'élongation, où l'élongation est plus importante. À la fin de la zone d'élongation, le taux d'élongation décroît jusqu'à zéro. Ce profil de croissance serait commun entre les racines de toutes les plantes à fleurs (Dolan and Davies, 2004).

### III.3.3. Modifications des pectines à l'apex racinaire

Au niveau de l'apex racinaire, plusieurs paramètres sont modifiés au niveau de la paroi des cellules en élongation, dont l'orientation des microfibrilles de cellulose, grâce aux expansines, aux yieldines et aux XET (Cosgrove, 2000; Palin and Geitmann, 2012). Les pectines jouent également un rôle important dans la croissance cellulaire.

Les cellules de la zone méristématique et celles de la zone d'élongation possèdent différents degrés de méthylestérification des pectines. En effet, Dolan et al., (1997) ont montré par immunomarquage que les épitopes reconnus par JIM5 (HG déméthylestérifiés) sont présents au niveau du centre quiescent, et sont moins présents au niveau des parois des autres cellules en division de la zone méristématique (**figure 22 B**). Le motif d'hybridation de JIM5 devient plus uniforme une fois que les divisions cellulaires cessent, au niveau de la zone d'élongation et de différenciation. De plus, le marquage de JIM5 apparaît avec un retard au niveau des plaques cellulaires des cellules en division. En revanche, les épitopes reconnus par JIM7 (qui reconnaît des DM de 15 à 81 %, sans différence significative, d'après Willats et al. [2000]) sont plutôt répartis de manière uniforme, sans différence de marquage entre les cellules nouvellement formées et les cellules plus anciennes (**figure 22 A**). Il est en effet possible de différencier les « nouvelles » et les « anciennes » parois transversales, car les nouvelles forment des jonctions en T (**figure 22 A-3**), alors que les anciennes parois longitudinales forment des jonctions en Y (**figure 22 A-2**).

Ces immunomarquages indiquent que les parois des cellules du centre quiescent, qui ne sont pas en division, contiennent des quantités plus importantes de pectines peu méthylestérifiées. *A contrario*, les cellules en division possèdent des parois avec un DM important. Ces résultats sont en accord avec le fait que les HG faiblement méthylestérifiés favorisent la formation de structures en boîte à œuf ce qui rigidifie la paroi, alors que les HG avec un DM important ne peuvent pas le faire, permettant l'élongation cellulaire (Dolan et al., 1997).

Les pectines présentes au niveau de la paroi semblent impliquées dans la régulation de l'extension pariétale des cellules racinaires, mais il n'est pas clairement établi si les pectines de la lamelle moyenne influencent l'extension cellulaire. Il a cependant été observé chez des mutants *qua2-1*, déficient pour une méthyltransférase putative (Bouton, 2002; Mouille et al., 2007), un défaut d'adhésion cellulaire ainsi qu'une diminution significative de la longueur des racines, des tiges et des hypocotyles étiolés, par rapport au sauvage. En revanche, les



propriétés mécaniques des parois ne semblent pas altérées (Bouton, 2002; Palin, 2011). Ces résultats suggèrent qu'une réduction de l'adhésion cellulaire, résultant d'une altération du dépôt de pectines dans la lamelle moyenne, a un impact sur la croissance tissulaire. Ceci est probablement dû à une altération des forces exercées entre les cellules en croissance (Palin, 2011; Palin and Geitmann, 2012).

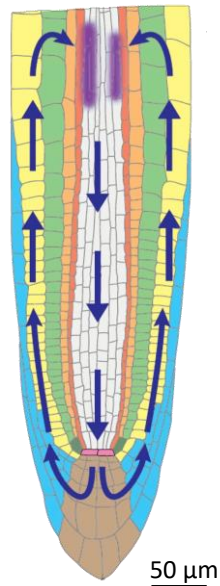
### III.3.4. Régulation des zones méristématique et d'élongation

Les cellules souches sont à l'équilibre entre la division et la différenciation, pour pouvoir produire continuellement des files de cellules, et donc permettre la croissance indéfinie de la racine. Le centre quiescent, situé au cœur des cellules souches, est essentiel pour le maintien de leur formation. En cas d'ablation du méristème, le centre quiescent est régénéré et est suffisant pour « ré-initialiser » chaque file cellulaire, et ainsi redéfinir le RAM (Bennett and Scheres, 2010). Le devenir des cellules du méristème est ainsi hautement contrôlé par des facteurs de transcription, eux-mêmes régulés par des hormones, de petits peptides de signalisation et leurs récepteurs, et enfin des micro-ARN (Drisch and Stahl, 2015).

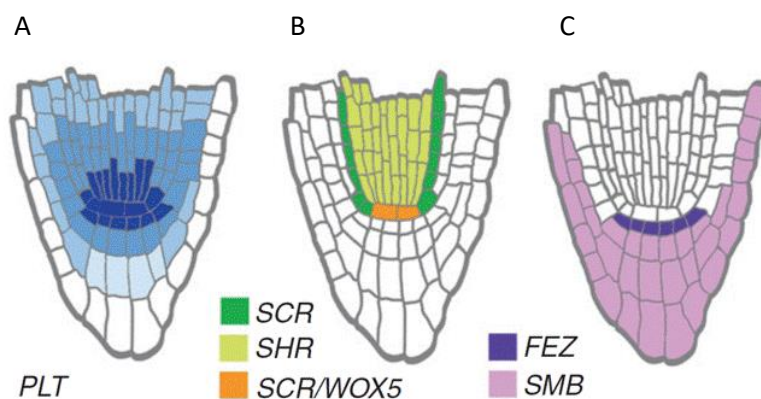
#### III.3.4.a. Contrôle hormonal

Les phytohormones sont des régulateurs clefs de la division et de l'élongation cellulaire, en agissant comme des signaux à longues portées. Elles permettent la régulation de facteurs de transcription, ou engendrent la dégradation de répresseurs (Drisch and Stahl, 2015; Petricka et al., 2012; Ruzicka et al., 2007). Ces phytohormones sont l'auxine, les cytokinines, les brassinostéroïdes, l'éthylène, le jasmonate, l'acide abscissique et les gibbérellines (Dolan et al., 1997; Drisch and Stahl, 2015; Petricka et al., 2012). Les hormones régulent la division et l'élongation cellulaire soit de manière positive, soit de manière négative, et les effets induits par les hormones peuvent être dépendants de la concentration de celles-ci. Par exemple, l'auxine, l'acide abscissique et les brassinostéroïdes stimulent ou inhibent la croissance racinaire, en fonction de la concentration appliquée sur les racines d'*A. thaliana*. Les hormones peuvent aussi avoir des effets antagonistes, comme dans le cas de l'auxine et des cytokinines. L'auxine induirait, par le biais de l'activation de facteurs de transcription, la prolifération cellulaire au niveau du méristème, l'élongation et la différenciation cellulaire, en fonction de sa localisation et de sa concentration. A l'inverse, les cytokinines inhibent la division cellulaire et la croissance racinaire, en favorisant la différenciation cellulaire (Petricka et al., 2012). Enfin, les hormones peuvent également se réguler entre elles de manière indirecte (Drisch and Stahl, 2015; Fu and Harberd, 2003; Petricka et al., 2012; Ruzicka et al., 2007). Par exemple, l'éthylène et l'auxine possèdent des effets synergiques sur la croissance, puisque l'éthylène régule la synthèse d'auxine, ainsi que sa distribution polarisée à travers la zone d'élongation de la racine, en modulant la transcription de protéines membranaires de transport de l'auxine. En parallèle, l'auxine induit la biosynthèse de l'éthylène en activant l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, nécessaire à la production de l'éthylène (Ruzicka et al., 2007).

L'auxine joue un rôle dominant dans l'initiation de racines latérales, leur émergence et leur développement, ainsi que dans le développement racinaire en général. Elle est



**Figure 24 : Transport de l'auxine à la pointe racinaire à la façon d'une fontaine inversée.** L'auxine est produite au niveau des parties aériennes de la plante puis se dirige vers les pointes racinaires à travers les tissus vasculaires. Elle diffuse de la coiffe latérale vers l'épiderme jusqu'au méristème basal, à la transition entre la zone méristématique et la zone d'élongation, puis se redirige vers la pointe racinaire via les tissus vasculaires (Dolan et al., 1993; Grieneisen et al., 2007; Overvoorde et al., 2010). Schéma d'après Overvoorde et al. (2010).



**Figure 23 : Maintien du méristème apical racinaire par différents facteurs de transcription.**  
**A)** Gradient de l'expression des gènes PLT, avec un niveau maximum au niveau de la niche cellulaire, où les protéines participent au maintien de son identité. Les PLT permettent à la fois de promouvoir les divisions cellulaires, et de réprimer leur différenciation. **B)** Domaines d'expression des gènes SHR, SCR et WOX5. Le gène SHR est exprimé au niveau de la stèle, et se déplace vers le centre quiescent et les cellules initiales du cortex et de l'endoderme, pour activer la transcription de SCR. Ensemble, ils permettent de maintenir l'identité de ces cellules (Bennett and Scheres, 2010). WOX5 est exprimé dans le centre quiescent, et se déplace dans les cellules initiales environnantes pour maintenir également leur identité. L'expression de WOX5 est réprimée dans les cellules environnantes au centre quiescent. **C)** Domaines d'expression de FEZ et de SMB. FEZ permet de former la columelle et la coiffe latérale, et permet l'expression du gène SMB. SMB réprime FEZ dans les cellules filles de la columelle et de la coiffe latérale. D'après Bennett and Scheres (2010).

majoritairement produite par les parties aériennes et diffuse vers les racines à travers les tissus vasculaires du phloème jusqu'aux pointes racinaires (**figure 23**). Ce transport de l'auxine *via* le phloème est très rapide (7 cm/h chez *Populus tremula* et *Vicia faba* ; Overvoorde et al., 2010). Au niveau des pointes racinaires, le mouvement de l'auxine requiert des protéines de transport membranaires pour contrôler le mouvement directionnel de l'auxine. Ces protéines de transport de l'auxine permettent une diffusion lente de l'auxine (10 mm/h chez différentes espèces dont *A. thaliana* ; Overvoorde et al., 2010). Les protéines permettant l'influx d'auxine sont les protéines AUXIN RESISTANT1, et celles permettant l'efflux d'auxine sont les protéines de la famille des transporteurs P-GLYCOPROTEIN ABC, ainsi que les protéines PINFORMED (PIN). Le contrôle local du niveau d'auxine génère dans la pointe racinaire un gradient de concentration, dont le niveau maximum est situé au niveau du centre quiescent. Le gradient d'auxine est nécessaire au maintien du primordium racinaire, car les niveaux variables d'auxine permettent d'activer l'expression de différents gènes, responsables du destin des cellules (Overvoorde et al., 2010). L'activation de ces gènes permet ensuite de réguler le transport et la biosynthèse de l'auxine, par rétro-contrôle (Santuari et al., 2016). L'auxine est également synthétisée localement, au niveau de la niche de cellules souches (Overvoorde et al., 2010; Petricka et al., 2012). Cette auxine racinaire contribue au maintien du gradient d'auxine, ainsi que de son niveau maximal au centre quiescent, qui sont requis pour un développement normal des racines. La concentration d'auxine n'est pas le seul facteur engendrant une réponse à l'auxine. En effet, une même concentration d'auxine peut induire une expansion cellulaire au niveau des hypocotyles, ou inhiber l'élongation cellulaire en faveur de la division cellulaire au niveau du méristème racinaire. La différence de réponse pour une concentration d'auxine donnée est due à la concentration ainsi qu'aux caractéristiques de composants de signalisation présents dans un ensemble de cellules. Certains d'entre eux ont été identifiés, comme la protéine TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) qui fait partie du complexe E3 ubiquitine Ligase SCF-TIR1 impliqué dans la voie de transduction de l'auxine (Overvoorde et al., 2010).

#### III.3.4.b. Rôle des principaux facteurs de transcription

Le maintien des divisions cellulaires et de l'élongation est non seulement dû à la régulation hormonale, mais également à une multitude de facteurs de transcription. Ces voies de régulation sont liées, puisque les facteurs de transcription sont en partie régulés par des hormones (Drisch and Stahl, 2015; Petricka et al., 2012). Les principaux facteurs de transcription intervenant sont PLETHORA (PLT), SHORT ROOT (SHR) et SCARECROW (SCR), WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5), FEZ et SOMBRERO (SMB) (**figure 24** ; Bennett and Scheres, 2010; Drisch and Stahl, 2015; Petricka et al., 2012).

Les facteurs de transcription SHR/SCR, WOX5, ainsi que FEZ et SBM interviennent dans le maintien du centre quiescent et des cellules initiales. *SHR* est exprimé au niveau des tissus de la stèle, puis la protéine SHR se déplace jusqu'au centre quiescent et au niveau des cellules d'initiation du cortex et de l'endoderme, afin d'activer la transcription de *SCR*. Puis la protéine SCR empêche de nouveaux déplacements de SHR en le confinant dans les noyaux des cellules, ce qui permet aux deux protéines de contrôler la spécification du centre quiescent, et les





divisions asymétriques de l'initiale commune à l'endoderme et au cortex (Bennett and Scheres, 2010; Heidstra, 2004; Petricka et al., 2012).

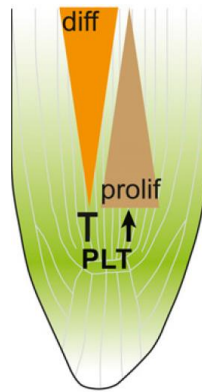
WOX5 est également impliqué dans le maintien de l'identité des cellules souches, en les empêchant de se différencier, et en régulant leurs tailles. WOX5 est exprimé uniquement dans le centre quiescent, car son expression est réprimée dans les cellules adjacentes par SCR, le peptide CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION 40 (CLE40) et le récepteur kinase ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4). La protéine diffuse donc du centre quiescent vers les cellules initiales qui l'entourent afin de jouer son rôle. Au niveau du centre quiescent, WOX5 empêche la division cellulaire (Bennett and Scheres, 2010; Drisch and Stahl, 2015; Petricka et al., 2012).

Enfin, le facteur de transcription FEZ est requis pour les divisions périclinales des cellules souches de la columelle et de la coiffe racinaire latérale, et permet l'expression de SBM dans les cellules filles. *A contrario*, la protéine SBM est nécessaire pour réprimer FEZ au niveau des cellules filles de la coiffe racinaire. FEZ et SBM agissent donc en boucle de rétro-action (Bennett and Scheres, 2010).

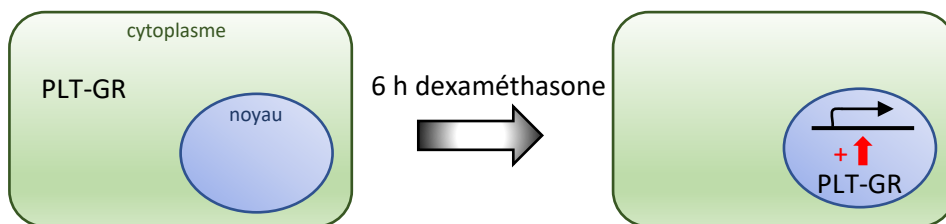
Les facteurs de transcription PLT interviennent quant à eux dans le maintien des divisions du RAM, préviennent la différenciation cellulaire de ces mêmes cellules (Galinha et al., 2007; Santuari et al., 2016), participent au positionnement du centre quiescent cellulaire au niveau de la niche cellulaire *via* l'expression de marqueurs spécifiques (Aida et al., 2004), et contrôlent la croissance et la forme des primordia (Santuari et al., 2016). Au cours de ce projet, la régulation de l'expression des gènes *PG* candidats par les facteurs de transcription PLT a été étudiée, c'est pourquoi ceux-ci sont présentés plus en détails ci-après, par rapport aux autres facteurs de transcription.

L'expression des gènes *PLT*, également appelés *AINTEGUMENTA-LIKE (AIL)*, est restreinte aux tissus en développement des racines et des parties aériennes, où ils contrôlent la croissance et la forme des primordia (Santuari et al., 2016). Les facteurs de transcription PLT possèdent des cibles communes avec SHR/SCR. Cependant, la transcription de l'un des gènes n'est pas nécessaire à l'expression des autres, et les facteurs PLT sont toujours fonctionnels chez les mutants *shr* et *scr*, et inversement. Ces résultats indiquent que les voies d'action de PLT et SHR/SCR sont parallèles mais distincts (Aida et al., 2004).

La famille PLT comprend une sous-famille de six facteurs de transcription, membres de la double famille APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR. Au niveau du RAM, quatre *PLT* sont exprimés : *PLT1/AIL3*, *PLT2/AIL4*, *PLT3/AIL6*, et *BBM/PLT4/AIL2* (*BBM* pour *BABY BOOM*). Leurs motifs d'expressions sont en partie chevauchants et redondants. Ils permettent notamment de maintenir la division et de prévenir la différenciation cellulaire de l'ensemble du RAM. En parallèle, les gènes *PLT3/AIL6*, *PLT5/AIL5* et *PLT7/AIL7* sont exprimés dans les cellules initiales des racines latérales et dans le méristème apical caulinaire, où ils possèdent des fonctions de positionnement et de croissance des organes latéraux. Par ailleurs, *PLT2*, *PLT4* et *PLT5* possèdent la capacité remarquable d'initier la formation d'organes spécifique



**Figure 25 : Gradient du facteur de transcription PLETHORA (PLT) permettant de contrôler l'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire.** En vert est représenté le gradient du niveau d'expression des gènes PLT ainsi que la quantité des protéines correspondante. Les gènes PLT sont majoritairement exprimés au niveau de la niche de cellule souche, où ils permettent la division cellulaire et inhibent la différenciation. En s'éloignant de la zone de division, les gènes PLT sont de moins en moins exprimés, permettant la transition entre la division et la différenciation cellulaire (Santuari et al., 2016).



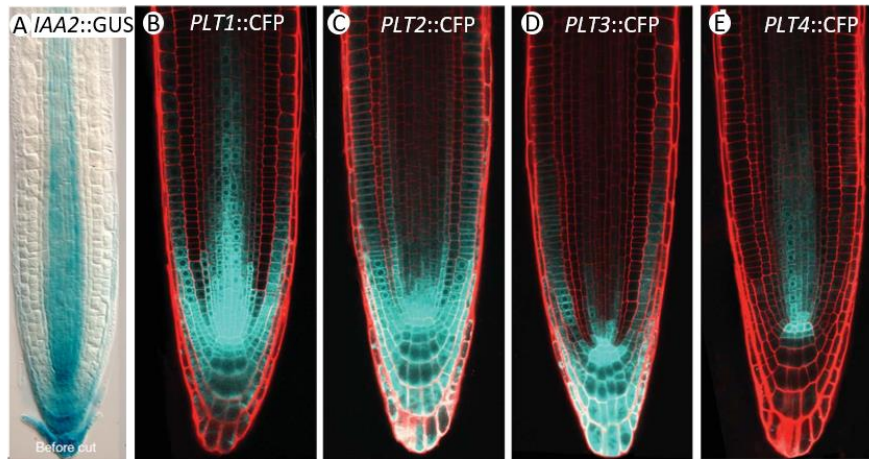
**Figure 26 : Induction de la transcription des cibles de PLETHORA (PLT).** La construction PLT- GR (récepteur aux glucocorticoïdes) exprimée chez *A. thaliana* est confinée dans le cytoplasme. Après 6h d'induction par la dexaméthasone, la protéine de fusion PLT-GR est relocalisée dans le noyau. La transcription des gènes cibles de PLT est alors initiée. D'après Santuari et al. (2016).

(racines et hypocotyles) et d'embryons somatiques de manière ectopique (Aida et al., 2004; Santuari et al., 2016).

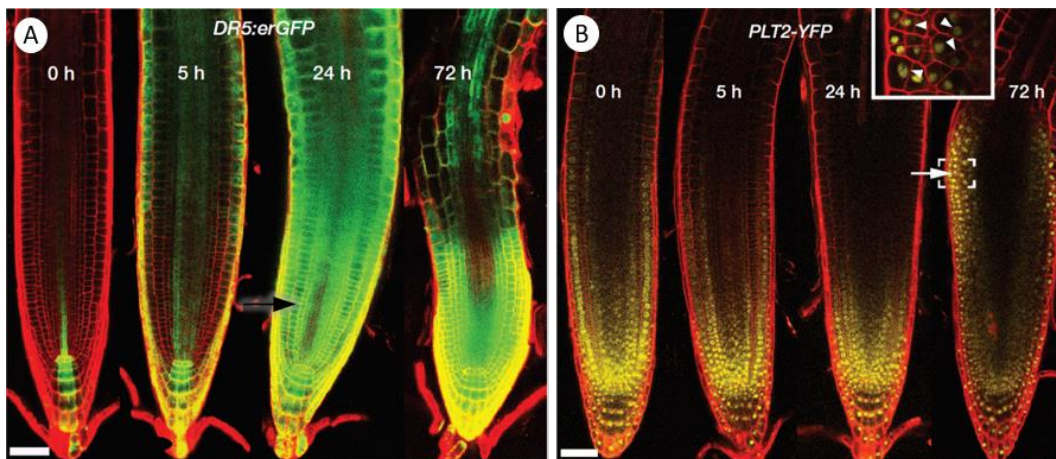
La régulation de la division et de la différenciation cellulaire par les gènes *PLT* se fait grâce à un gradient du niveau d'expression des gènes (Galinha et al., 2007), et la concentration locale de protéine définit le seuil entre la division et la différenciation cellulaire (Santuari et al., 2016). Le plus haut niveau d'expression des gènes *PLT* est situé au niveau de la niche de cellules souches, principalement au niveau du centre quiescent. Les protéines PLT permettent de promouvoir la division cellulaire et de réprimer la différenciation des cellules. L'expression des gènes décroît en s'éloignant du RAM, permettant ainsi la transition entre la zone de division et la zone d'élongation et de différenciation ([figure 25](#) ; Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007).

Les facteurs de transcription PLT partagent des cibles communes. En effet, chaque gène *PLT* sous le contrôle du promoteur de *PLT2* restaure partiellement le phénotype du double mutant *plt1 plt2*, qui présente une réduction importante de la taille du RAM, et une perte des marqueurs du centre quiescent (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007). Pour pouvoir étudier les cibles des gènes *PLT*, Santuari et al. (2016) ont utilisé des plantes d'*A. thaliana* transformées par des constructions permettant de relocaliser les facteurs de transcription PLT du cytoplasme vers le noyau en temps voulu, ce qui leur a permis de réaliser des analyses transcriptomiques avant et après activation de la transcription des cibles de PLT. Ces constructions consistent en une fusion des protéines PLT avec un récepteur aux glucocorticoïdes (GR), sous le contrôle d'un promoteur fort de type 35S. Les fusions PLT-GR sont séquestrées dans le cytoplasme des cellules, mais après 6 h de transfert des plantes sur un milieu comportant de la dexaméthasone (un glucocorticoïde), le complexe PLT-GR lié à la dexaméthasone est relocalisé dans le noyau, permettant aux protéines PLT d'activer la transcription de leurs gènes cibles ([figure 26](#)). De façon intéressante, chaque protéine PLT permet d'activer et de réprimer différents lots de gènes, de façon équivalente, ce qui démontre que les facteurs de transcription PLT possèdent deux rôles distincts. Les résultats montrent également que les protéines PLT régulent des lots de gènes communs entre elles, avec respectivement au moins 62 % et 39 % de cibles communes entre deux et trois protéines PLT. Le patron d'expression des gènes activés par PLT se situe globalement au niveau de la zone de division du RAM, alors que les gènes réprimés par PLT montrent un niveau d'expression le plus important en dehors du gradient de PLT, dans les zones d'élongation et de différenciation.

Les facteurs de transcription PLT permettent donc de promouvoir des processus liés à la croissance primaire, tels que la réplication de l'ADN et le métabolisme de l'ADN, et la régulation du cycle cellulaire. En revanche, les protéines PLT répriment majoritairement les processus d'expansion cellulaire et de différenciation tels que la synthèse de la paroi et sa réorganisation, ainsi que la différenciation des trichoblastes (Santuari et al., 2016). Étrangement, d'autres résultats suggèrent également un rôle de PLT3 dans le contrôle de mécanismes de défense, et les gènes *PLT3/AIL6* ainsi que *ANT (AINTEGUMENTA)* réguleraient l'initiation et la croissance des organes floraux *via* la modification des pectines pariétales. En



**Figure 27 : Domaine d'expression des gènes IAA2, PLT1, PLT2, PLT3 et PLT4.** A) Motif d'expression d'un transformant IAA2::GUS ( $\beta$ -glucuronidase ; Grieneisen et al., 2007). De B) à E) : Expression du gène codant la protéine fluorescente CFP (cerulean fluorescent protein) sous le contrôle des promoteurs PLETHORA PLT1, PLT2, PLT3 ou PLT4 (Galinha et al., 2007). Echelles non spécifiées.



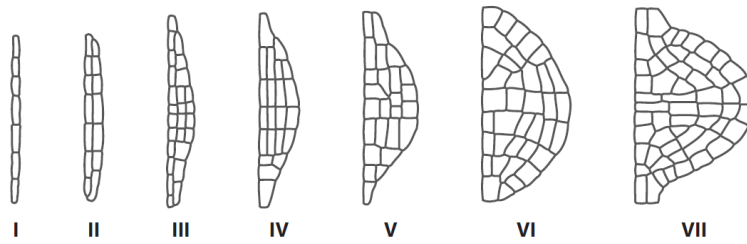
**Figure 28 : Le gradient d'expression de PLT2 n'est pas une réponse du gradient d'auxine.** Des plantules de 4 jours ont été transférées sur un milieu gélosé comprenant à la fois 20  $\mu$ M de NPA et 5  $\mu$ M d'auxine (IAA) pendant le temps indiqué. Flèche noire : traitement à l'auxine uniquement. (A) L'élément de réponse à l'auxine DR5::erGFP (er : réticulum endoplasmique) répond rapidement au traitement. (B) La protéine de fusion pPLT2::PLT2-YFP répond plus tardivement au traitement, et présente une modification du domaine d'expression (flèches blanches). Des résultats similaires ont été observés avec les autres PLT. De plus, l'image agrandie de la région encadrée montre des divisions cellulaires altérées (têtes de flèches blanches). Echelle : 50  $\mu$ M. D'après Mähönen et al. (2014).

effet, le double mutant *plt3 ant* possède des quantités réduites d'HG déméthylestérifiés dans les stades précoces du développement des fleurs (Krizek et al., 2016). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Santuari et al. (2016) (données supplémentaires 1), qui montrent que les gènes *PLT* régulent des HGME telles que des PME ou des PG.

Le gradient de protéines PLT a été considéré comme provenant du gradient de transcription des gènes correspondants, car la transcription et la traduction des protéines de fusion PLT-YFP présentent un gradient similaire (Galinha et al., 2007). La transcription des gènes *PLT* nécessitant des facteurs de réponses à l'auxine (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007), et l'auxine formant un gradient de concentration identique à l'expression des gènes *PLT* (**figure 27**), il a été suggéré que le gradient de PLT soit dépendant du gradient d'auxine (Grieneisen et al., 2007). Cependant, Mähönen et al. (2014) ont démontré que des traitements d'auxine combiné au NPA (1-N-naphthylphthalamic acid), un inhibiteur du transport polarisé de l'auxine, n'induisait pas d'expansion rapide du domaine d'expression des *PLT*. Seul un traitement prolongé d'auxine et de NPA de 72 h permet d'observer une modification du motif d'expression de *PLT-YFP* (yellow fluorescent protein), alors que pour le marqueur *DR5*, un élément synthétique de réponse à l'auxine, utilisé pour étudier la distribution de l'auxine endogène (Nakamura, 2003), le domaine d'expression est modifié en à peine 5 h après le début du traitement (**figure 28 A**). Après 72 h de traitement, le domaine d'expression des *PLT-YFP* est déplacé en amont du RAM, principalement au niveau des tissus en surface, où des divisions cellulaires altérées sont observées (**figure 28 B**). De plus, lors d'une stimulation du gravitropisme, l'auxine présente une modification rapide de son gradient grâce à la réorientation des protéines PIN, qui permettent l'efflux d'auxine, alors que les niveaux de PLT demeurent constants (Mähönen et al., 2014).

Mähönen et al. (2014) ont donc étudié l'origine du gradient de PLT. Ils ont pour cela utilisé un système d'activation clonal (Heidstra, 2004), et ont généré des clones cellulaires dans le méristème, exprimant à la fois la construction PLT2-RFP (red fluorescent protein) et la GFP. Dans les clones cellulaires marqués par la GFP, la protéine de fusion PLT2-RFP est bien exprimée, mais est également visible dans les cellules adjacentes, démontrant que la protéine PLT2 ou ses transcrits sont capables de migrer. Ainsi, les auteurs estiment que la zone où la protéine PLT2 est produite ne représente qu'un tiers des tissus où elle est visible, due à sa diffusion. Les protéines seraient propagées d'une cellule à l'autre par le mouvement protéique, mais également par division cellulaire. En effet, en bloquant les divisions cellulaires, bien que le domaine de transcription de PLT2 ne soit pas altéré, le domaine contenant les protéines de fusion PLT2-3×YFP se retrouve réduit.

Si le gradient d'auxine n'est pas directement à l'origine du gradient de PLT, il joue tout de même un rôle dans sa régulation, puisque l'auxine influence la diffusion des protéines PLT, en contrôlant les taux de divisions et d'expansion cellulaire, à l'échelle d'heures. De plus, l'auxine influence lentement la taille et la localisation des zones de différenciation en régulant la transcription des gènes *PLT*, à l'échelle de jours (Mähönen et al., 2014). En revanche, les gènes permettant le transport polarisé de l'auxine *PIN4* sont induits par PLT au niveau du centre quiescent, et le double mutant *plt1 plt2* possède des quantités inférieures d'auxine au niveau



**Figure 29 : Etapes de formation du primordium de racine latérale.** Les racines latérales émergent à partir de cellules du péricycle, appelées cellules fondatrices. Durant la première étape, les cellules fondatrices subissent des divisions anticlines, puis périclines lors du deuxième stade. A partir du stade III, la forme du dôme du primordium commence à être visible, et seules les cellules centrales se divisent de façon péricline, afin de former 3 couches cellulaires, puis 4 couches au stade IV. Au stade V, les cellules de chaque couche subissent des divisions anticlines de façon à ce que le primordium pousse à travers le cortex de la racine primaire. Au stade VI les couches tissulaires commencent à se définir. Les divisions anticlines se poursuivent. Au stade VII, le primordium est sur le point d'émerger de l'épiderme de la racine parente. D'après Petricka et al. (2012).

des pointes racinaires en comparaison avec le sauvage, confirmant que les PLT induiraient la biosynthèse de l'auxine. Ces résultats témoignent d'un rétrocontrôle entre l'auxine et les PLT (Galinha et al., 2007; Santuari et al., 2016).

L'activité des protéines PLT est directement régulée par des facteurs de croissance du méristème racinaire de type peptidique, ainsi que leurs récepteurs correspondants, et par les protéines de co-répression nucléaire GROWTH-REGULATION FACTOR (GRF). De plus, la protéine GRF2 est régulé par PLT et est capable de se lier à PLT2, suggérant un rétrocontrôle négatif, afin de stabiliser les niveaux de PLT (Santuari et al., 2016).

### III.4. Formation des racines latérales

#### III.4.1. Émergence du primordium racinaire latéral

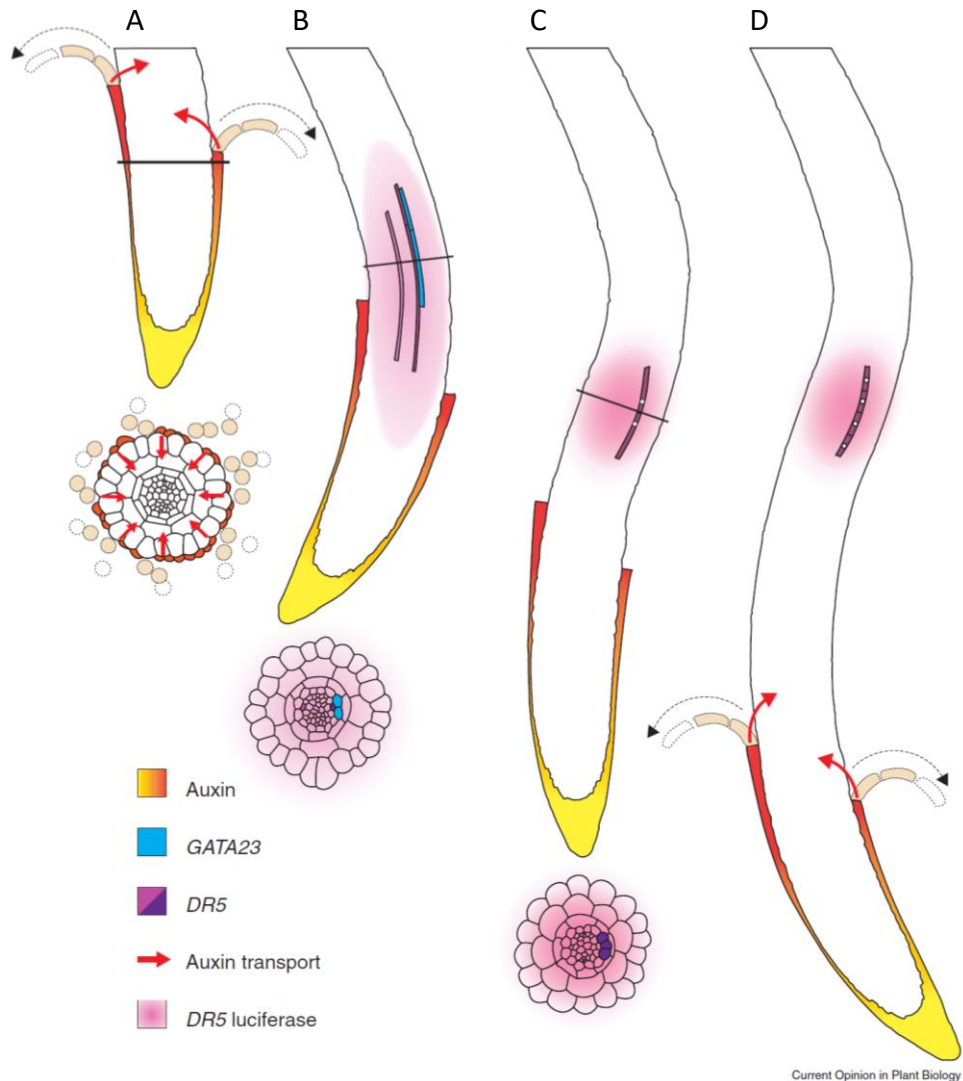
Les racines latérales émergent au niveau de la zone de différenciation de la racine source, à partir des cellules du péricycle adjacentes aux pôles du xylème. Certaines de ces cellules, appelées cellules fondatrices, sont stimulées pour se diviser et former le primordium racinaire latéral en 7 étapes ([figure 29](#)). Durant le premier stade de formation, les cellules fondatrices se divisent par divisions anticlinales. Au stade II, les cellules se divisent de façon périncline afin de former une deuxième couche de cellules. Au stade III, les cellules au centre se divisent pour former une troisième couche, et le primordium commence à avoir la forme d'un dôme. Puis aux stades qui suivent, les divisions anticlines permettent au dôme de grandir, et de traverser les couches tissulaires de la racine parente. À la fin des 7 étapes, le primordium commence à ressembler à l'apex d'une racine primaire, et émerge de l'épiderme de la racine source.

#### III.4.2. Contrôle de la formation de racines latérales

Tout comme la racine primaire, les hormones telles que l'auxine, et des facteurs de transcription tels que PLT, WOX5, FEZ, SBM, SCR et SHR sont nécessaires à la formation des racines latérales (Du and Scheres, 2017; Peret et al., 2009; Petricka et al., 2012).

En effet, le traitement de racines avec de l'auxine exogène induit la formation de racines latérales, grâce à l'activation du cycle cellulaire dans les cellules fondatrices, *via* le contrôle de la voie des cyclines (Peret et al., 2009; Petricka et al., 2012). Cependant, l'auxine interne ne serait pas suffisante pour générer les sites de formation des racines latérales, appelés sites de pré-branchement des racines latérales (Petricka et al., 2012). En revanche, il a récemment été démontré que l'auxine contenue dans la coiffe racinaire latérale est relarguée de façon périodique vers l'intérieur de la racine par les cellules se détachant de la coiffe latérale. Cet influx d'auxine périphérique est un des éléments déclenchant la formation des sites de pré-branchement à intervalles réguliers ([figure 30](#) ; Möller et al., 2017).

Les réponses initiales de l'auxine au niveau des primordium de racines latérales ne sont pas dépendantes de l'activité de facteurs de transcription tels que PLT, mais dépendent de facteurs de réponses à l'auxine ARF7 et ARF19 (auxin response factor), qui sont requis pour activer l'expression des premiers gènes *PLT* intervenant dans la formation du stade I du primordium : *PLT3*, *PLT5* et *PLT7*. Les premiers gènes *PLT* exprimés permettent l'expression



Current Opinion in Plant Biology

**Figure 30 : Mécanismes impliqués dans le positionnement des racines latérales le long des axes longitudinal et axial de la racine source. A)** Accumulation d'auxine dans la coiffe racinaire latérale sous forme de gradient (concentration faible : jaune, concentration importante : rouge). Les cellules en pointillés représentent les cellules détachées de la coiffe latérale grâce au programme de mort cellulaire programmée. Ces cellules seraient à l'origine de la forte augmentation de la concentration d'auxine dans la zone de transition, entre le méristème et la zone d'élongation, grâce au transport de l'auxine (représenté par des flèches rouges). **B)** Le relargage d'auxine dans la zone de transition provoquerait une réponse maximum à l'auxine, visualisée grâce au rapporteur DR5-Luciférase (représenté en rose). Le rapporteur fluorescent DR5 (représenté en violet) est exprimé dans les cellules du protoxylème, et GATA23 (en bleu) est exprimé dans les cellules du pérycyle adjacentes aux pôles du xylème de la zone d'oscillation. L'expression de DR5 est plus importante au niveau de la partie convexe (violet foncé) de la racine stimulée gravitationnellement, comparée aux cellules de la partie concave (violet clair). **C)** Les cellules exprimant DR5-Luciférase se retrouvent dans la zone de différenciation grâce à la croissance de la racine. Les cellules maintiennent l'expression du rapporteur DR5-Luciférase, et deviennent le site de pré-branchement. Les cellules du pérycyle exprimant le rapporteur DR5 au niveau du site de pré-branchement acquièrent l'identité de cellules fondatrices, et leurs noyaux (cercles ronds) migrent vers leur paroi commune. **D)** Les cellules fondatrices augmentent de volume et se divisent de façon asymétrique pour initier la formation du primordium. D'après Möller et al. (2017).



## Chapitre IV. Les protéines à ancre GPI

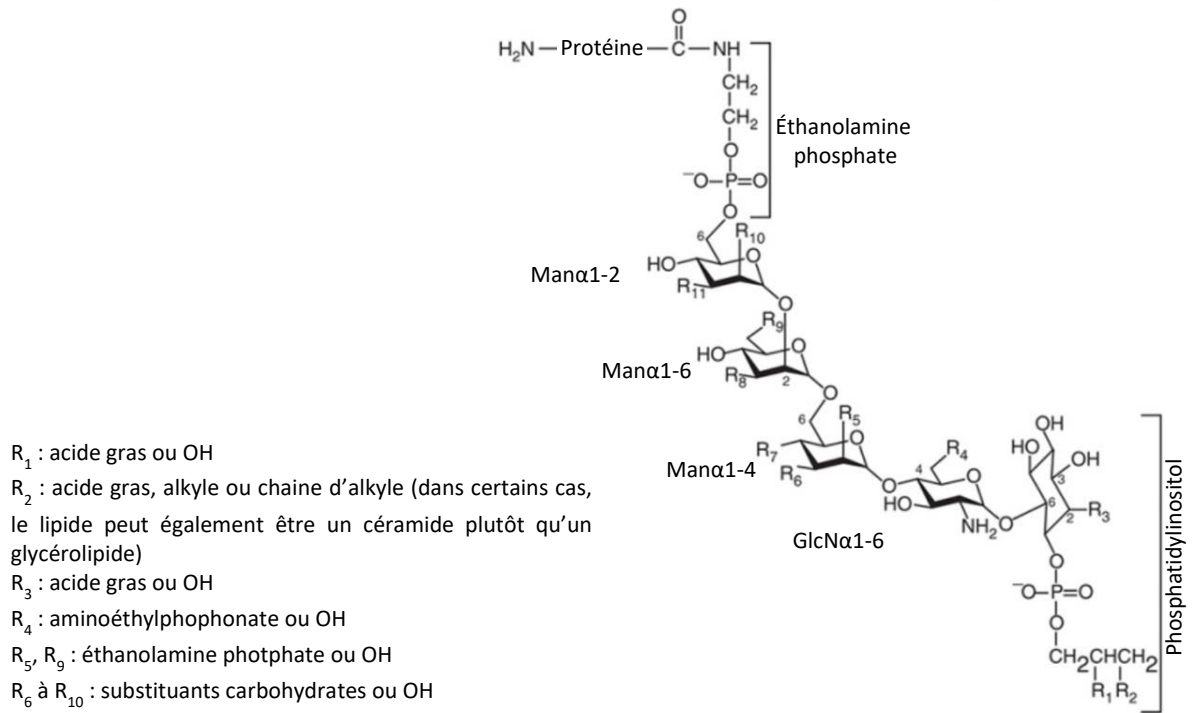
Nous avons vu dans le chapitre II que la croissance des cellules pouvait être soit isotropique, soit anisotropique (comme dans le cas des racines, chapitre III), et qu'en cas de croissance anisotropique, les parois présentent une asymétrie chimique et mécanique : les parois longitudinales des cellules en croissance anisotropique présentent notamment des HG déméthylestérifiés, alors que les parois transversales possèdent des HG méthylestérifiés. De plus, les parois latérales sont plus souples que les parois transversales (Peaucelle et al., 2015). Une hypothèse pour expliquer ces observations pourrait donc être l'existence d'un mécanisme dirigeant l'activité des PME vers les parois longitudinales des cellules en élongation asymétrique, ce qui jusqu'ici n'a été mis en évidence. Il est également possible que des PG ou des pectates lyases pourraient intervenir de manière asymétrique, mais une fois de plus sans aucune preuve directe.

De façon intéressante, il a été observé que certaines HGME possèderaient une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) putative. Ce type d'ancre permet de fixer des protéines sur la surface externe de la membrane plasmique des cellules, et de les libérer dans l'apoplaste de façon contrôlée (De Caroli et al., 2011; Pierleoni et al., 2008). Les ancres GPI permettent également d'assigner les protéines à la membrane et/ou à la paroi de manière asymétrique (Ambrose et al., 2013; Roudier, 2005). Les ancres GPI pourraient donc expliquer la localisation préférentielle de certaines HGME au niveau des parois longitudinales, et ainsi modulerait la localisation de leur activité.

### IV.1. Structure de l'ancre GPI

Les protéines liées à des ancres GPI (GPI-AP pour « glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins ») sont omniprésentes à la surface cellulaire chez tous les eucaryotes (Komath et al., 2018). Toutes les ancres GPI (sauf exceptions) partagent une structure de base commune qui contient une partie glucidique et une molécule de phosphatidylinositol, liée à deux longues chaînes d'acides gras. La partie glucidique est composée d'un glucosamine, de trois résidus mannose et d'un phosphoéthanolamine, qui peut former des liaisons amide avec le résidu C-terminal d'un polypeptide ([figure 31](#) ; Ferguson et al., 2017; Pierleoni et al., 2008; Yeats et al., 2018).

En dehors de ce corps commun, les ancres GPI sont relativement diverses, car elles dépendent, d'une part, des protéines qui leurs sont liées, et d'autre part des organismes dans lesquels elles sont synthétisées. Il y a notamment de considérables variations au niveau de la partie phosphatidylinositol. D'ailleurs, chez certaines ancres GPI, on retrouve d'autres inositolphospholipides tels que des *lysoacyl*-phosphatidylinositol, *alkylacyl*-phosphatidylinositol, *alkenylacyl*-phosphatidylinositol, et des inositolphosphocéramides. On peut également observer des acylations de l'inositol, qui rendent l'ancre résistante à l'action de certaines phospholipase C de bactéries spécifiques au phosphatidylinositol (Ferguson et al., 2017).



**Figure 31 : Structure générale des ancres GPI.** Les ancres GPI partagent une base commune qui consiste en un éthanolamine- $PO_4$ -6Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$ 1-4GlcN $\alpha$ 1-6myo-inositol-1- $PO_4$ -lipide. D'après Ferguson et al. (2017).

plus tardive des gènes *PLT1*, *PLT2* et *PLT4*. De plus les gènes *PLT* orchestrent les autres facteurs de transcription, soit en permettant leur expression comme pour *WOX5*, soit en augmentant leur expression ou en contrôlant leur patron d'expression, comme pour *SHR* et *FEZ*, ou encore en activant directement le facteur de transcription comme pour *SCR*. Les facteurs de transcription *PLT* permettent ainsi de réguler les divisions asymétriques conduisant à la génération des primordium racinaires latéraux (Du and Scheres, 2017).



## IV.2. Fonctions des GPI-AP

L'ancre GPI confère à la protéine à laquelle elle est liée des caractéristiques qui leurs sont propres. Premièrement, l'ancre GPI permet le transport et le maintien de la protéine dans la couche externe de la membrane plasmique, d'où la GPI-AP peut migrer, à des taux très bas, d'une cellule à une autre (Komath et al., 2018). Elle peut également conférer à la protéine une localisation particulière. Par exemple la protéine LTPG (« GPI-linked lipid transfer protein ») s'accumule passivement au niveau des coins des cellules épidermiques, grâce à la forme incurvée des cellules. Lorsque la forme cellulaire change durant la différenciation, l'accumulation de LTPG est peu à peu estompée (Ambrose et al., 2013). De même, la GPI-AP COBRA est adressée de façon polarisée à la membrane plasmique puis à la paroi longitudinale, et est distribuée sur des bandes perpendiculaires à l'axe longitudinal, grâce à des mécanismes dépendant des microtubules. Grâce à cette localisation contrôlée, COBRA intervient dans le contrôle de l'expansion anisotropique de différents organes en développement, car elle serait impliquée dans le dépôt des microfibrilles de cellulose durant l'élongation cellulaire rapide (Roudier, 2005).

Deuxièmement, la liaison osidique qui lie l'ancre à la protéine étant assez souple, la protéine peut adopter une rotation en trois dimensions, ce que peu d'autres protéines liées à la membrane peuvent faire. Les GPI-AP sont donc des récepteurs de signaux idéaux, par exemple pour des molécules de reconnaissance des hôtes (Komath et al., 2018).

Troisièmement, beaucoup de GPI-AP peuvent être libérées de la membrane grâce à des phospholipases, permettant aux protéines solubles d'agir dans le milieu extracellulaire. Chez les plantes, les GPI-AP peuvent se lier de façon covalente à la paroi, participant ainsi au maintien de l'intégrité de la paroi ainsi qu'à son remodelage, tout en permettant à la cellule de communiquer avec son environnement extérieur. La destination finale des GPI-AP (membrane, paroi) dépend de la séquence signal de l'attachement de l'ancre GPI à l'extrémité C-terminale de la protéine (Komath et al., 2018).

Approximativement 1 % des protéines de plantes sont prédites pour être modifiées post-traductionnellement par l'ajout d'une ancre GPI. La fonction des GPI-AP dans le développement des plantes n'est pas établie mais des mutants incapables de produire des ancres GPI présentent des embryons létaux, aussi bien gamétophytiques que sporophytiques (Yeats et al., 2018). Par exemple le gène *PEANUT*, codant un homologue de la protéine animale PIG-M, une mannosyltransférase localisée dans le réticulum endoplasmique et qui intervient dans la synthèse des ancres GPI, induit chez le mutant *peanut1* une létalité des graines, due à un défaut de dépôt des polysaccharides pariétaux (Gillmor et al., 2005). Yeats et al. (2018) ont regroupé dans un tableau l'ensemble des mutants de GPI-AP de plantes caractérisés et les phénotypes associés. Beaucoup de mutations touchent la reproduction des plantes, par exemple le développement du pollen, la gamétogenèse femelle et le développement des graines. Les mutations engendrent également une altération de la paroi primaire ou secondaire, en particulier de la cellulose. Certaines autres mutations de GPI-AP provoquent des altérations de la morphologie et de la taille des organes et des tissus vasculaires. Enfin, les



mutations peuvent également être à l'origine de sensibilité à des stress biotiques ou abiotiques, à cause d'une altération de la signalisation de défense. Les GPI-AP participent donc à divers processus biologiques se déroulant à la surface de la membrane plasmique et à la paroi, tels que la signalisation, le métabolisme de la paroi, les liaisons entre les polymères de la paroi, et le transport symplasmique (Yeats et al., 2018).

Malgré la conservation des processus de biosynthèse de GPI chez les eucaryotes, il n'y a pas de GPI-AP homologue évidente partagée entre eux. En revanche, dans la lignée verte, le répertoire de GPI-AP est bien conservé, et beaucoup de gènes codant des GPI-AP forment des familles de gènes, dans chaque espèce donnée (Yeats et al., 2018). Chez les plantes, les AGP sont des GPI-AP connues et répandues. Elles font partie des protéoglycanes riches en hydroxyproline. Cette famille de gènes joue un rôle important dans la croissance et le développement de la plante. Les AGP sont observées très tôt dans les lignées des plantes terrestres, et sont présentes chez les Glaucophytes, les Chromistes et les algues vertes (Johnson et al., 2017).

### IV.3. Synthèse des ancrés GPI

La synthèse des ancrés GPI est un processus très conservé entre les systèmes étudiés. En résumé, l'ancre GPI est assemblée sur le phosphatidylinositol dans le réticulum endoplasmique, puis est transféré en bloc sur la protéine. Les protéines nécessitant l'addition d'une ancre GPI possèdent un peptide signal au niveau de leur extrémité C-terminale. Le peptide signal est clivé de façon post-traductionnelle au niveau du site  $\omega$  (site séparant la protéine du peptide signal), puis celui-ci est remplacé par l'ancre GPI, grâce à une liaison covalente. Des modifications de l'ancre, comme des glycosylations, peuvent avoir lieu dans l'appareil de Golgi et pendant la sécrétion des GPI-AP vers la membrane (Orlean and Menon, 2007).

Environ 30 gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans l'assemblage de l'ancre et dans son remodelage, et dans beaucoup de cas, des homologies ont été observées entre les gènes de mammifères et de levures. L'étude du génome d'*A. thaliana* indique que la plupart de ces gènes sont présents en une seule copie chez les plantes (Furt et al., 2011). La synthèse et la structure de base des ancrés GPI semble donc conservée entre les plantes et les autres eucaryotes. Ceci n'est pas surprenant, puisque l'apparition et l'évolution des ancrés GPI est antérieure à l'origine des eucaryotes, et des GPI-AP ont été détectées chez plusieurs espèces d'archées. Les séquences du génome de ces archées indiquent également une voie de synthèse largement conservée (Eichler and Adams, 2005). A l'heure actuelle, la détermination structurale d'un plus grand nombre d'ancres GPI de plantes est nécessaire pour déterminer s'il existe des variations de structure (Yeats et al., 2018).

### IV.4. Maturation des GPI-AP

Après la liaison entre l'ancre GPI et la protéine par une transamidase GPI dans la lumière du réticulum endoplasmique, la sécrétion et les modifications des GPI-AP commencent. Les modifications de l'ancre GPI après son transfert sur la protéine ont été démontrées chez les





mammifères et les levures comme étant importantes pour l'association de l'ancre avec les lipides membranaires et la sécrétion des GPI-AP (Fujita and Kinoshita, 2012). Les GPI-AP sont ensuite transférées depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Chez les plantes, c'est dans l'appareil de Golgi que les modifications glycosidiques (*N*- et *O*-glycosylations) de l'ancre s'effectuent. Mais chez les levures et les mammifères, ces modifications ont lieu ou débutent dans le réticulum endoplasmique (Chatterjee and Mayor, 2001; Orlean and Menon, 2007; Yeats et al., 2018).

#### IV.5. Sécrétion des GPI-AP

Après maturation, les GPI-AP sont sécrétées vers la surface de la cellule. Des évidences indiquent que cette sécrétion se fait de façon sélective, et non de façon aléatoire. En effet, des études chez les plantes, les animaux et les champignons démontrent que les GPI-AP s'associent avec des domaines membranaires riches en sphingolipides et en stérols, appelés radeaux lipidiques ou microdomaines membranaires. Selon les organismes, ces associations commencent à apparaître dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, et facilitent la sortie des GPI-AP et d'autres protéines associées à la membrane (Chatterjee and Mayor, 2001; Fujita and Kinoshita, 2012; Helms and Zurzolo, 2004; Yeats et al., 2018).

Le transport des GPI-AP implique les protéines p24 et les complexes COPII (cytosolic coat complex II) chez les levures et les mammifères, qui sont des régulateurs du trafic de protéines le long de la voie de sécrétion (Castillon et al., 2011; Fujita et al., 2011). Chez *A. thaliana*, le trafic de p24 et des protéines COP entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi semble également avoir des rôles dans la sécrétion (Montesinos et al., 2014), mais il reste à démontrer qu'elles participent réellement à la sécrétion des GPI-AP (Yeats et al., 2018).

Le tri des GPI-AP à la sortie de l'appareil de Golgi se fait également grâce à des différences de composition lipidique des citernes golgiennes. Il a été montré que, chez les cellules épithéliales de mammifères, au niveau du réseau *trans*-Golgien, les GPI-AP sont isolées des autres protéines dans des vésicules distinctes afin d'être délivrées à la membrane plasmique de la cellule. Chez les animaux, les lipides présents au niveau de la membrane golgienne sont différents entre son feuillet externe et son feuillet interne, ce qui permettrait d'assigner l'adressage des GPI-AP. La partie externe est riche en sphingolipides, et la partie interne en phospholipides insaturés (Lisanti et al., 1988). Mais l'association des GPI-AP avec les lipides ne serait pas le seul mécanisme de tri effectué dans les cellules épithéliales. L'oligomérisation des GPI-AP pourrait également participer à la ségrégation des GPI-AP par rapport aux autres protéines dans l'appareil de Golgi, améliorerait le tri des lipides et la courbure de la membrane, afin de favoriser le bourgeonnement des vésicules golgiennes (Yeats et al., 2018; Zurzolo and Simons, 2016).

Quant aux GPI-AP de plantes, aucun résultat ne montre clairement si les GPI-AP sont transportées par des microdomaines lipidiques à travers l'appareil de Golgi, ou par un autre mécanisme. De plus, bien qu'il soit admis que l'asymétrie lipidique existe également au niveau de la bi-couche de la membrane plasmique des plantes, peu d'études le démontre (Yeats et



al., 2018). Une étude chez l'avoine suggère que, de façon similaire aux animaux, les phospholipides et un composant galactolipide mineur prédominent sur la couche cytosolique de la membrane. Sur la couche apoplastique, le feuillet est enrichi en sphingolipides et en stérols (Tjellström et al., 2010).

Les GPI-AP elles-mêmes serviraient de signal de sortie de l'appareil de Golgi. En effet, la perte de la séquence signal de l'ancre GPI de la protéine PME11, ou le blocage de la synthèse de l'ancre GPI engendrerait l'accumulation de PME11 dans l'appareil de Golgi chez le tabac (De Caroli et al., 2011).

De nouvelles études sur la sécrétion de différentes GPI-AP de plantes sont nécessaires afin de déterminer si la sécrétion est basée sur l'association avec des lipides et/ou d'autres composants. Par exemple, beaucoup de GPI-AP de plantes possèdent des glycanes liés par *N*- ou *O*- glycosylation, ce qui pourrait renforcer leur transport vers le feuillet externe de la membrane, grâce aux interactions protéines-glucides et/ou glucides-glucides avec les microdomaines (Yeats et al., 2018).

#### IV.6. Association des GPI-AP aux microdomaines lipidiques

On parle généralement de microdomaines, mais il existe en réalité deux tailles de radeaux lipidiques : les « nanoscale domains », mesurant entre 10 et 100 nm, et les « mesoscales domains » ou « microdomaines », d'une taille supérieure à 100 nm, qui sont une association de nanodomaines. Ces structures sont modulées par le cytosquelette et les composants de la paroi, ce qui affecte leur mobilité et leur dynamique, ainsi que leur formation (Konrad and Ott, 2015).

Les microdomaines sont retrouvés au niveau des membranes apicales, basales et latérales des cellules à croissance polarisée, ainsi qu'au niveau des plaques équatoriales cellulaires, ou encore sont distribués de façon plus isodiamétrique autour de la membrane. L'organisation des protéines à la membrane plasmique serait en partie due à leur affinité pour certains types de lipides, et engendrerait la proximité entre des protéines ayant la même affinité. Mais le regroupement des protéines serait également due à des interactions biochimiques et thermodynamiques entre les protéines et entre les protéines et les lipides (Konrad and Ott, 2015). Les protéines enchâssées dans ces radeaux lipidiques comprennent des GPI-AP, mais également d'autres protéines avec un domaine transmembranaire, telles que les protéines PIN (Jarsch et al., 2014; Konrad and Ott, 2015; Yeats et al., 2018)

Les radeaux lipidiques ou microdomaines membranaires favoriseraient donc la coexistence de partenaires de signaux, l'adhésion, le remodelage de la matrice extra-cellulaire et les interactions avec les composants de la paroi cellulaire, et amélioreraient enfin la réponse aux pathogènes (Konrad and Ott, 2015). Les microdomaines membranaires ont une mobilité réduite et sont résistants à la solubilisation par des détergents non-ioniques. Cette dernière caractéristique permet leur isolement dans des « membranes résistantes aux détergents », formées par l'agrégation des structures lipidiques. Mais à cause de cette agrégation, ces membranes artificielles ne représentent pas tout à fait les microdomaines *in*



*vivo*. Elles sont cependant utilisées, en combinaison avec des analyses protéomiques, pour étudier les microdomaines et les GPI-AP chez les animaux, les levures et les plantes (Yeats et al., 2018).

Ces microdomaines pourraient donc être à l'origine de localisation particulière observée pour certaines GPI-AP telles que les protéines COBRA, qui s'accumulent au niveau des membranes puis des parois longitudinales des cellules en extension rapide (Roudier, 2005).

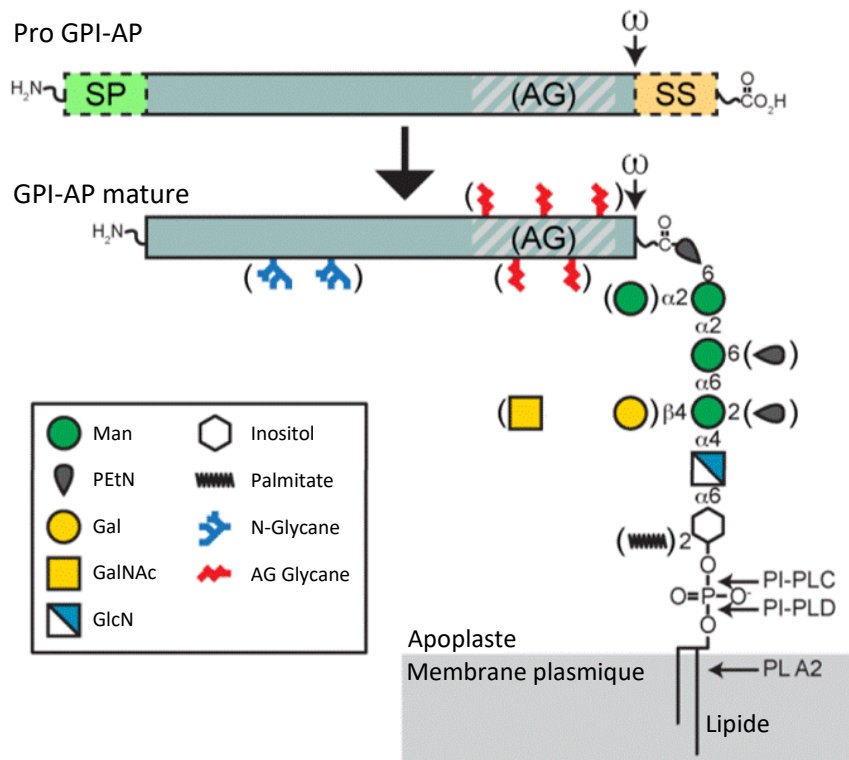
#### IV.7 Connexion entre la paroi et la membrane

Chez les levures, la connexion entre les glycoprotéines et les glucanes de la paroi *via* une transglycosylation est médiée par des GPI-AP, et est indispensable à leur développement normal. Les glycoprotéines pariétales sont souvent liées à une ancre GPI, et sont essentielles à l'intégrité de la paroi des levures, ainsi qu'à leur morphologie (Pittet and Conzelmann, 2007). Chez les plantes, il n'est pas connu si une transglycosylation similaire s'effectue. Cependant, les liaisons entre les polysaccharides pariétaux *via* la transglycosylation est important pour le remodelage de la paroi durant la croissance (Frankova and Fry, 2013). Quarante pourcent des GPI-AP sont prédites pour avoir des glycosylations de type arabinogalactane ou semblables aux extensines (Borner, 2003). Ces protéines comprennent les AGP. Or la liaison covalente d'AGP avec des polysaccharides pariétaux a été observée chez un certain nombre d'espèces végétales (Kjellbom et al., 1997). C'est le cas de la protéine ARABINOXYLAN PECTIN ARABINO GALACTAN PROTEIN1, qui est capable de se lier de façon covalente avec les pectines et les arabinoxyanes (Tan et al., 2013). Cette association entre les ancres GPI et les protéines contenant des glycanes de type arabinogalactane suggère que les plantes ont mis au point des mécanismes uniques pour établir des connexions entre la paroi et la membrane. Il est également possible d'observer des interactions entre des GPI-AP et la paroi *via* des domaines protéiques (Yeats et al., 2018). Par exemple, les GPI-AP COBRA-like sont capables de se lier à la cellulose *via* un domaine de liaison osidique « carbohydrate-binding module-like » (Liu et al., 2013).

Chez les animaux, deux classes de phospholipases spécifiques au phosphatidylinositol (PI-PL pour « phosphatidylinositol-specific phospholipases »), PI-PL C et PI-PL D, permettent de cliver les ancres GPI à différents sites de la partie GPI, et de libérer ainsi les protéines (Udenfriend, 1995). Cependant, aucune phospholipase spécifique aux ancres GPI n'a été caractérisée chez les plantes, bien qu'il y ait de nombreuses candidates avec des séquences similaires, et qu'elles soient localisées au niveau du système de sécrétion, à la membrane plasmique et/ou dans l'espace extracellulaire. En revanche, il est possible de libérer des GPI-AP des membranes résistantes aux détergents synthétiques ou de la membrane de protoplastes par traitement à la PI-PLC, supportant l'hypothèse que la libération des GPI-AP peut être régulée par l'action de PI-PL (De Caroli et al., 2011; Yeats et al., 2018)

#### IV.8 Prédiction de la modification des protéines par l'ajout d'une ancre GPI

Les pro GPI AP, avant maturation dans le réticulum endoplasmique, contiennent à l'extrémité N-terminale un peptide de signal de sécrétion, et à l'extrémité C-terminale une



**Figure 32 : Transformation post-traductionnelle d'une protéine en GPI-AP.** Les protéines qui vont être modifiées par l'ajout d'une ancre GPI possèdent à leur extrémité N-terminale un peptide signal de sécrétion (SP), et à leur extrémité C-terminale une séquence signal (SS) hydrophobe spécifiant l'ajout d'une ancre GPI. Ces deux séquences sont clivées dans le réticulum endoplasmique lors de la maturation de la pro protéine. Approximativement 40 % des gènes codant des GPI-AP sont prédits pour contenir des domaines arabinogalactanes (AG), et les GPI-AP peuvent également contenir des N-glycane. La structure générale des GPI est présentée, et les variations qui peuvent être observées suivant l'organisme d'origine sont indiquées entre parenthèses. D'après Yeats et al. (2018).

séquence permettant l'ajout de l'ancre GPI. Ces deux séquences sont clivées dans le réticulum endoplasmique lors de la maturation de la protéine ([figure 32](#)). Les peptides signaux de sécrétion eucaryotes possèdent environ 15 à 30 acides aminés, et bien que les séquences d'acides aminés ne sont pas conservées, le motif général et les acides aminés hydrophobes de ces peptides permettent leur prédiction par des logiciels informatiques tels que SignalP straightforward (Petersen et al., 2011; Yeats et al., 2018). Alors qu'approximativement 10 % du protéome de plante contient ce type de peptides signaux, seuls 10 % parmi ceux-ci sont potentiellement modifiés par l'ajout d'une ancre GPI (Yeats et al., 2018).

Le peptide de signal à l'extrémité C-terminale des pro GPI AP est reconnu par un complexe transamidase-GPI, qui clive le peptide au niveau du site  $\omega$ , et lie l'ancre GPI à la protéine *via* une liaison amide. De la même façon que les peptides signaux de sécrétion localisés à l'extrémité N-terminale, les peptides de signal en C-terminal ne possèdent pas de séquences spécifiques conservées, mais des caractéristiques significatives qui permettent à des logiciels informatiques de les identifier (Yeats et al., 2018). Ceux-ci incluent BIG-PI (Eisenhaber et al., 1999), PredGPI (Pierleoni et al., 2008), 2008), GPI-SOM (Fankhauser and Maser, 2005) et enfin FragAnchor (Poisson et al., 2007). Cependant les résultats fournis par ces logiciels sont à interpréter avec précaution et à vérifier de manière expérimentale, car de nombreux faux-positifs sont détectés en même proportion que la fréquence génomique des gènes qui codent pour des GPI-AP (Yeats et al., 2018).





## Chapitre V. Objectifs de la thèse

Il a été détaillé dans le chapitre I que les pectines jouent davantage un rôle structurel au niveau de la paroi que ce qui était imaginé il y a encore quelques années, car les pectines ne sont pas uniquement un gel dans lequel baigne le réseau de cellulose et d'hémicellulose. Elles sont en effet elles-mêmes liées à ce réseau, notamment à la cellulose, ce qui a pour conséquence de rigidifier la paroi. À cette caractéristique s'ajoute la capacité des pectines à former un gel pectique grâce au calcium, ou à être clivées par des PG, des pectates lyases et des pectines lyases, selon leur DM. Le rôle des pectines et leurs modifications durant la croissance sont donc très importants.

Le lien entre la croissance anisotropique et l'activité PME qui engendre des asymétries mécaniques au sein de la paroi (Peaucelle et al., 2011) a été expliqué dans le chapitre III. En revanche peu de corrélations ont été établies entre l'activité pectinolytique et la croissance cellulaire. Trois PG, PGX1, PGX2 et PX3 ont un rôle dans la croissance et le développement (Rui et al., 2017; Xiao et al., 2014, 2017). Cependant, il reste à définir la présence d'une activité pectinolytique asymétrique potentielle, en rapport avec la croissance anisotropique. Deux hypothèses peuvent en effet être proposées : (i) les enzymes pectinolytiques telles que les PG seraient sécrétées de manière uniforme et aléatoire dans l'apoplaste, et agiraient uniquement dans les zones où leurs cibles seraient présentes. (ii) Les PG seraient localisées à la membrane puis à la paroi de manière ordonnée et contrôlée. Dans le cadre de cette hypothèse, la régulation de la localisation des enzymes pourrait être dépendante de leur liaison à des ancrés GPI. Les ancrés GPI ont en effet déjà démontré leur implication dans l'assignation des GPI-AP COBRA aux parois latérales, au niveau de cellules en croissance anisotropique (Roudier, 2005). Par ailleurs, l'existence d'une PME1 liée à une ancre GPI a été rapportée (De Caroli et al., 2011). En outre, les domaines transmembranaires des protéines peuvent également permettre de contrôler leur adressage asymétrique aux membranes, comme dans le cas des protéines PIN. Il pourrait donc s'agir d'une possibilité de l'adressage contrôlée des PG à la membrane (Jarsch et al., 2014; Konrad and Ott, 2015; Yeats et al., 2018).

Au regard des informations déjà existantes sur le rôle des pectines durant la croissance cellulaire anisotrope, l'impact des HGMEs sur les caractéristiques mécaniques de la paroi, ainsi que la régulation de la localisation de certaines protéines grâce aux ancrés GPI, ce sujet de thèse a pour but d'étudier le rôle des PG dans le remodelage de la paroi durant la croissance anisotropique des cellules racinaires d'*A. thaliana*.

Les objectifs de cette étude sont divisés en plusieurs parties :

- 1) Identifier des gènes codant des PG candidates pour cette étude parmi les 67 gènes présents chez *A. thaliana* (Senechal and Wattier et al., 2014). Nous avons choisi d'étudier des PG prédites pour être liées à une ancre GPI, et une sans ancre GPI putative. Le choix des PG liées à une ancre GPI sera établi grâce aux logiciels de prédiction des ancrés GPI, et le choix de la PG sans ancre GPI sera établi à l'aide de l'outil Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> ; Winter et al., 2007) qui permet de

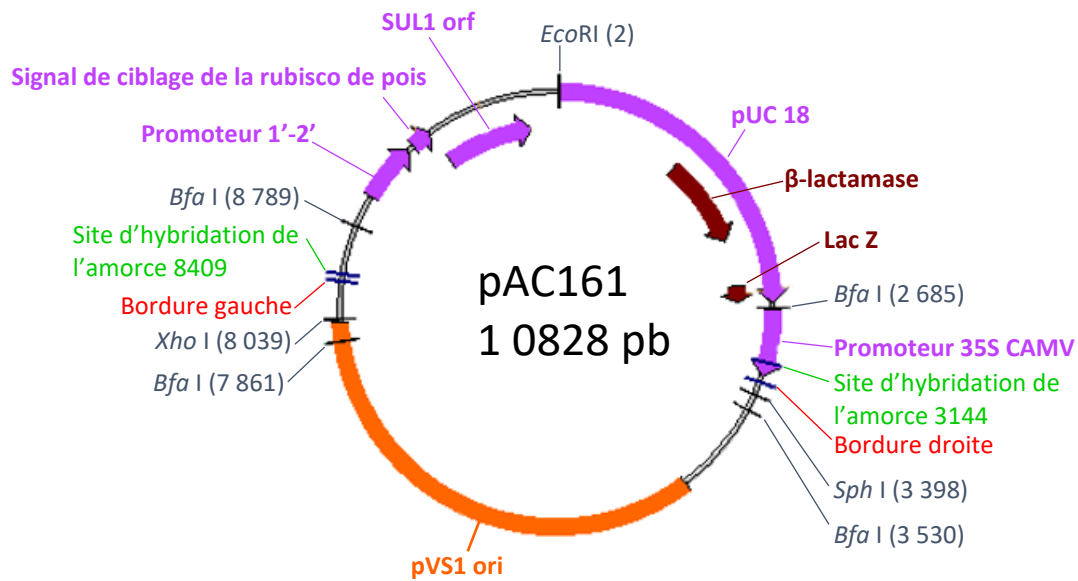


connaitre la localisation de l'expression des gènes d'*A. thaliana*, en se basant sur des données publiques d'analyses de microarray.

- 2) Définir la localisation de l'expression des gènes candidats ainsi que la localisation des protéines correspondantes au niveau tissulaire et cellulaire, à l'aide d'analyses microscopiques et/ou de biologie moléculaire. Pour cela, des transformations transitoires (en feuilles de tabac) ou stables (d'*A. thaliana*) de différentes constructions génétiques seront utilisées, ainsi que des analyses de RT qPCR (Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) afin de définir le niveau d'expression des gènes dans différentes parties de la plante.
- 3) Déterminer la fonction de ces deux protéines *in planta*, par le biais de la comparaison du développement de plantes n'exprimant pas ou sur-exprimant ces gènes par rapport au sauvage, ainsi que par l'examen de l'évolution de l'expression des gènes suivant différentes conditions expérimentales.
- 4) Établir si la prédiction de la présence de l'ancre GPI pour les GPI-AP putative est vérifiée, par approche microscopique en utilisant une construction pleine longueur et une construction dépourvue du peptide signal ancre GPI à l'extrémité C-terminale, et par analyse de l'activité PG *in vitro* de ces deux mêmes formes de la protéine GPI-AP putative.
- 5) Étudier l'activité PG des PG candidates *in vitro*, grâce à l'expression de ces protéines en système hétérologue en levure. Déterminer les conditions optimales de ces protéines.

**Tableau 2 : Lignées mutantes utilisées.** Deux types de mutants ont été utilisés : un provenant de la collection GABI-KAT (GK ; <http://www.GABI-Kat.de> ; Kleinboelting et al., 2012) et des mutants provenant de la collection SALK (<http://signal.salk.edu/>).

Gènes	Noms attribués aux gènes	Lignées mutantes	Noms attribués aux lignées
AT3G06770	PG R (POLYGALACTURONASE ROOT)	GK061E08	<i>pg r</i>
AT3G15720	PG RAM (POLYGALACTURONASE ROOT APICAL MERISTEM)	SALK062374C	<i>pg ram1</i>
		SALK008496C	<i>pg ram2</i>
		SALK009840C	<i>pg ram3</i>



**Figure 33 : Carte du plasmide pAC161 à l'origine des lignées mutantes GABI-KAT.** <http://www.GABI-Kat.de>.

# Matériel et méthodes

## Chapitre I : le matériel

### I.1. Matériel végétal

#### I.1.1. Matériel végétal utilisé

Deux plantes ont été utilisées au cours de cette étude : la plante modèle *A. thaliana* et du tabac (*Nicotiana benthamiana*). Le tabac a été utilisé uniquement dans le cadre de transformations pour des expériences d'expression transitoire (voir chapitre II, paragraphe II.7). L'écotype Columbia-0 (Col-0) d'*A. thaliana* a été utilisé afin de comparer le développement des racines et des hypocotyles étiolés au développement des mutants des gènes d'intérêt ainsi que des sur-expresses créés par transformation stable (voir chapitre II, paragraphe II.7).

#### I.1.2. Mutants *A. thaliana* utilisés

Deux types de mutants ont été utilisés : les mutants GABI-KAT et les mutants SALK (**tableau 2**). Ces mutants ont été créés par l'insertion stable d'un ADN-T (ADN de transfert) de manière aléatoire dans le génome afin de perturber la fonction des gènes, ce qui permet d'étudier leurs fonctions. C'est le principe de la génétique inverse (Kleinboelting et al., 2012). Ce type d'étude s'oppose à la génétique classique, qui pour un phénotype mutant donné cherche à identifier le gène responsable.

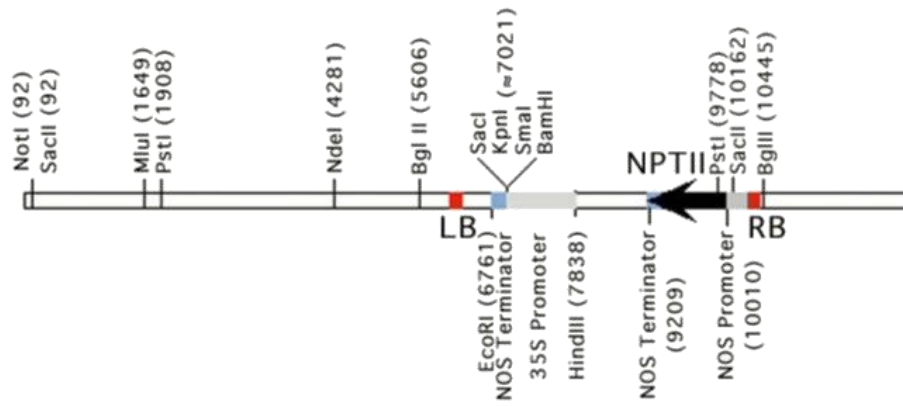
Pour connaître précisément le lieu d'insertion de l'ADN-T dans le génome, des amplifications d'ADN par PCR (Polymerase chain reaction, ou réaction en chaîne par polymérase) ont été réalisées à partir des séquences en bordure des ADN-T, puis séquencées, et les séquences ont été comparées au génome d'*A. thaliana* (Kleinboelting et al., 2012). Les banques de mutants sont alors utilisées pour étudier des mutations au niveau de gènes d'intérêt.

##### I.1.2.a. Mutant GABI-KAT

Pour l'étude du gène *AT3G067760* nommé *PG R (POLYGALACTURONASE ROOT)* un mutant de la collection GABI-KAT (Center for Biotechnology, <http://www.GABI-Kat.de> ; Kleinboelting et al., 2012) a été utilisé. Il s'agit du mutant *GK061E08* qui a été obtenu grâce au plasmide pAC161 (**figure 33**) dans l'écotype Col-0. L'ADN-T mesure 5,8 Kb et confère aux mutants une résistance à la sulfadiazine.

##### I.1.2.b. Mutant SALK

Plusieurs mutants de la collection SALK (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu/>) ont été utilisés pour étudier le gène *AT3G15720* nommé *PG RAM*. Il



**Figure 34 :** Carte du vecteur *pROK2* contenant l'ADN-T utilisé pour générer les mutants *SALK*. *NPTII* : gène de résistance à la kanamycine. *LB* et *RB* : respectivement *left border* (bordure gauche) et *right border* (bordure droite) <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=vector&id=300034> (Baulcombe et al., 1986).

s'agit des mutants SALK062374C, SALK008496C et SALK009840C, respectivement annotés *pg ram1*, *pg ram2* et *pg ram3*.

Ils ont été obtenus grâce au plasmide pROK2, dérivé du plasmide pBIN19 (Baulcombe et al., 1986). L'ADN-T mesure 4,5 Kb et contient un gène de résistance à la kanamycine NPTII (**figure 34**). En revanche, à cause de la production de nombreuses générations de plantes, certaines lignées montrent une co-suppression de la résistance à la kanamycine. Il est donc préférable de sélectionner les lignées mutantes par PCR et non par la résistance à l'antibiotique.

Les amorces spécifiques aux ADN-T GABI-KAT et SALK sont données dans le chapitre II paragraphe II.5, et les lieux d'insertion des ADN-T ont été vérifiés par PCR, ils figurent donc dans les résultats.

### I.1.3. Stérilisation des graines pour la culture *in vitro*

Les graines d'*A. thaliana* sont stérilisées dans une première solution composée d'éthanol 75 % et de triton 0,01 %, et sont incubées pendant 10 min sous agitation (environ 230 rpm ; « rotation per minute »). La première solution est ensuite remplacée sous hotte à flux laminaire par de l'éthanol 96 %, et les graines sont à nouveau placées 10 min sous agitation. Un maximum d'éthanol est ensuite retiré à l'aide d'une pipette à cône stérile, puis les graines sont mises à sécher sous hotte à flux laminaire avec le bouchon du tube ouvert pendant environ une heure, suivant la quantité de graines, jusqu'à ce que le restant d'éthanol se soit totalement évaporé.

### I.1.4. Semis et culture des graines d'*A. thaliana*

#### I.1.4.a. Semis des graines (culture *in vitro*)

Les graines stérilisées sont semées sous hotte à flux laminaire, généralement dans des boîtes de Petri carrées de 12 cm de côté, sur un milieu solide autoclavé MS (Murashige et Skoog) ½ à pH 5,8, contenant 2,2 g.L<sup>-1</sup> de MS, 10 g.L<sup>-1</sup> de saccharose, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de MES monohydrate (acide 2-[N-Morpholino]-éthanesulfonique) et 7,5 g.L<sup>-1</sup> d'agar. Le cycle d'autoclavage est de 20 min à 120°C.

Dans le cadre de la sélection de graines mutantes ou transformées, il est possible de compléter le milieu par un antibiotique filtré, dont la concentration dépend de l'antibiotique utilisé. Deux antibiotiques ont été utilisés dans le cadre de ce projet : de la sulfadiazine à une concentration finale de 7,5 µg.mL<sup>-1</sup> et de la kanamycine à 50 µg.mL<sup>-1</sup>. L'antibiotique est à incorporer après autoclavage, une fois que le milieu est suffisamment refroidi afin de ne pas dégrader l'antibiotique.

Les graines sont semées soit dans de l'eau autoclavée stérile à l'aide d'une pipette et d'un cône stérile coupé, soit elles sont dispersées sur la surface du milieu gélosé lorsqu'elles sont sèches.



**Figure 35 : Chambre ouverte de la Phénobox.** La Phénobox permet de mesurer l'allongement de racines ou d'hypocotyles de 10 plantules par boîte, et peut contenir 27 boîtes verticales.



#### I.1.4.b. Culture *in vitro* de plantules

Les boîtes de culture *in vitro* sont stratifiées pendant 3 à 5 jours à 4°C, puis sont mises en culture dans un phytotron. Les conditions classiques de culture sont en jours longs (16 h de jour et 8 h de nuit) à 21°C constants. L'hygrométrie du phytotron est de 70 % et la luminosité de 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Les boîtes peuvent être placées en culture verticale ou horizontale selon le but recherché, soit étudier le développement des racines ou des feuilles de la rosette.

#### I.1.4.c. Culture *in vitro* d'hypocotyles étiolés

Pour obtenir des hypocotyles étiolés, les boîtes de culture sont placées après stratification de 4 à 6 h à la lumière pour activer la germination, puis elles sont mises en culture à l'obscurité à la verticale dans un phytotron ou en chambre de culture à 21°C constants. Pour assurer l'obscurité, les boîtes sont emballées dans 2 couches de feuilles d'aluminium.

#### I.1.4.d. Culture en serre

Après 10-14 jours de croissance *in vitro*, une fois que les plantules possèdent deux feuilles en plus des cotylédons, celles-ci peuvent être cultivées en serre. Les jeunes plantules sont repiquées dans des pots, dans du terreau autoclavé. Il est également possible de semer directement des graines non stérilisées dans du terreau. Les pots sont mis en culture en serre ou dans un phytotron avec une photopériode de 16 h à la lumière à 22°C, et 8 h à l'obscurité à 19°C. Elles sont arrosées 2 à 3 fois par semaine avec de l'eau de ville.

Les graines sont récoltées une fois que les siliques ont atteint maturité, c'est-à-dire lorsqu'elles sont jaune pâle et sèches. Il faut compter environ 2 mois de culture en serre pour obtenir des graines.

### I.1.3. Culture en phénobox

La phénobox est une chambre de culture permettant de prendre des photos des boîtes en culture verticale à heures régulières, et à fréquence réglable (**figure 35**). Les conditions de culture, comprenant les températures jour/nuit ainsi que la photopériode sont également ajustables. Les températures peuvent être réglées entre 15 à 30°C. Enfin, il est possible de prendre des photos à l'obscurité grâce à un éclairage par LED vertes qui se met en place uniquement pour la prise de la photo, et qui n'a pas d'incidence sur les photorécepteurs. Le logiciel peut mesurer l'allongement de la racine ou de l'hypocotyle, puis restitue les données dans des tableaux en 1/1000 mm.

La phénobox peut mesurer l'allongement de 10 plantes par boîtes, et possède une capacité de 27 boîtes (3 lignes de 9 boîtes).

L'éclairage de la phénobox est réalisée par des tubes fluorescents (néons), et leur intensité est de 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mesure du PAR (Photosynthetic Active Radiation) entre 400 - 700 nm.

### I.1.4. Culture de plantules sur des milieux spécifiques



#### I.1.4.a. Mesure de la croissance racinaire sur milieux spécifiques

Dans le cadre de l'étude du phénotype des mutants *pg* par rapport au Col-0 sous différents traitements, des jeunes plantules de 4 jours (cultures verticale sur MS ½) ont été transférées en conditions stériles sur des boîtes de MS ½ (à l'aide d'une pince stérile, sans blesser les plantes) supplémentées de différentes solutions : auxine (IAA : indole-3-acetic acid) 15 nM, 30 nM et 60 nM, NPA (1-N-Naphthylphthalamic acid) 1 µM, 5 µM et 10 µM (DMSO 0,1 %), NaCl 50 mM et 150 mM, DMSO 0,1 % (condition témoin du NPA), MS ½ (condition témoin de l'auxine et du NaCl).

Après transfert sur les nouveaux milieux, les plantes ont été prises en photo sur boîte à T0 puis après 3 jours de culture à 21°C en jours longs (T3j). La longueur des racines ont été mesurées sur ImageJ (plugin NeuronJ, <https://imagej.net/NeuronJ>), et la croissance racinaire a été calculée par la différence entre la longueur racinaire à T3j par rapport à T0.

Des graines ont également été semées sur milieux avec ou sans CaCl<sub>2</sub> (0 mM, 1,5 mM, 6 mM, 15 mM). La concentration de 1,5 mM correspond à la concentration du MS ½ classique. Après 3 jours de stratification, les boîtes ont été placées en culture à la verticale pendant 11 jours à 21°C constants en jours longs. Cependant, le milieu sans CaCl<sub>2</sub> était beaucoup moins solide. La rigidité du milieu a tout de même été suffisante pour que les plantules se développent. Après 11 jours de culture, les plantes ont été prises en photo sur boîtes et la longueur des racines a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et du plugin NeuronJ.

#### I.1.4.b. Étude de l'expression des gènes sur milieux spécifiques

Les différentes lignées *GUS* sous le contrôle des promoteurs des gènes *PG* d'intérêt ont été cultivées 8 jours sur boîtes verticales à 21°C en jours longs, puis ont été transférées sur auxine (60 nM, 0,0002 % d'éthanol), NPA (10 µM, DMSO 0,1 %) et sur milieux témoins (éthanol 0,0002 % pour l'auxine et DMSO 0,1 % pour le NPA) délicatement à l'aide d'une pince, en conditions stériles. Puis elles ont été cultivées 3 jours à 21°C en jours longs, avant de réaliser la coloration *GUS*.

### I.2. Culture de bactéries

Deux familles de bactéries ont été utilisées : *Escherichia coli* qui ont été utilisées dans le cadre de la réalisation de clonages, et *Rhizobium radiobacter*, utilisées pour les transformations stables d'*A. thaliana* ou transitoires en feuilles de tabac. Les températures optimales de croissance d'*E. coli* et de *R. radiobacter* sont respectivement de 37 et 28°C.

Le milieu de culture de ces bactéries est le milieu LB (Lysogeny Broth) à pH 7–7,2, composé de 10 g.L<sup>-1</sup> de tryptone, de 5 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, et de 10 g.L<sup>-1</sup> de chlorure de sodium (NaCl). Les bactéries *E. coli* transformées par le vecteur pPICZαB (Invitrogen™, TerhmoFisher™) utilisé dans le cadre de la production de protéines en système hétérologue dans *Pichia pastoris* doivent en revanche être cultivées dans un milieu LB réduit de moitié en NaCl.



Le milieu LB est utilisé en culture liquide, mais peut être utilisé sous forme solide en boîtes de Petri ronde, grâce à l'ajout de 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar avant autoclavage. Les milieux liquides ou solides sont stérilisés par autoclavage (20 min à 120°C), et sont généralement additionnés d'un ou plusieurs antibiotiques de sélection. L'ajout d'antibiotique se fait après l'autoclavage du milieu, une fois que le milieu ait suffisamment refroidi pour pouvoir saisir la bouteille à la main.

Les bactéries sont cultivées en culture liquide dans des tubes de 12 à 50 mL ou en erlen, sous agitation à 200 rpm. Le volume de culture est généralement 10 fois inférieur à la capacité du contenant, afin de permettre une bonne oxygénation de la culture. Les erlens sont fermés par des bouchons stériles ou des films autoadhésifs prévus pour la culture *in vitro* car ils permettent les échanges gazeux tout en protégeant la culture de contaminations. Les tubes de 12 et 50 mL ne sont pas complètement fermés afin de permettre également l'oxygénation de la culture.

Deux types de *R. radiobacter* ont été utilisés : une souche C58C1 (Adler, 1973; Gehl et al., 2009) résistante à la gentamycine (25 µg.mL<sup>-1</sup>) et à la rifampicine (25 µg.mL<sup>-1</sup>), et une souche GV3101 (Holsters et al., 1980) qui possède un plasmide pSOUP, utilisée avec certaines constructions telles que les constructions Greengate (Lampropoulos et al., 2013), qui nécessitent le plasmide pSOUP (Hellens et al., 2000) pour pouvoir se répliquer dans *R. radiobacter*. La souche GV3101 est résistante à la gentamycine (25 µg.mL<sup>-1</sup>) et à la rifampicine (25 µg.mL<sup>-1</sup>), de plus, le plasmide pSOUP confère une résistance à la tétracycline (15 µg.mL<sup>-1</sup>). A ces antibiotiques s'ajoutent ceux spécifiques aux constructions implantées aux bactéries (voir [tableau 11](#) p.72).

### I.3. Culture de levures

Les levures *P. pastoris* (souches X-33) ont été utilisées pour produire des protéines en système hétérologue, grâce au plasmide pPICZα.

#### I.3.1. Culture de *Pichia pastoris*

Les levures *P. pastoris* sont cultivées dans du milieu YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) composé de 1 % (p/v ; poids/volume) d'extrait de levure, 2 % de peptone, et 2 % de glucose (dextrose). Pour un milieu solide, environ 2 % d'agar sont ajoutés. Pour réaliser ce milieu, l'extrait de levure, la peptone et éventuellement l'agar sont dissous dans 900 mL d'eau. Ce mélange est autoclavé 20 min à 200°C, puis 100 mL de glucose stérilisés par filtration sont ajoutés. Le mélange est alors légèrement refroidi, puis la Zéocine™ est ajoutée pour une concentration finale de 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

Après la transformation de levures X-33 par électroporation (voir chapitre II, paragraphe II.8.), les levures transformées sont étalées sur des boîtes YPDS, qui est un milieu YPD supplémenté de 1 M de sorbitol (à incorporer en même temps que l'extrait de levure, la peptone et l'agar, avant autoclavage). Le sorbitol permet de stabiliser les levures devenues sensibles à l'osmolarité à cause de l'électroporation.



### I.3.2. Milieu pour l'expression de protéines recombinantes

Les levures contenant un plasmide pPICZ $\alpha$ , qui est un vecteur d'expression de protéines recombinantes dans *P. pastoris*, sont pré-cultivées dans un milieu BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium), composé de 1 % d'extrait de levures, de 2 % de peptone, de 100 mM de potassium phosphate pH 6,0, de 1,34 % de YNB, de  $4 \cdot 10^{-5}$  % de biotine, et de 1 % de glycérol. Ce milieu est complété par un antibiotique à  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , la Zéocine™. Dans ce milieu, les protéines recombinantes ne sont pas encore exprimées.

Après 24 h de préculture à 29,5°C sous agitation à 270 rpm, la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  (densité optique à  $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) est mesurée, afin de calculer le volume nécessaire pour inoculer la culture d'expression avec une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  finale égale à 1, ce qui correspond à  $5 \cdot 10^7 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$ . La préculture est centrifugée 5 min à 1 400 g, puis les levures sont re-suspendues dans du milieu d'expression BMMY 0,5 % (Buffered Methanol-complex Medium), de même composition que le BMGY à l'exception du glycérol qui est remplacé par 0,5 % de méthanol. Ce milieu permet l'expression du gène intégré dans le plasmide pPICZ $\alpha$ , grâce au promoteur *AOX1* inductible au méthanol (voir chapitre II, paragraphe II.6.1.c.). Du méthanol est apporté chaque jour (0,5 % final) jusqu'à la fin de la culture, qui peut durer entre 3 et 7 jours suivant le temps de production de la protéine désiré.





## Chapitre II : Biologie moléculaire

### II.1. Extractions d'acides nucléiques

#### II.1.1. Extraction d'ADN génomique

##### II.1.1.a. Extraction d'ADNg rapide en tube

L'ADN génomique (ADNg) d'*A. thaliana* est extrait à partir de feuilles fraîches. Celles-ci sont broyées dans un tube 1,5 mL à l'aide d'un pilon en plastique autoclavé, dans 400 µL de tampon d'extraction (NaCl 250 mM, EDTA [Éthylènediaminetétraacétique] 25 mM, Tris HCl [trisaminométhane hydrochloride] pH 7,5 200 mM, SDS [sodium dodecyl sulfate] 0,5 %). Après 1 min de centrifugation à 15 000 g, 300 µL de surnageant sont transférés dans de nouveaux tubes, et sont incubés 30 min à température ambiante avec de l'isopropanol. L'ADN précipité est centrifugé 5 min à 15 000 g. Une fois le surnageant éliminé, les culots d'ADN sont séchés 10 min à 45°C au speed vac. L'ADN est ensuite repris dans 20 à 50 µL d'eau mQ (ultrapure) autoclavée, et est stocké à -20°C.

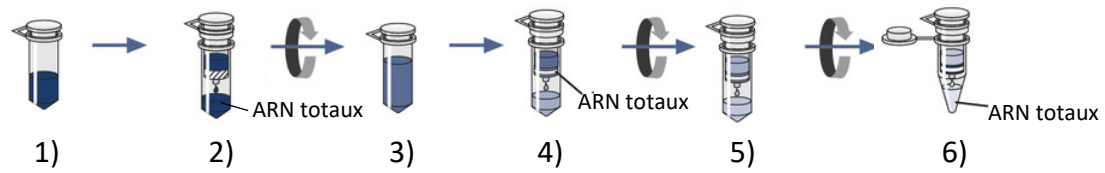
##### II.1.1.b. Extraction d'ADNg en plaque 96 puits

Pour pouvoir extraire l'ADNg de nombreuses plantes en un temps réduit, il est possible de réaliser l'extraction d'ADNg en plaques 96 puits de type « deep well ».

Pour cela, une bille d'acier est placée dans chacun des puits, ainsi que quelques feuilles de rosettes. Il est préférable de maintenir la plaque au froid pendant cette opération (en plaçant la plaque sur de la glace avec un peu d'eau, ou en réalisant cette opération à 4°C). Le portoir est alors plongé dans l'azote liquide (sans les bouchons), et le matériel végétal est lyophilisé sur la nuit.

Le lendemain, les tubes sont fermés avec des capuchons et les feuilles lyophilisées sont broyées à l'aide d'un broyeur à billes (50 sec à 25 de fréquence). Une fois broyées, 300 µL de tampon d'extraction (200 mM de Tris HCl pH 7,5, 250 mM de NaCl, 25 mM d'EDTA, 0,5 % de SDS) sont ajoutés aux échantillons en poudre. Les tubes sont rebouchés et la plaque est agitée manuellement afin d'homogénéiser le contenu des tubes. Après 5 à 10 min d'incubation à 4°C, la plaque est centrifugée à 4 000 g pendant 40 min à 4°C. Après centrifugation, 150 µL de surnageant sont transférés à l'aide d'une pipette multicanaux dans de nouveaux tubes contenant 150 µL d'isopropanol froid (4°C). L'isopropanol permet de précipiter l'ADN. Les tubes sont ensuite rebouchés, agités, et incubés 30 min à 4°C. Puis la plaque est centrifugée à 6 000 g pendant 15 min à 4°C, permettant de former un culot d'ADN précipité. Le surnageant est alors éliminé en retournant les tubes.

Il est ensuite préférable d'effectuer deux lavages des culots d'ADN avec 150 µL d'éthanol 70 %. La plaque est fermée et centrifugée à 6 000 g pendant 15 min à 4°C après chaque lavage. Puis le surnageant est éliminé, et les plaques sont séchées à l'air libre afin d'éliminer totalement l'éthanol.



- 1) Broyat + tampon de lyse RLT.
- 2) Transfert sur la colonne QIAshredder.
- 3) Ajout d'éthanol au liquide collecté dans un nouveau tube.
- 4) Transfert sur la colonne RNeasy Mini spin. Liaison des ARN totaux à la colonne.
- 5) Lavage par les tampons RW1 et RPE.
- 6) Elution avec de l'eau mQ en deux étapes dans un tube propre.

**Figure 36 : Extraction d'ARN totaux avec le kit « RNeasy® Plant mini kit » (QIAGEN®).**

Pour finir, les culots d'ADNg sont resuspendus par pipetage dans 50 µL d'eau mQ autoclavée. Les échantillons peuvent être conservés à 4°C pour de courtes périodes, ou à -20°C pour de plus longues périodes.

### II.1.2. Extraction d'ARN totaux

Deux méthodes d'extraction d'ARN ont été utilisées. La première consiste à utiliser un kit d'extraction, qui est une méthode rapide et efficace pour la plupart des tissus végétaux, mais qui peut parfois être inefficace ou limitée pour certains tissus comme pour les hypocotyles. L'autre méthode est basée sur une extraction des ARN au phénol chaud. Elle est plus longue que la première, mais permet d'extraire plus efficacement les ARN.

#### II.1.2.a. Extraction des ARN avec un kit d'extraction

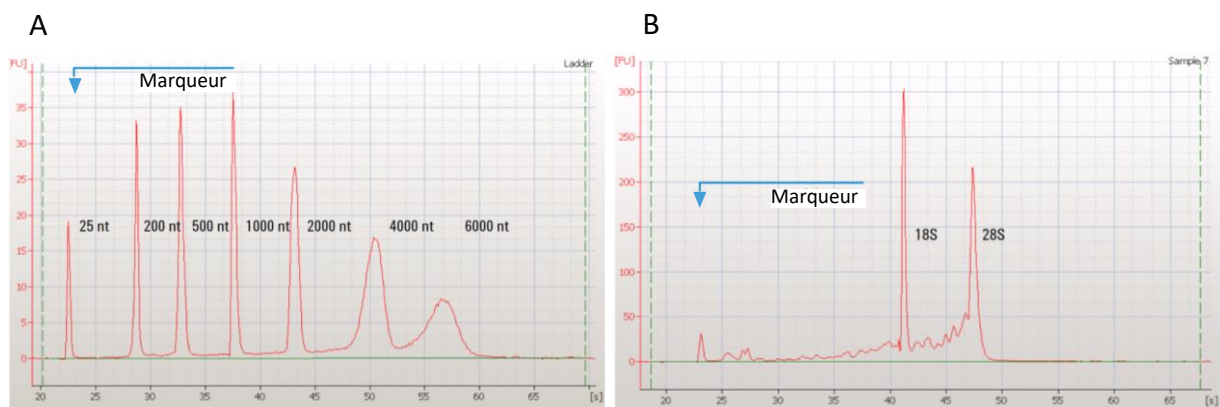
Le kit d'extraction utilisé est le « RNeasy® Plant mini kit » de QIAGEN® ([figure 36](#)). Le tissu végétal (environ 100 mg) est congelé dans de l'azote liquide puis broyé au mortier. La poudre (100 mg) est transférée dans un tube de 1,5 mL froid, et 450 µL de tampon de lyse RLT sont aussitôt ajoutés. Le reste de l'extraction peut se faire à température ambiante, car les tampons QIAGEN permettent la préservation des ARN à température ambiante. Le lysat est transféré sur une première colonne « QIAshredder spin column » permettant de récupérer une solution filtrée débarrassée des débris cellulaires, après centrifugation 2 min à 16 000 g à température ambiante. Le surnageant est transféré dans un tube propre. Après ajout de 0,5 volume d'éthanol, il est ensuite transféré sur une deuxième colonne « RNeasy® Mini spin column », permettant de collecter les ARN. La colonne est lavée par 2 tampons différents : 700 µL de tampon RW1, puis deux lavages avec 500 µL de tampon RPE. À chaque étape, l'ensemble colonne et tube collecteur est centrifugé 15 s à 8 000 g. Enfin, la colonne est placée dans un tube collecteur propre sans ARNase, et les ARN sont élués avec 60 µL à 100 µL d'eau, en deux étapes d'éluion.

#### II.1.2.b. Extraction des ARN au phénol chaud

Les tissus sont également broyés au mortier dans de l'azote liquide. La poudre est transférée dans des tubes de 15 mL en polypropylène contenant 2 mL de tampon TLES (100 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM de LiCl [chlorure de lithium], et 10 mM d'EDTA pH 8 autoclavé. Après stérilisation : ajout de SDS 5 %) ainsi que 200 µL de PEG8000 (polyéthylène glycol) 20 % (+/- 2 % final). Le mélange est ensuite incubé 10 min à température ambiante. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min à 12 000 g à température ambiante, pour culoter les polysaccharides. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et 2 mL de phénol chauffé à 80°C sont ajoutés au surnageant, afin d'extraire les protéines. Après 30 sec de mélange à l'aide d'un vortex, 2 mL de Chloroform:Isoamyl Alcohol (24 :1) sont ajoutés, puis la solution est à nouveau homogénéisée. Les tubes sont centrifugés 10 min à 12 000 g à 4°C, puis la phase aqueuse supérieure est transférée dans de nouveaux tubes. Un volume de LiCl 4 M est ajouté afin de précipiter les ARN sur la nuit à 4°C. Le lendemain, ils sont centrifugés 30 min à 12 000 g à 4°C. Après élimination des surnageants, les culots d'ARN sont resuspendus dans 125 µL d'eau mQ stérilisée. Puis 12,5 µL de sodium acétate 3 M à pH 5,2 ainsi que 250 µL d'éthanol



**Figure 37 : Bioanalyseur « Agilent RNA 6000 Nano Assay » et puce « Nano chip » à ARN.**  
<https://www.biocompare.com/Product-Reviews/40310-Bioanalyzer-2100-RNA-6000-Nano-Kit-From-Agilent-Technologies/>. <http://www.pacificlab.com.au/shop/agilent-genomics-2/5067-1511-rna-6000-nano-kit>.



**Figure 38 : Résultats sous forme d'électrophorégrammes fournis par le bioanalyseur « Agilent RNA 6000 Nano Assay ».** **A)** Echelle « RNA 6000 Nano ladder ». Si l'analyse a fonctionné correctement, l'électrophorégramme doit posséder un pic marqueur, 6 pics d'ARN, les 7 pics doivent avoir une bonne résolution, et l'assignement de leur taille dans l'électrophorégramme doit être correct. **B)** Electrophorégramme obtenu pour un bon échantillon d'ARN. Il doit y figurer un pic marqueur, et les pics d'ARNr 18S et 28S. [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90034\\_RNA6000Nano\\_KG.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90034_RNA6000Nano_KG.pdf)

absolu sont ajoutés pour précipiter les ARN. Après mélange à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés 1 h à -80°C et sont ensuite centrifugés 30 min à 12 000 g à 4°C. Les culots d'ARN sont ensuite lavés dans 500 µL d'éthanol 70 % à 4°C. Après une dernière centrifugation 5 à 10 min à 12 000 g à 4°C, les culots d'ARN sont dissous dans le volume d'eau mQ stérilisée désiré (généralement 22 µL).

### II.1.3. Traitements des ARN extraits

#### II.1.3.a. Traitement à l'ADNase

Après extraction, les ARN sont d'abord quantifiés au spectrophotomètre Nanodrop™ (Thermo Fisher scientific). Leur qualité est également analysée en mesurant les rapports de  $DO_{260/280}$  et  $DO_{260/230}$  qui doivent être compris entre 1,8 et 2,0. Puis les échantillons sont traités par une ADNase, afin d'éliminer l'ADN génomique contaminant. Le kit utilisé est le « TURBO DNA-free™ Kit » (Invitrogen™, Ambion™, Thermo Fisher scientific) et celui-ci a été mis en œuvre selon les recommandations du fournisseur.

#### II.1.3.b. Analyse de la qualité des ARN extraits

Les ARN sont ensuite analysés par le bioanalyseur « Agilent RNA 6000 Nano Assay » (©Agilent technologies ; [figure 37](#)), afin de connaître la qualité et la quantité des ARN extraits, et de vérifier l'absence de contamination par des protéines ou des polysaccharides. Ce bioanalyseur reproduit la migration des ARN sur gel, mais ne requière qu'1 µL d'ARN extrait, et permet d'analyser 12 échantillons par puce.

L'analyse se fait sur des puces à puits dans lequel est infiltré un gel. Les puits sont en réalité reliés par des fins capillaires dans lesquels le gel est infiltré. Cette analyse a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur.

#### *Résultats fournis par le bioanalyseur*

Le bioanalyseur reproduit une migration sur gel. Il fournit donc des images avec la migration de chaque échantillon d'ARN à côté d'une échelle. Pour des échantillons de bonne qualité, on peut voir les bandes ribosomales 18S et 28S, car les ARN ribosomiaux représentent plus de 80 % des ARN totaux. Les résultats sont également fournis sous forme d'électrophorégrammes, où les ARN 18S et 28S sont visibles sous forme de pics ([figure 38](#)). Enfin, le bioanalyseur fournit la concentration d'ARN, le ratio ribosomal, et le nombre d'intégrité des ARN (RIN : RNA Integrity Number). Un échantillon d'ARN intact possède un indice RIN proche de 10. Plus l'indice diminue, plus les ARN sont dégradés. Un RIN équivalent à 5 correspond à des ARN partiellement dégradé, et un RIN égal à 3 indique que les ARN sont totalement dégradés.

#### II.1.3.c. Transcription inverse des ARNs en ADNc

Une fois les ARN débarrassés des contaminations d'ADN et la qualité vérifiée par bioanalyseur, les ARN peuvent être utilisés comme matrice pour produire les ADNc (ADN complémentaire) correspondants.

**Tableau 3 : Composition des mélanges réactionnels de PCR selon la Taq polymérase utilisée.** Le volume de matrice d'ADN dépend de sa concentration, mais la quantité d'ADN ajouté à la réaction est généralement entre 10 pg et 1 µg. <https://international.neb.com/protocols/2012/09/13/protocol-for-taq-5x-master-mix-m0285> ; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F549L> ; [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012036\\_DreamTaqDNAPolymerase\\_500U\\_UG.pdf](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012036_DreamTaqDNAPolymerase_500U_UG.pdf).

Dream Taq Polymerase	Tampon Dream Taq (10 X)	dNTP (10 mM)	Amorce sens (10 µM)	Amorce anti-sens (10 µM)	Matrice d'ADN	Dream Taq Polymerase	Eau mQ autoclavée
	2 µL	0,4 µL	1 µL	1 µL	1 à 2 µL	0,1 µL	Qsp 20 µL
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	Tampon Phusion HF (5 X)	dNTP (10 mM)	Amorce sens (10 µM)	Amorce anti-sens (10 µM)	Matrice d'ADN	Phusion Hot Start II DNA Polymerase	Eau mQ autoclavée
	4 µL	0,4 µL	1 µL	1 µL	1 à 2 µL	0,2 µL	Qsp 20 µL
Taq 5 X Master Mix	/	/	Amorce sens (10 µM)	Amorce anti-sens (10 µM)	Matrice d'ADN	Taq 5X Master Mix	Eau mQ autoclavée
	/	/	0,5 µL	0,5 µL	1 à 2 µL	5 µL	Qsp 25 µL

**Tableau 4 : Cycles PCR suivant la Taq utilisée.** Les étapes en orange sont répétées entre 25 et 40 fois suivant le niveau d'amplification désirée. Les temps et les températures indiqués correspondent à ceux fournis par les fabricants, et peuvent être adaptés en fonction de la séquence des amorces utilisées pour l'amplification. <https://international.neb.com/protocols/2012/09/13/protocol-for-taq-5x-master-mix-m0285> ; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F549L> ; [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012036\\_DreamTaqDNAPolymerase\\_500U\\_UG.pdf](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012036_DreamTaqDNAPolymerase_500U_UG.pdf).

	Dénaturation initiale	1) Dénaturation	2) Hybridation des amorces	3) Elongation	Elongation finale	Fin du cycle
Dream Taq Polymerase	95°C 1- 3 min	95°C 30 sec	Tm-5 30 sec	72°C 1 min	65°C 5-15 min	4-10°C ∞
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	98°C 30 sec	98°C 5-10 sec	Tm 10-30 sec	72°C 15-30 sec/Kb	72°C 5-10 min	4-10°C ∞
Taq 5 X Master Mix	95°C 30 sec	95°C 15 -30 sec	65-68°C 1 min / Kb	/	65-68°C 5 min	4-10°C ∞

La transcription inverse des ARN en ADNc est réalisée grâce au kit « Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit » (Roche, Sigma-Aldrich®, Merck) en suivant les instructions du fournisseur. En général, 4 µg d'ARN totaux ont été utilisés comme matrice pour chaque réaction réalisée.

## II.2. Amplification de l'ADN par PCR

Les séquences d'ADN d'intérêt sont amplifiées par PCR à l'aide d'une ADN polymérase. Au cours de cette thèse, trois *Taq* polymérases (dont le nom vient de *Thermus aquaticus*, qui est la bactérie thermophile à partir de laquelle cette enzyme a été isolée pour la première fois) ont été utilisées. La Phusion™ Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher scientific), qui réplique très fidèlement les séquences, est utilisée pour amplifier des séquences à cloner. La DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher scientific), ainsi que la *Taq* 5 X Master Mix™ (NEB : New England Biolabs®), moins fidèles, sont utilisées pour le génotypage des plantes mutantes, ou pour analyser des clones transformés (par PCR sur colonies).

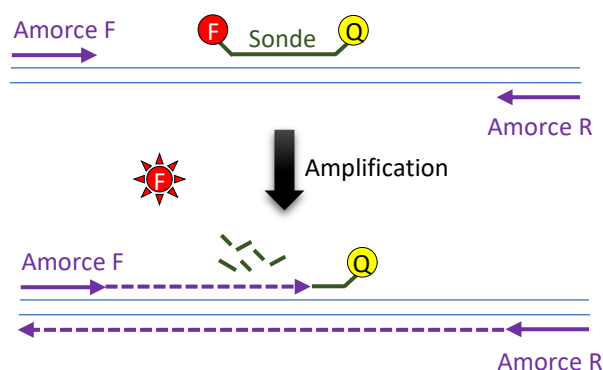
La réaction de PCR comprend des dNTPs (désoxynucléotides tri-phosphate), la *Taq* polymérase, un tampon adapté à la *Taq*, une matrice à amplifier (ADNg ou ADNc), des amorces sens (de 5' vers 3') et anti-sens (de 3' vers 5') d'une vingtaine de nucléotides encadrant la séquence d'intérêt, ainsi que de l'eau mQ autoclavée. La *Taq* 5X Master Mix comprend déjà les dNTPs, la *Taq*, ainsi que le tampon de charge pour l'électrophorèse. Les réactifs et leurs concentrations utilisés pour réaliser les réactions de PCR dépendent des *Taq*. Les mélanges réactionnels de PCR utilisés au cours de cette étude sont énumérés dans le ([tableau 3](#)).

Le volume d'une PCR est généralement de 20 à 50 µL, et elle est effectuée dans des microtubes pour PCR adapté aux thermocycleurs. Le thermocycleur utilisé dans ce projet est le Veriti™ Thermal Cycler de Thermo Fisher scientific. Les cycles sont programmables selon la *Taq* polymérase utilisée ([tableau 4](#)).

Les couples d'amorces utilisés au cours de ce projet ont été élaborés à l'aide du logiciel Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), qui permet de calculer le  $T_m$  (« melting temperatur », ou « température de fusion des amorces »), afin que celui-ci soit identique pour les deux amorces de chaque couple. Il permet également de vérifier que les amorces ne formeront pas de dimères ou de têtes d'épingle, et le pourcentage GC (nucléotides G et C), qui doit être aux alentours de 50 %.

## II.3. Visualisation des acides nucléiques sur gel d'agarose

Les séquences d'ADN amplifiées par PCR (ou autres fragments d'ADN) sont visualisées après électrophorèse. Pour cela, l'ADN est mis à migrer dans un gel d'agarose, composé de 0,7 à 1,2 % (p/v) d'agarose suivant la taille des amplicons et de 0,1 µg.mL<sup>-1</sup> de BET (Bromure d'éthidium), dans du tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 0,5 X. Dans un premier temps, l'agarose et le tampon TAE 0,5 X sont chauffés au micro-onde, et une fois le mélange homogène et suffisamment refroidi pour que la bouteille puisse être tenue à la main, le BET est incorporé. Le gel est alors coulé dans des moules de la taille désirée, avec une barre pour former des



**Figure 39 : Principe de la RT-qPCR en temps réel avec une sonde TaqMan (Thermo Fisher scientific).** A chaque cycle d'amplification, la Taq polymérase dégrade, grâce à son activité exonucléase 5'-3', la sonde TaqMan fixée sur l'ADN, entre les sites de fixation des amorces d'amplification. La dégradation de la sonde permet d'éloigner le fluorophore du quencher, permettant ainsi à la sonde d'émettre de la fluorescence. Amorce F (forward) = amorce sens ; Amorce R (reverse) = amorce anti-sens.

**Tableau 5 : Amorces et sondes FAM pour la réalisation des RT-qPCR avec les sondes TaqMan® (Thermo Fisher scientific).** Amorces et sondes correspondant aux gènes PG d'intérêts, et à 5 gènes de référence : ADENOSINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE (AP1), CLATHERIN (CLA), PEROXIN4 (PEX4), TIP41-like protein (TIP41), ELONGATION FACTOR 1 ALPHA (EF1 $\alpha$ ).

Gène	Sens de l'amorce	Séquence (5' → 3')	Efficacité
<b>AT3G06770 (PG R)</b>	Amorce sens	TTGATCAACGGTAACAAGCTACATGA	2,22
	Amorce anti-sens	CCAAACCAAGCCTTGACCATCT	
	Sonde FAM	ACAGGTGATAATGGAAGTAT	
<b>AT3G15720 (PG RAM)</b>	Amorce sens	GCGATTCCGATAATGCCAAAGAT	2,128
	Amorce anti-sens	ACACCACTTTGCTCACTTCCA	
	Sonde FAM	CTGCCGACGACTTACG	
<b>APT1</b>	Amorce sens	TTGAATGTGCTTGCCTAATTGAGTT	2,16
	Amorce anti-sens	CAAATAGCGACGTCTCTCCTAGTT	
	Sonde FAM	TCTCCTTTCCCTTAAGCTC	
<b>CLA</b>	Amorce sens	GCCACCGATCCAATGGAATT	1,98
	Amorce anti-sens	GAACTCGCAGACCAGATGCT	
	Sonde FAM	TCAGGTGCCAATGTTC	
<b>PEX4</b>	Amorce sens	TGAGCCGGACAGTCCTCTTAA	1,80
	Amorce anti-sens	ACCCTCTCACATCACCAGATCTTA	
	Sonde FAM	CTGCGACTCAGGGAATC	
<b>TIP41</b>	Amorce sens	AAGCTCATGGTTCCTCCTCTTG	2,01
	Amorce anti-sens	GCATTCTCGTCTCTCAATCTCAT	
	Sonde FAM	ACTCTCAGCCAAAATC	
<b>EF1<math>\alpha</math></b>	Amorce sens	GTCAAGCAGATGATTTGCTGTTGTA	1,99
	Amorce anti-sens	CGTACCTAGCCTTGGAGTATTTGG	
	Sonde FAM	CAAGATGGATGCCACCACC	



puits à la taille désirée également. Le gel se solidifie en 30 min environ, et peut éventuellement être conservé dans du tampon TAE 0,5 X pendant 2 jours.

Une fois solidifié, le gel est plongé dans une cuve électrophorèse contenant du tampon TAE 0,5 X. 5 µL de produit PCR sont mélangés à 1 µL de tampon de charge 6 X (30 % de glycérol, 0,25 % de bleu de bromophénol, 0,25 % de xylène cyanol) et sont déposés dans les puits. 5 µL d'un marqueur de taille (« ladder ») sont également déposés dans un puit pour connaître la taille des fragments d'ADN. Il est également possible de déposer davantage de produit PCR dans des puits plus grands, lorsqu'une purification de bande d'ADN est nécessaire après électrophorèse. Dans ce cas, 40 µL de produit PCR sont mélangés à 10 µL de tampon de charge, et sont déposés dans plusieurs puits, afin de purifier le maximum d'ADN.

L'ADN est mis à migrer dans le gel pendant 25 min environ, en appliquant un courant dont le voltage est situé entre 100 à 135 mV. Après électrophorèse, l'ADN est visualisé sous UV grâce au BET.

## II.4. Étude de l'expression des gènes par RT-qPCR

### II.4.1. Principe général d'une RT-qPCR

La RT-qPCR (Real-time polymerase chain reaction) permet de quantifier les ADNc issus des ARNm contenu dans des tissus à un temps T, grâce à des amorces spécifiques. Le principe de la RT-qPCR est de suivre en temps réel des cycles de PCR grâce à un marquage fluorescent. Le marquage fluorescent se fixe soit sur l'ADN double brin (type SYBR<sup>®</sup>, Life Technologies, Thermo Fisher scientific), soit sur des séquences précises (type TaqMan<sup>®</sup>, Beacon Designer<sup>™</sup> & AlleleID<sup>®</sup>). Le suivi de l'amplification de l'ADN permet d'estimer la quantité d'ARNm initialement présente dans ces tissus, en utilisant comme calibre des gènes exprimés de façon constante appelés gènes de références. Dans ce travail, la technologie TaqMan<sup>®</sup> a été mise en œuvre, l'amplification des ADNc par un couple d'amorces classiques donnant systématiquement plusieurs amplicons sur les gènes *PG* étudiés.

### II.4.2. Design des sondes TaqMan<sup>®</sup>

Les séquences codantes des gènes *PG R* et *PG RAM* ont été fournies à un prestataire (Thermo Fisher Scientific) afin de définir les couples d'amorces et une sonde spécifique de ces deux gènes. La sonde possède un fluorophore en 5' (FAM) et un « quencher » non fluorescent à son extrémité 3'. Lors d'une amplification, la sonde est dégradée par l'activité exonucléase de la Taq Polymérase, libérant ainsi le FAM de l'interaction avec le quencher, induisant ainsi un signal fluorescent (**figure 39**). Les séquences de 5 gènes de références (ADENOSINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE (AP1), CLATHERIN (CLA), PEROXIN4 (PEX4), TIP41-like protein (TIP41), ELONGATION FACTOR 1 ALPHA (EF1α), utilisés après validation au laboratoire, ont été fournies à ce même prestataire afin de définir des amorces et sondes spécifiques de ces gènes de références (**tableau 5**). La sonde fluorescente a été systématiquement sélectionnée afin de s'hybrider sur des séquences nucléiques se trouvant de part et d'autre d'une séquence intronique afin d'éviter tout problème d'amplification dû à la présence d'ADN



génomique contaminant. Les amorces et les sondes spécifiques de chaque gène sont fournies sous la forme d'un mélange concentré 20 fois prêt à l'emploi dans une réaction de qPCR.

### II.4.3. Réaction de RT-qPCR

Après synthèse des ADNc à partir de 4 µg d'ARN<sub>total</sub> traités à l'ADNase (voir chapitre II.1.3.), ces ADNc sont dilués 20 fois dans de l'eau mQ stérile. Les réactions de qPCR sont réalisées dans un volume total de 10 µL comprenant 2 µL d'ADNc dilué 20 fois, 0,5 µL du mélange d'amorces/sonde concentré 20 fois, 5 µL de 2 x TaqMan® Gene Expression Reaction Mix (Applied Biosystems) et 2,5 µL d'eau mQ stérile. Les réactions sont placées dans une plaque de PCR à 384 puits et les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur QuantStudio 5 (Applied Biosystems) en suivant le protocole recommandé par le fournisseur, à savoir une période de dénaturation initiale de 20 sec à 95°C, suivie de 40 cycles comprenant successivement 1 sec à 95°C (dénaturation de l'ADN) et 20 sec à 60°C (Hybridation + Extension). Une mesure de fluorescence est réalisée par le thermocycleur pour chaque échantillon à la fin de chaque cycle de PCR.

### II.4.4. Analyse des données de RT-qPCR et mesure de l'expression relative des gènes.

Au cours de la PCR, la quantité de sonde FAM libérée lors de l'amplification augmente et se traduit par une augmentation de la fluorescence. Quand cette fluorescence atteint un certain seuil, elle peut être détectée par le lecteur du thermocycleur. Le cycle de PCR à partir duquel cette fluorescence est détecté est appelé CP (Crossing Point). Cette valeur est indispensable à la quantification de l'ADNc présent initialement dans l'échantillon et permet donc de quantifier l'expression du gène étudié.

L'efficacité des amorces utilisées ([tableau 5](#)) est également indispensable à cette quantification. Elle est déterminée en réalisant une PCR quantitative sur une gamme de dilution d'un ADNc quelconque (dilutions au 1/20 ; 1/40 ; 1/80 ; 1/160 ; 1/320). Chaque dilution est quantifiée 3 fois pour chacune des amorces/sondes de chaque gène étudié (y compris les gènes de référence) en suivant le protocole présenté ci-dessus. À l'issue de l'expérience, le logiciel reporte les moyennes des CP dans un graphique semi-logarithmique en fonction de la dilution en ADNc. La pente (a) de la régression linéaire de ce graphique est utilisée pour calculer l'efficacité :

$$\text{Efficacité } E = 10^{(-1/a)} - 1$$

Par exemple, si  $a = -3,32$ , alors  $E = 1,00$  et  $E + 1 = 2,00$ . On a donc 100 % d'efficacité, c'est-à-dire que l'on double la quantité de molécules d'ADN à chaque cycle.

Seules les amorces qui ont une efficacité supérieure à 80 % ou une valeur de  $(E + 1)$  supérieure à 1,8 sont conservées pour quantifier l'expression des gènes cibles et des gènes de référence dans les échantillons. C'est le cas pour l'ensemble des amorces/sondes TaqMan utilisées dans cette étude.

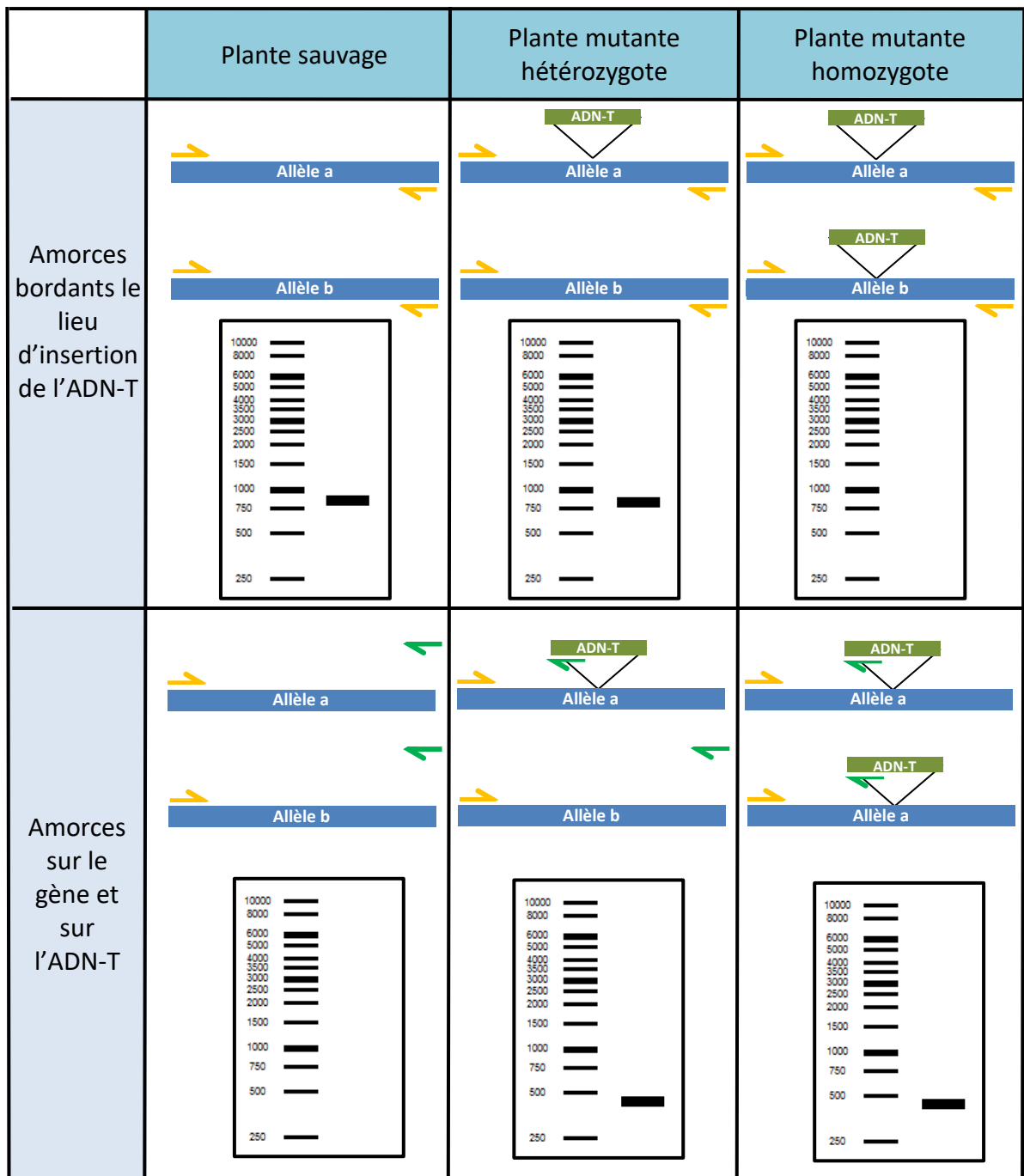


Figure 40 : Schématisation du génotypage des mutants PG K-O, effectué par amplification par PCR.

La quantification des ADNc pour chaque gène est alors réalisée pour chaque échantillon testé en mesurant la valeur du CP obtenue. L'expression du gène est alors déterminée grâce à la formule suivante :

$$[1/(E_c + 1)^{CP}] / [1/(E_r + 1)^{CP}]$$

avec  $E_r$  = Efficacité du gène de référence,  $E_c$  = Efficacité du gène cible (Gutierrez et al., 2008). Toutes les réactions étant réalisées en duplicat, c'est la moyenne des expressions obtenues en utilisant toutes les combinaisons entre les CP d'un gène d'intérêt et d'un gène de référence qui est utilisée comme résultat final, les écarts-type étant calculés sur cette base.

Pour chaque expérience de RT-qPCR réalisée utilisant des échantillons de natures différentes, les deux gènes de référence les plus adaptés (qui varient le moins entre échantillons) parmi les 5 utilisés dans cette étude sont sélectionnés en utilisant le logiciel geNorm (<https://genorm.cmgg.be/> ; Vandesompele et al., 2002).

## II.5. Sélection des mutants Knock-Out par PCR

Les mutants Knock-Out (K-O) de cette étude ont été reçus à l'état hétérozygote (plantes portant l'ADN-T sur un seul brin d'ADN), une sélection de lignées homozygotes a donc été nécessaire.

L'ADN-T GABI-KAT porté par le mutant *pg r* contient un gène de résistance à l'antibiotique spectinomycine, il est donc possible de faire une pré-sélection en semant les graines de *pg r* sur un milieu MS additionné de 7,5 µg.mL<sup>-1</sup> de sulfadiazine. Une vérification par PCR a toutefois été effectuée. L'ADN-T SALK est porteur d'un gène de résistance à la kanamycine, mais cette résistance n'est pas active. L'état des lignées mutantes *pg ram1*, *pg ram2* et *pg ram3* a donc été vérifié uniquement par PCR.

Pour appréhender l'état homozygote ou hétérozygote des lignées, des PCR ont été effectuées suivant la [figure 40](#), en utilisant soit des amorces bordant le lieu d'insertion de l'ADN-T (dont l'information est disponible sur NCBI), soit en combinant une amorce bordant le lieu de l'insertion et une autre située sur l'ADN-T. Ainsi, une amplification avec les amorces sur le gène cible est une indication potentielle de l'absence de l'ADN-T, alors qu'une amplification combinant une amorce sur l'ADN-T et une autre sur le gène indiquerait la présence de l'ADN-T. Les amorces utilisées pour cette sélection sont listées dans le tableau de [l'annexe 1](#).

Ces PCR de sélection ont été réalisées sur 2 à 3 générations de mutants K-O à partir de l'ADNg extrait de feuilles, en plaques de 96 tubes ou individuellement.

L'absence de transcription des gènes rendus silencieux a ensuite été vérifiée par RT-qPCR semi-quantitative ou quantitative.

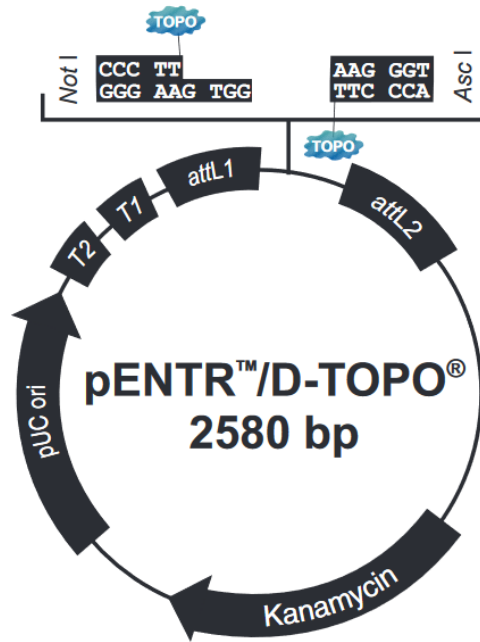


Figure 41 : Cartographie du plasmide pENTR™ Directional TOPO® (Invitrogen™, Life Technologies™, Thermo Fisher scientific). [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pentr\\_dtoto\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pentr_dtoto_man.pdf)

Tableau 6 : Amorces permettant de cloner les promoteurs et les séquences codantes des gènes d'intérêts dans le vecteur d'entrée pENTR™ D TOPO®. Les amorces sens comportent les nucléotides CACC en amont pour pouvoir liguer les amplicons dans le vecteur d'entrée pENTR™ D TOPO®.

Gène	Partie amplifiée	Sens de l'amorce	Séquence (5'→3')	Tm (°C)	Taille de l'amplicon
<b>AT3G06770</b> (PG R)	Promoteur	sens	CACCTCGATCAAGTTCATCCAATGAG	59	1518 pb
		Anti-sens	CGAAGCTGTCGGATAATTAAGA	59	
	Peptide signal + CDS	sens	CACCGTCTGGTTACATTTGGCGCG	61	1498 pb
		Anti-sens	TTGAATCCTATCAAAGAATCCAAG	61	
<b>AT3G15720</b> (PG RAM)	Promoteur	sens	CACCGGTGCACCTATTGATATTGTC	58	1503 pb
		Anti-sens	CGAAGGCTTTACTACACTAG	56	
	Peptide signal + CDS + signal ancre GPI	sens	CACCATGAAGAAGAAGACTTGGTTC	55	1382 pb
		Anti-sens	ATATATGTAACCTATCTAGCTAAA	55	
<b>AT3G48950</b>	Promoteur	sens	CACCTTATAATCCGCGACATACC	54	1412 pb
		Anti-sens	GATCTTCTATAGTTTTGATAAC	53	
	Peptide signal + CDS + signal ancre GPI	sens	CACCGATGATTAGACCAACGTTTGG	58	1424 pb
		Anti-sens	TCATATACTACGTCAAAGAAAG	58	
<b>AT1G60390</b>	Promoteur	sens	CACCGTCCAATTAGAAGGAGAAGTGT	58	1657 pb
		Anti-sens	GTCTATCGAGACTTCACTATGA	58	
	Peptide signal + CDS + signal ancre GPI	sens	CACCGACTCTCTTTCATGAAATCATAG	60	2221 pb
		Anti-sens	CCAAGAAACAGAGGAAGTAGAG	60	

## II.6. Clonages

### II.6.1. Réalisation des ligations de différents types de clonage

Cloner une séquence d'intérêt consiste à intégrer cette séquence dans un vecteur (ou plasmide) désiré par ligation, puis à faire pénétrer cette construction dans une bactérie (*E. coli* ou *R. radiobacter* dans le cadre de ces travaux de thèse) apte à le multiplier. La sélection par antibiotique (entre autres) permet de sélectionner les colonies ayant intégré le plasmide. Une colonie, ou un clone, est obtenue à partir d'une seule bactérie ayant intégré le plasmide qui s'y est multiplié.

Il existe de nombreux vecteurs de clonage, qui peuvent nécessiter différentes méthodes de ligation, afin d'y insérer une séquence d'ADN d'intérêt.

#### II.6.1.a. Clonage en vecteur d'entrée pENTR™ Directional TOPO®

Le premier vecteur utilisé au cours de ces travaux de thèse est le vecteur pENTR™ Directional TOPO® ([figure 41](#) ; Invitrogen™, Life Technologies™, Thermo Fisher scientific), qui a servi à la fois comme vecteur d'entrée pour le système Gateway®, mais également comme matrice pour réamplifier par PCR les séquences d'intérêt, nécessaire pour les autres types de clonage.

##### *Principe du clonage dans le vecteur pENTR™ D TOPO®*

Les amorces utilisées pour réaliser les clonages dans le vecteur pENTR™ D TOPO®, regroupées dans le [tableau 6](#), comportent la séquence nucléotidique « CACC » en amont des amorces sens (5'→3'). Cette séquence permet de faire une ligation orientée entre le produit de PCR et le vecteur, comportant la séquence complémentaire « GTGG ».

Cette recombinaison est réalisée par la topoisomérase I (provenant du virus Vaccinia), capable de se lier à de l'ADN double brin au site « CCCTT ». Cette séquence est présente sur le vecteur, en bordure 5' du lieu d'insertion de l'insert. La topoisomérase I clive la liaison phosphodiester sur un brin du vecteur, et l'énergie provenant de ce clivage est conservée pour former une liaison covalente entre le phosphate 3' du brin clivé et un résidu tyrosyle (Tyr-274) de la topoisomérase I. La liaison phospho-tyrosyle entre l'ADN et l'enzyme peut ensuite être rompue par l'hydroxyle en 5' du brin original clivé, ce qui permet d'inverser la réaction et de libérer la topoisomérase.

Le vecteur TOPO® exploite cette réaction pour réaliser la liaison entre le produit PCR et le vecteur. Le vecteur est doté d'une séquence GTGG 5' sortante complémentaire à la séquence « CACC » situé en 5' du produit PCR. La séquence 5' sortante « GTGG » vient se compléter au produit PCR, et stabilise ainsi le produit PCR dans l'orientation correcte désirée ([figure 42](#)).

##### *Amplification et purification des séquences à cloner*

La première étape consiste à amplifier la matrice d'ADN (ADNg pour les promoteurs et ADNc pour les séquences codant des protéines) avec les amorces spécifiques à la séquence à

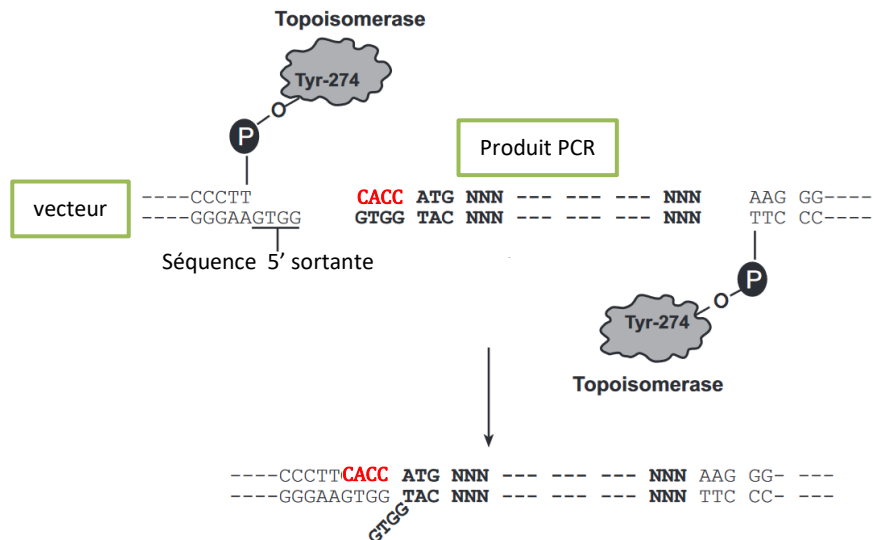


Figure 43 : Principe de ligation d'un produit PCR avec une séquence CACC au vecteur pENTR™ D TOPO®. La séquence 5' sortante du vecteur se lie à la séquence complémentaire du produit PCR, déplaçant le brin inférieur du produit PCR, grâce à la Topoisomerase. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pentr\\_dtopo\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pentr_dtopo_man.pdf)

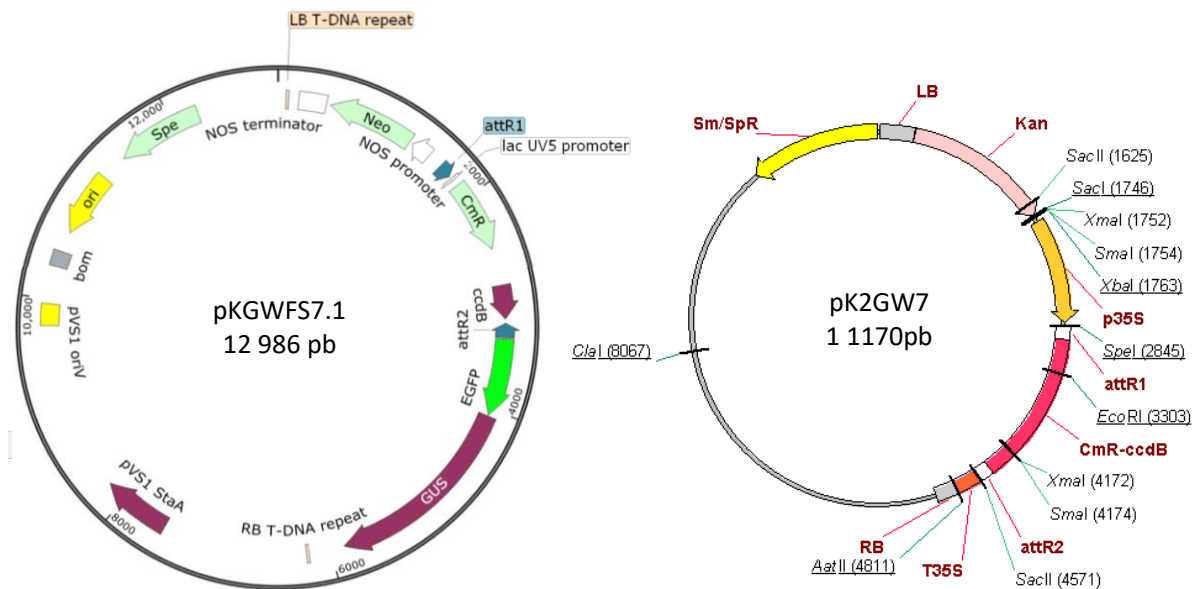


Figure 42 : Cartes des plasmides pKGWFS7.1 et pK2GW7. <https://www.lifescience-market.com/p/pkgwfs71-p-108572.html>, <http://psbweb03.psb.ugent.be/~manka/pK2GW7map.html>.



amplifier, comportant la séquence « CACC » en amont de la séquence sens. Pour les promoteurs, les séquences correspondent aux séquences de 1,5 Kb situées en amont de l'ATG (codon d'initiation de la transcription). L'amplification est réalisée avec la Taq Phusion™ utilisée pour les clonages.

Une fois les produits PCR amplifiés en assez grande quantité (généralement 2 x 50 µL de produit PCR), ils sont mis à migrer sur gel d'agarose par électrophorèse, puis des bandes de gel contenant l'ADN amplifié sont découpées, et l'ADN est purifié grâce au kit « Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega) en suivant les instructions du fournisseur.

### *Ligation entre le vecteur et l'insert*

Pour effectuer la ligation entre le produit de PCR purifié et le vecteur, l'ADN purifié est dosé au spectrophotomètre Nanodrop™ (Thermo Fisher scientific). Puis la ligation est effectuée. La quantité de produit PCR est calculé suivant la relation suivante :

$$\frac{\text{ng de vecteur} \times \text{Kb d'insert}}{\text{Kb de vecteur}} \times \frac{\text{insert}}{\text{vecteur}}$$

Sachant que le vecteur est à 15 – 20 ng/µL et qu'il mesure 2,6 Kb. Suivant le clonage, plusieurs ratio insert/vecteur peuvent être testés. Le protocole fourni par Invitrogen™ concernant le vecteur pENTR™ D TOPO® recommande un ratio entre 0,5/1 et 2/1. L'efficacité du clonage diminue de façon importante pour un ratio inférieur à 0,1/1 et supérieur à 5/1.

La réaction de ligation comporte 1 µL de vecteur pENTR™ D TOPO®, entre 0,5 et 4 µL de produit de PCR purifié suivant sa concentration, 1 µL de solution saline provenant du kit (dans le cas d'une transformation de bactérie chimiquement compétentes), et le volume est ajusté à 6 µL par de l'eau mQ autoclavée.

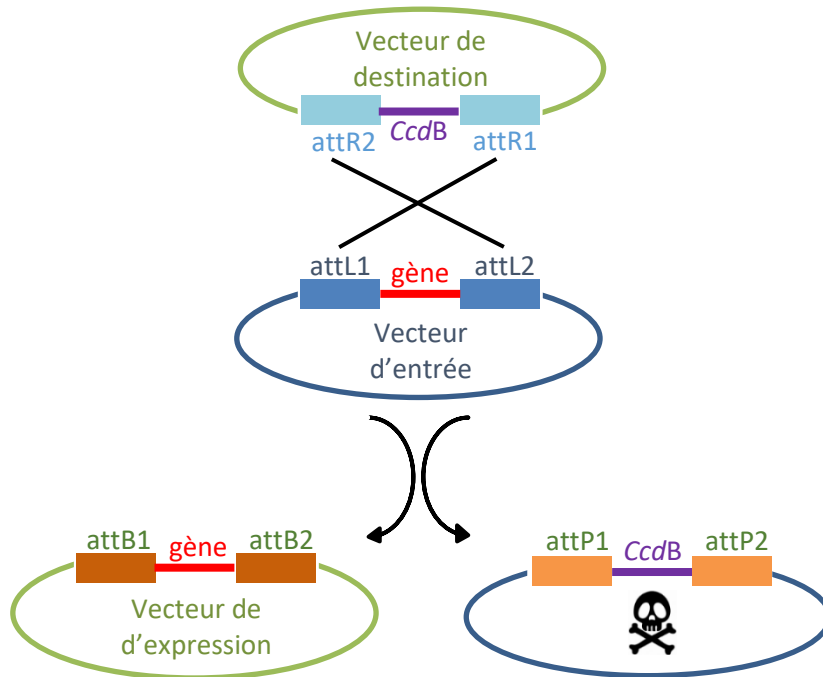
Le protocole préconise une ligation 5 min à température ambiante, mais par expérience au sein du laboratoire, la ligation est plus efficace si elle est réalisée à 4°C sur la nuit. Puis le produit de ligation est transféré dans des bactéries chimiquement compétentes (voir paragraphe II.6.2).

### II.6.1.b. Clonage en Gateway

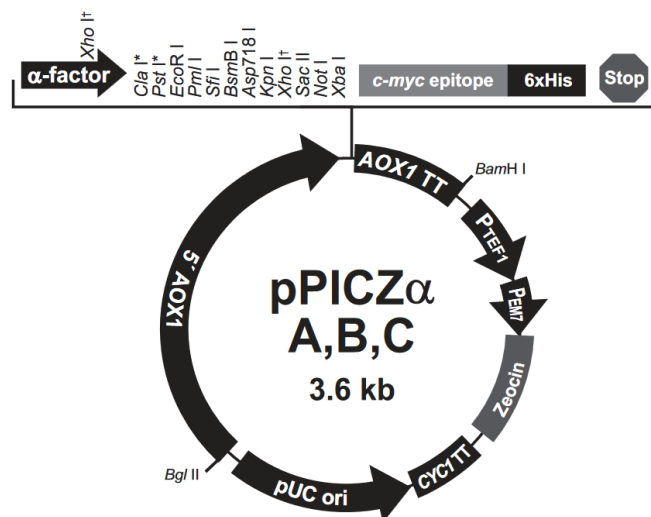
#### *Principe de la recombinaison Gateway™*

Il existe différents types de clonage Gateway™. Celui utilisé lors de cette étude est le système « Gateway™ LR Clonase™ II » (Invitrogen™, Thermo Fisher scientific), qui a permis de recombiner les promoteurs des gènes *PG* sélectionnés avec le vecteur pKGWFS7, porteur du gène *EGFP* et du gène codant la β-glucuronidase (*GUS*). Ce vecteur permet donc de connaître la localisation de l'activation des promoteurs natifs des gènes d'intérêt. De plus, le vecteur pK2GW7 a été utilisé pour sur-exprimer le gène *PG RAM* grâce au promoteur *35S*. Les cartes de ces deux vecteurs sont regroupées dans la [figure 43](#).

La recombinaison a lieu grâce aux protéines de recombinaison du bactériophage lambda : une intégrase et une excisionase, ainsi qu'à la présence d'une protéine codée par *E. coli*



**Figure 45 : Principe de la recombinaison Gateway.** Les séquences attR1 et attR2 du vecteur de destination (qui encadrent le gène codant la protéine létale CcdB) sont recombinées par des intégrases et excisionases du bactériophage lambda avec les séquences attL1 et attL2 du vecteur d'entrée dans lequel la séquence d'intérêt a été intégrée préalablement. Le vecteur de destination devient alors le vecteur d'expression et comporte le gène d'intérêt. Le vecteur d'entrée acquiert la séquence CcdB du vecteur de destination et les bactéries qui héritent de ce plasmide meurent.



**Figure 44 : Carte des vecteurs pPICZα A, pPICZα B et pPICZα C (Invitrogen™, TermoFisher™).** Pst I est présent sur pPICZα B uniquement, et Cla I sur pPICZα C uniquement.

permettant l'intégration de la séquence : la « Integration Host Factor (IHF) ». Les sites spécifiques de recombinaison sont les sites attL1 et attL2 présents sur le vecteur pENTR D TOPO, et attR1 ainsi que attR2 présents dans les vecteurs de destination (**figure 44**).

Le vecteur de destination comporte une séquence « *ccdB* » codant la toxine CcdB qui inhibe la multiplication d'*E. coli*, en agissant sur l'ADN gyrase, nécessaire à la réplication de l'ADN circulaire. Le vecteur de destination comporte un gène de résistance à cet antibiotique, mais pas le vecteur d'entrée. Par conséquent, les bactéries recevant un vecteur d'entrée conjugué à la séquence *ccdB* ne se multiplieront pas.

### *Recombinaison entre vecteur d'entrée et de destination*

Le vecteur d'entrée est le vecteur pENTR™ D TOPO® décrit précédemment (paragraphe II.6.1.a.).

Pour réaliser la recombinaison entre un plasmide pENTR™ et un vecteur de destination Gateway™, 1 à 7 µL de clone d'entrée (50 - 150 ng) est mélangé avec 1 µL de vecteur de destination (150 ng). Le volume est ajusté à 8 µL avec de l'eau mQ stérilisée, ou avec du tampon TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) à pH 8. Puis l'enzyme « LR Clonase II 5 X » est décongelée 2 min sur glace, et 2 µL sont ajoutés à la réaction. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex puis centrifugé brièvement, avant d'être incubé 1 h à 25°C au bain-marie. Pour stopper la réaction, 1 µL de solution « Protéinase K » est ajouté, le mélange est homogénéisé brièvement, puis incubé 10 min à 37°C au bain-marie.

L'étape suivante est l'étape de transformation (voir paragraphe II.6.2.).

### II.6.1.c. Clonage en vecteur d'expression hétérologue dans *Pichia pastoris*

#### *Vecteur d'expression pPICZα*

Le vecteur choisi pour exprimer des protéines en système hétérologue dans la levure *P. pastoris* est le vecteur pPICZα (Invitrogen™, Life Technologies™, Thermo Fisher scientific). Trois vecteurs sont disponibles : pPICZα A, pPICZα B, pPICZα C (**figure 45**). La différence entre ces vecteurs est le cadre de lecture, qui s'adapte à toutes les séquences. Mais il est également possible d'utiliser un seul vecteur pour toute construction, et d'ajuster le cadre de lecture en créant les amorces d'amplification avec un ou deux nucléotides en plus. Le vecteur utilisé dans cette étude est le vecteur pPICZα B.

Les vecteurs pPICZα offrent plusieurs avantages. L'expression de la protéine est sous le contrôle d'un promoteur inductible au méthanol, ce qui permet d'ajuster le taux d'expression de la protéine. De plus la séquence « α-factor » permet de sécréter les protéines dans le milieu de culture, ce qui facilite sa purification. Enfin les protéines sont fusionnées en C-terminal à des séquences (ou « tag ») polyhistidine (6 x His) et c-myc, qui permettent de purifier les protéines sur colonnes de nickel (tag His), et de les détecter par immunomarquage (avec des anticorps anti-His et anti-myc). Mais il est également possible de ne pas les fusionner à la protéine, en décalant le cadre de lecture après la séquence de la protéine.

**Tableau 7 : Amorces permettant le clonage des séquences codantes des PG d'intérêt dans le vecteur pPICZα B.** Les nucléotides en italique sont nécessaires à l'activité des enzymes de restriction. Les nucléotides en rouge correspondent aux sites de reconnaissance des enzymes de restriction. Les nucléotides en italique en gras correspondent aux nucléotides ajoutés afin que la séquence soit dans le bon cadre de lecture par rapport à l'ATG.

Nom du Gène concerné	Sens de l'amorce amorce	Sites de restriction	Séquence (5'→3')	Tm (°C)	Taille de l'amplicon
<b>AT3G06770</b> <b>(PG R)</b>	sens	<b>EcoR I</b>	<i>TGTCTG</i> <b>GAATTC</b> <b>AC</b> AACGTTACGGCGCCGG	60	1310 pb
	Anti-sens	<b>Xba I</b>	<i>GTCTGTG</i> <b>TCTAGA</b> <b>AA</b> GACTGCAGCTCTACCGTAAG		
<b>AT3G15720</b> <b>(PG RAM)</b>	sens	<b>EcoR I</b>	<i>TGTCTG</i> <b>GAATTC</b> <b>AC</b> TTGGATGTTACTCAATTCGGAG	58	1247 pb
	Anti-sens	<b>Not I</b>	<i>GTCTGTG</i> <b>GCGGCCGC</b> TTGAAAAACCCATATTGGATCTTG		

### *Principe du clonage dans pPICZα*

L'intégration de la séquence codant une protéine dans le vecteur se fait par digestion enzymatique. En amont et en aval du site d'insertion de la séquence d'intérêt se trouve de nombreux sites de restrictions enzymatique, disponibles dans le manuel du vecteur (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V19520>). Un site de restriction différent est choisi en 5' et en 3' de l'insert. Bien sûr, la vérification de l'absence de ces sites de restriction sur la séquence d'intérêt doit être effectuée. Les sites de restrictions choisis sont intégrés en 5' et en 3' de la séquence d'intérêt grâce aux amorces. Les amorces utilisées dans le cadre de cette thèse pour cloner des séquences *PG* dans le vecteur pPICZα B figurent dans le [tableau 7](#).

### *Ligation entre le vecteur pPICZα et les séquences codant des protéines*

Avant ligation, le vecteur et les séquences doivent être préparés, c'est-à-dire digérés par les enzymes de restriction choisies.

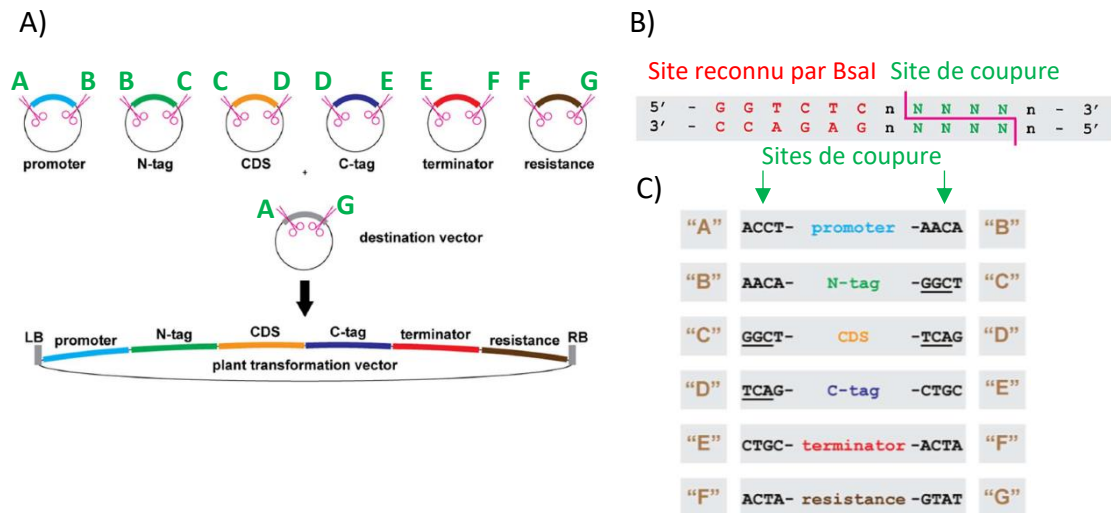
Les séquences protéiques doivent être amplifiées à partir d'ADNc (ou à partir de clones pENTR™ D TOPO® séquencés) avec les amorces possédant des sites de restrictions aux enzymes voulus, avec la Taq Phusion™. Il est préférable d'amplifier de grandes quantités d'ADN (2 x 50 µL par construction, puis de les regrouper et de les concentrer à l'aide d'un speedvac), et de grande quantité de vecteur pPICZα (30 mL de culture LB liquide, 25 µg.mL<sup>-1</sup> de Zéocine™). Le vecteur est extrait des bactéries par 5 minipreps ou une midiprep (voir paragraphe II.6.4.).

Le vecteur et les produits PCR sont digérés par les enzymes de restriction, soit ensemble ou séparément. Pour cela, 40µL de vecteur (100ng) ou 40µL d'insert sont mélangés à 6 µL d'enzyme (3µL de chaque si 2 différentes), et à 5µL de tampon 10 X de l'enzyme. La digestion se fait pendant 1 h 20 à la température optimale de la ou des enzymes. Si les deux enzymes ne sont pas compatibles pour agir en même temps, il faut les faire agir l'une après l'autre, en purifiant l'ADN sur colonne entre les deux digestions (voir « Amplification et purification des séquences à cloner » sous partie du paragraphe II.6.1.a.).

Les produits digérés sont ensuite déposés sur gel, et sont séparés par électrophorèse. Les bandes sont ensuite découpées, et l'ADN est purifié (voir également le paragraphe « Amplification et purification des séquences à cloner »). Puis la ligation est réalisée selon l'équation :

$$\frac{100 \text{ ng vecteur} \times \text{Kb d'insert}}{3 \text{ Kb de vecteur}} \times \frac{3}{1} = X \text{ ng d'insert pour } 100\text{ng de vecteur}$$

En comptant 100 ng de vecteur de 3 Kb, et avec un ratio insert/vecteur de 3/1. La ligation se fait dans un maximum de 20 µL. 100 ng de vecteur sont donc mélangés à la quantité variable d'insert, 1 µL de « T4 DNA ligase », 2 µL de tampon de la ligase 5 X, et le volume est ajusté entre 15 et 20 µL avec de l'eau mQ stérilisée. La réaction de ligation est incubée une nuit à 4°C



**Figure 46 : Principe de l'assemblage des 6 modules Greengate grâce à Bsa I.** **A)** L'enzyme Bsa I découpe de part et d'autre des inserts contenus dans les 6 vecteurs d'entrée ainsi que dans le vecteur de destination, de façon à ce que chaque insert se retrouve dans l'ordre dans le vecteur de destination. **B)** Site reconnu par l'enzyme Bsa I, et site de coupure, quelques nucléotides plus loin, dont la séquence n'a pas d'importance pour l'enzyme. **C)** Sites de coupures qui permettent l'assemblage deux à deux des inserts dans le vecteur de destination. Ces sites sont à intégrer dans les amorces des séquences à cloner. D'après Lampropoulos et al. (2013).

**Tableau 8 : Amorces pour réaliser différents clonages Greengate.**

Séquence clonée	Vecteur d'entrée	Sens de l'amorce	Séquence (5'→3')	Tm (°C)	Taille de l'amplicon
Promoteur PG R	pGGA000	sens	TATCTGGTCTC T ACCT TCGATCAAGTTCATCCAAATGAG	59	1 518 pb
		Anti-sens	GATCTGGTCTC A TGTT CGAAGCTGTCGGATAATTAAGA	59	
Promoteur PG RAM	pGGA000	sens	GATCTGGTCTC T ACCT GGTGCACCTATTGATATTGTC	58	1 503 pb
		Anti-sens	GATCTGGTCTC A TGTT CGAAGGCTTTACTACTACTAG	56	
PS + CDS PG R	pGGB000	sens	AACAGGTCTC T AACA ATG TCA GTG GTA ACA ATC TTG A	56	1 368 pb
		Anti-sens	AACTGGTCTC A AGCC GAC TGC AGC TCT ACC GTA A	58	
PS + CDS PG R	pGGC000	sens	ATCAGGTCTC A GGCT ATG TCA GTG GTA ACA ATC TTG A	56	1 371 pb
		Anti-sens	AACTGGTCTC A CTGA CTA GAC TGC AGC TCT ACC GTA A	58	
PS + CDS PG RAM	pGGB000	sens	GATCGGTCTC T AACA ATG AAG AAG AAG ACT TGG TTC	55	1 371 pb
		Anti-sens	AACTGGTCTC A AGCC TTG AAA AAC CCA TAT TGG ATC TT	56	
PS PG RAM	pGGB000	sens	= amorce sens « PS+CDS AT3G15720 »	55	99 pb
		Anti-sens	AACTGGTCTC A AGCC TGC ATT CGA AGA TGT GAA GAT	55	
CDS + GPI PG RAM	pGGD000	sens	ATCAGGTCTC T TCAG tc TTG GAT GTT ACT CAA TTC GGA	55	1 334 pb
		Anti-sens	AACTGGTCTC T GCAG CTA TCT AGC TAA AAT ATA TGT AAC	55	
GPI PG RAM	pGGD000	sens	ATCAGGTCTC A TCAG tc AGC AGA GGG AAA CAA CTT AG	56	116 pb
		Anti-sens	= amorce anti-sens « CDS+GPI PG RAM »	55	
eYFP (du vecteur pGWB440)	pGGC000	sens	ATCAGGTCTC A GGCT tc GTG AGC AAG GGC GAG GAG	61	749 pb
		Anti-sens	AACTGGTCTC T CTGA AGC CTT GTA CAG CTC GTC	61	

(suivant la T4 DNA ligase, il est possible d'incuber 2 h à température ambiante ou une nuit à 16°C).

La transformation se fait dans les mêmes conditions que les autres clonages (paragraphe II.6.2.), hormis que les cultures transformées sont étalées sur des boîtes de LB réduit de moitié en sel.

#### II.6.1.d. Clonage Greengate

##### *Principe du clonage Greengate*

Le système Greengate (addgene ; Lampropoulos et al., 2013), dérivé du Goldengate, est un outil efficace pour réaliser une multitude de clonage de constructions complexes de manière simplifiée, destiné à la transformation de plante.

Le principe de ce clonage est d'assembler dans l'ordre 6 modules, en une seule étape et à l'aide d'une seule enzyme de restriction : Bsa I HF (High Fidelity). Ces 6 modules, notés de A à F, sont des séquences insérées dans des vecteurs d'entrée. Ces 6 inserts sont : 1) un promoteur, 2) un N-tag, 3) une séquence codante, 4) un C-tag, 5) un terminateur et 6) une cassette de résistance à un antibiotique ([figure 46 A](#)). Il est également possible de n'assembler que 5 ou 4 sections codantes, en utilisant des vecteurs spécifiques avec de petites séquences « vides » à la place des vecteurs B et D. De nombreux vecteurs d'entrée sont disponibles, mais il est également possible de réaliser 6 vecteurs d'entrée personnels grâce à des vecteurs d'entrées vides, ce qui offre une multitude de possibilités. Enfin, il est possible d'assembler deux vecteurs de destination, voir plus, en un « super vecteur ».

Ces assemblages de séquences sont possibles grâce à l'enzyme Bsa I qui reconnaît une séquence spécifique « GGTCTC » mais découpe l'ADN quelques nucléotides plus loin, dont la séquence n'est pas importante pour l'enzyme ([figure 46 B](#)). Les vecteurs sont conçus pour que les séquences découpées par l'enzyme permettent l'assemblage deux à deux des inserts de chaque vecteur d'entrée ([figure 46 C](#)).

Les amorces doivent contenir la séquence 5'-AACAGGTCTC-A-NNNN nn-3' en amont de l'amorce sens, où NNN correspondent au cadre de lecture, AACA sont des nucléotides qui facilitent l'accrochage de l'enzyme sur sa séquence spécifique, et nn correspondent aux nucléotides à ajouter pour être en phase avec le cadre de lecture. La séquence 5'-AACAGGTCTC-A-NNNN-3' doit être ajoutée en amont de la séquence anti-sens. Les amorces utilisées dans cette étude sont fournies dans le [tableau 8](#).

##### *Réalisation des clonages Greengate*

###### ➤ *Création des vecteurs d'entrée*

Les vecteurs d'entrée désirés, ainsi que les produits PCR amplifiés avec les amorces spécifiques au clonage Greengate sont digérés avec l'enzyme Bsa I HF : 20 µL de vecteur d'entrée (environ 100 ng/µL) sont mélangés avec 2 µL de Bsa I HF, 5 µL de tampon « cutsmart » 10 X, et le volume est ajusté à 50 µL par de l'eau mQ stérilisée. De même, le produit PCR purifié

**Tableau 9 : Programmes possibles de la réaction Greengate finale au thermocycleur (Lampropoulos et al., 2013).**

30 cycles	2 min	37°C	50 cycles	5 min	37°C
	2 min	16°C		5 min	16°C
1 x	2 min	50°C	1 x	5 min	50°C
1 x	2 min	80°C	1 x	5 min	80°C

**Tableau 10 : Constructions Greengate réalisées durant la thèse. Prom : promoteur ; PS : peptide signal ; CDS : séquence codante d'ADN (coding DNA sequence) ; Dummy : séquence factice ; pNOS:KanR:tNOS : cassette de résistance à la kanamycine ; pMAS:Sulfr:t35S : cassette de résistance à la sulfadiazine ; BG : bordure gauche ; BD : bordure droite.**

	Module 1	Module 2	Module 3	Module 4	Module 5	Module 6	Vecteur de destination
<b>promPG R:: GFP-NLS</b>	PromPG R	B-Dummy	GFP-NLS	D-Dummy	RBCS terminator	pNOS:KanR:tNOS	Résistance de plante en BG
<b>promPG RAM:: GFP-NLS</b>	PromPG RAM	B-Dummy	GFP-NLS	D-Dummy	RBCS terminator	pNOS:KanR:tNOS	Résistance de plante en BG
<b>promPG R:: PG R-eYFP</b>	PromPG R	PS + CDS PG R	eYFP	D-Dummy	RBCS terminator	pNOS:KanR:tNOS	Résistance de plante en BG
<b>promPG RAM:: eYFP-PG RAM (PL)</b>	PromPG RAM	PS PG RAM	eYFP	CDS + GPI RAM	RBCS terminator	pNOS:KanR:tNOS	Résistance de plante en BG
	PromPG RAM	PS PG RAM	eYFP	CDS + GPI RAM	RBCS terminator	pMAS:Sulfr:t35S	Résistance de plante en BD
<b>35S:: PG R-eYFP</b>	35S	PS + CDS PG R	eYFP	D-Dummy	RBCS terminator	pNOS:KanR:tNOS	Résistance de plante en BG
<b>35S:: eYFP-PG RAM (PL)</b>	35S	PS PG RAM	eYFP	CDS + GPI RAM	RBCS terminator	pNOS:KanR:tNOS	Résistance de plante en BG
	35S	PS PG RAM	eYFP	CDS + GPI RAM	RBCS terminator	pMAS:Sulfr:t35S	Résistance de plante en BD
<b>35S:: eYFP-PG RAM (T)</b>	35S	PS + CDS PG RAM	eYFP	D-Dummy	RBCS terminator	pMAS:Sulfr:t35S	Résistance de plante en BD
<b>35S:: eYFP-PG AT3G48950 (PL)</b>	35S	PS PG AT3G48950	eYFP	CDS + GPI PG AT3G48950	RBCS terminator	pNOS:KanR:tNOS	Résistance de plante en BG
<b>s35S:: PG R</b>	35S	B-Dummy	PS + CDS R	D-Dummy	RBCS terminator	pNOS:KanR:tNOS	Résistance de plante en BG



(2 x 50 µL de produit PCR purifié et concentré au speed vac) est mélangé à 1 à 2 µL de Bsa I, 5 µL de tampon cutsmart 10 X, et le volume est ajusté à 50 µL avec de l'eau mQ stérilisée. La digestion est réalisée pendant 1 h à 37°C.

Un volume de 10 µL de tampon de charge 6 X est ajouté aux produits digérés, qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel. Les bandes d'ADN sont ensuite découpées et purifiées (voir paragraphe II.6.1.a.). L'élution de la purification se fait avec 2 x 35 µL d'eau mQ stérilisée, puis les digestions sont concentrées au speed vac 15 min à 45°C. Les concentrations en ADN sont mesurées par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop™ (Thermo Fisher scientific). Puis la ligation est réalisée en calculant la quantité d'insert à mettre dans la réaction par rapport à la relation suivante :

$$\frac{100 \text{ ng vecteur} \times \text{Kb d'insert}}{\text{Kb de vecteur}} \times \frac{3}{1} = X \text{ ng d'insert pour } 100 \text{ ng de vecteur}$$

La ligation est donc réalisée avec 100 ng de vecteur d'entrée, l'insert, 1 µL de T4 DNA ligase, 2 µL du tampon de la ligase 5 X, et le volume est ajusté à 10 µL par de l'eau mQ stérilisée. La réaction est réalisée une nuit à 4°C.

Des bactéries *E.coli* (TOP10) sont transformées par le produit de ligation afin d'obtenir des colonies. Après vérification des transformants, extraction des plasmides et séquençage des plasmides obtenus (paragraphe II.6.2. à II.6.6.), il est possible de passer à l'étape suivante : la création des vecteurs finaux.

#### ➤ *Création des vecteurs finaux*

La réaction Greengate finale est réalisée en thermocycleur. Pour cela, dans un tube PCR, 150 ng de plasmide de chaque vecteur d'entrée sont mélangés à 100 ng de vecteur de destination, 1,5 µL de tampon cutsmart 10 X, 1,5 µL d'ATP (10 mM), 1 µL de T4 DNA ligase (30 U/µL), 1 µL de Bsa I HF, et le volume est ajusté à 15 µL.

Puis deux programmes au thermocycleur sont possibles, représentés dans le [tableau 9](#). le programme de 30 cycles de 2 x 2 min est la version optimisée du programme de 50 cycles de 2 x 5 min initialement mis au point (Lampropoulos et al., 2013). Mais au sein du laboratoire, une meilleure efficacité du programme de 50 cycles a été observée.

À la fin du programme, des bactéries *E. coli* chimiquement compétentes sont transformées par cette réaction (paragraphe II.6.2.). L'ensemble des constructions réalisées pendant la thèse sont regroupées dans le [tableau 10](#).

### II.6.2. Transformation de bactéries *E.coli* chimiquement compétentes

Les bactéries *E.coli* (TOP10) chimiquement compétentes sont conservées à -80°C. Un tube de 100 µL est décongelé sur glace pendant 10 - 15 min, et 50 µL de TOP10 suffisent pour une réaction (pour les TOP10 commerciales, 25 µL suffisent). Les bactéries sont prélevées avec un cône coupé pour ne pas les endommager. 2 µL de produits de ligation sont alors ajoutés et mélangés délicatement (6 µL de ligation pour la réaction Greengate finale), sans flux et reflux.

**Tableau 11 : Résistance aux antibiotiques de différents vecteurs**

<b>Vecteur (final)</b>	<b>Résistance conférée</b>
pENTR™ D TOPO®	kanamycine (50 µg.mL <sup>-1</sup> )
pKGWFS7 (Gateway™)	spectinomycine (100 µg.mL <sup>-1</sup> )
pK2GW7 (Gateway™)	spectinomycine (100 µg.mL <sup>-1</sup> )
pPICZα	Zéocine™ (25 µg.mL <sup>-1</sup> )
Greengate	spectinomycine (100 µg.mL <sup>-1</sup> )

Le mélange bactéries – produit de ligation est incubé 30 min sur glace afin de mettre les deux éléments en contact.

Un témoin négatif est systématiquement réalisé en transformant des bactéries avec le vecteur de destination seul. En effet, le vecteur seul ne permet pas une sélection positive des transformants, pour des raisons qui varient selon le vecteur utilisé. Pour les vecteurs pENTR™ D TOPO® et pPICZα B, ceux-ci sont sous forme linéarisée. Or, les bactéries multiplient uniquement des plasmides sous leurs formes circulaires. Les gènes de résistance à un antibiotique présents sur ces vecteurs ne seront donc pas exprimés. Pour les vecteurs Gateway™ et Greengate, le vecteur de destination possède une séquence codant pour la protéine toxique CcdB, qui induit la mort des bactéries qui ne possèdent pas le gène de la protéine CcdA, en s'attaquant à l'ADN gyrase (Bernard and Couturier, 1992). Lors de la recombinaison entre le vecteur d'entrée et le vecteur de destination, la séquence CcdB est transmise du vecteur de destination vers le vecteur d'entrée, induisant la mort des bactéries qui réceptionnent le vecteur d'entrée. Malgré ces précautions, des faux-positifs sont possibles. Il est donc préférable de prévoir des témoins négatifs, pour savoir si les colonies observées sont bien issues de la ligation entre le produit PCR et le vecteur. Dans certains kits comme le kit pENTR™ D TOPO®, des amorces témoins sont également disponibles pour effectuer des transformations témoins positives.

La transformation est effectuée par un choc thermique de 30 sec à 42°C au bain-marie. La membrane des bactéries va alors se perméabiliser et permettre aux plasmides d'y pénétrer. Aussitôt après, les tubes sont plongés dans la glace, et sont refroidis pendant 5 min, pour que les membranes des bactéries retrouvent leur intégrité (Bergmans, 1981). Puis sous hotte microbiologique, 250 µL de milieu SOC (Super Optimal Broth : 2 % p/v [poid/volume] de tryptone, 0,5 % p/v d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, et 20 mM de glucose) ou de milieu LB liquide sont ajoutés dans les tubes. Les tubes sont alors incubés à 37°C à 200 rpm pendant une heure. Cette incubation permet aux bactéries d'exprimer le gène de résistance à l'antibiotique et de se multiplier.

Les cultures sont ensuite étalées à l'aide d'un râteau sur des milieux LB solides (LB réduit de moitié en sel pour les clonages dans pPICZα) comportant l'antibiotique de sélection spécifique au vecteur de destination ([tableau 11](#)). Il est préférable d'étaler deux boîtes par transformation : 50 µL sur l'une et le reste sur l'autre. Pour étaler plus de 100 µL, il vaut mieux centrifuger 5 min à 6 000 g la culture, retirer une partie du surnageant et resuspendre le culot bactérien avec le milieu restant pour pouvoir l'étaler plus facilement.

Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C sur l'envers avant de pouvoir voir apparaître les colonies.

### II.6.3. Vérification du clonage par PCR

Les colonies obtenues doivent être vérifiées. Pour cela, des « PCR sur colonies » ont dans un premier temps été réalisées. Pour cela, les colonies sont piquées par des cônes de pipette, et les cônes sont insérés dans des tubes de 1,5 mL contenant entre 20 et 50 µL d'eau mQ



stérilisée. Les bactéries sont ensuite lysées par incubation 5 min à 98°C. 1 à 2 µL de ces solutions ont été utilisés comme matrice de PCR, en utilisant soit les amorces spécifiques aux séquences clonées, soit en utilisant des amorces universelles dont les sites d'hybridation figurent sur le vecteur.

Dans le cas du pENTR™ D TOPO®, il s'agit des amorces M13 (M13 sens (-20) : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3', M13 anti-sens 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Pour pPICZα, ce sont les amorces AOX1 (AOX1 sens 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3', AOX1 anti-sens 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). Pour les vecteurs d'entrée Greengate, les amorces SP6 (sens, 5'-ATTTAGGTGACTATAG-3') et T7 (anti-sens 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') peuvent être utilisées (<https://www.addgene.org/mol-bio-reference/sequencing-primers/>).

De plus, la combinaison d'une amorce universelle et d'une amorce spécifique à la séquence (par exemple amorce spécifique sens et M13 anti-sens) permet de vérifier par PCR le sens d'insertion de l'insert.

#### II.6.4. Extraction des plasmides des cultures bactériennes

Une autre possibilité pour vérifier les vecteurs formés est d'extraire les plasmides et de vérifier leur séquence par digestion enzymatique. Pour cela, les plasmides sont extraits à l'aide d'un kit d'extraction, afin d'obtenir des « minipreps ». Le kit qui a été utilisé est le « kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System » de Promega et les recommandations du fournisseur ont été suivies.

#### II.6.5. Vérification des plasmides par digestion enzymatique

Après extraction, les plasmides sont vérifiés par digestion enzymatique. Pour cela, les plasmides sont d'abord créés sur le logiciel Serial Cloner (<https://serial-cloner.en.softonic.com/>), afin de connaître les sites de restriction enzymatique, et la taille des fragments générés par digestion enzymatique.

Une fois la ou les enzymes choisies, 7 µL de plasmides sont mélangés avec 0,5 µL de chaque enzyme choisie, 2 µL du tampon de ces enzymes (si les tampons sont différents, il est préférable d'effectuer les digestions séparément en purifiant l'ADN sur colonne entre deux digestions), et le volume réactionnel est ajusté à 10 µL avec de l'eau mQ stérilisée. La digestion est réalisée 1 h à la température optimale des enzymes au bain-marie.

Puis 2 µL de tampon de charge 6 X sont ajoutés aux digestions. Elles sont ensuite déposées sur gel électrophorèse afin de vérifier la taille des fragments obtenus.

#### II.6.6. Vérification des plasmides par séquençage

La dernière étape de vérification consiste à envoyer les plasmides au séquençage (MWG Biotech, <http://www.mwg-biotech.com/>). Pour que celui-ci soit efficace, il est recommandé d'envoyer des produits (des plasmides, mais il est également possible d'envoyer des produits PCR) dans des concentrations importantes.



Une fois les séquences obtenues, celles-ci sont comparées à celles attendues par analyse appelée « BLAST ». Différents logiciels en sont capables, dont Serial Cloner.

## II.7. Création de plantes transformées

### II.7.1. Transformation de *Rhizobium radiobacter*

La bactérie *R. radiobacter*, anciennement *Agrobacterium tumefaciens*, est utilisée pour transformer les plantes (de façon stable ou transitoire), grâce à sa capacité naturelle à incorporer de l'ADN à la plante hôte, à l'origine de « tumeurs » (d'où le nom *tumefaciens*). L'induction de tumeur est due au plasmide de virulence Ti (tumor-inducing) d'environ 200 Kb, qui contient des gènes de virulence et un ADN-T. C'est l'ADN-T du plasmide Ti, délimité par des bordures de 23 pb, qui est transféré dans les plantes. Il est ainsi intégré dans l'ADN des plantes, puis exprimé par la machinerie cellulaire de la plante, ce qui induit la production d'enzymes responsables de (i) la synthèse d'hormone de plante, qui vont induire la croissance de la tumeur, et (ii) la formation d'opines, qui sont des conjugués d'acides aminés et de sucres spécifiques à la transformation de plante par l'ADN-T du plasmide Ti. Les opines peuvent servir de source de carbone et d'azote aux bactéries infectrices, permettant leur développement. Ce système est donc exploité par les chercheurs pour transférer un ADN-T à la plante (McCullen and Binns, 2006).

#### II.7.1.a. Préparation de bactéries électrocompétentes

Pour pouvoir transformer des bactéries *R. radiobacter* par le vecteur obtenu par clonage, il est nécessaire de les rendre électrocompétentes, c'est-à-dire qu'elles doivent subir un traitement pour que leurs membranes puissent se déstabiliser suite à une électroporation, pour pouvoir intégrer le vecteur.

Il est pour cela nécessaire de cultiver 2 L de culture liquide de la souche bactérienne désirée, dans quatre erlens d'une capacité de 2 L (500 mL de LB par erlen), avec les antibiotiques adéquats. L'inoculation de ces 2 L de culture est réalisée à partir d'une préculture de 20 mL d'une culture liquide saturée (cultivée sur la nuit).

Lorsque la  $DO_{600nm}$  atteint entre 0,5 et 0,7, les 2 L de culture sont centrifugés dans des bidons de 500 mL stériles à 3 214 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est alors retiré avec précaution, puis les bactéries culotées vont subir une série de lavages à l'eau osmosée stérile et à 4°C, avec entre chaque lavage une centrifugation à 3 214 g pendant 30 min à 4°C et une élimination du surnageant. Le premier lavage est réalisé avec 400 mL d'eau froide stérile, puis un deuxième avec 200 mL. Avant de centrifuger à nouveau, les suspensions bactériennes sont transférées dans des bidons d'une capacité de 250 mL. Après centrifugation, les culots bactériens sont repris dans 100 mL d'eau froide stérile, et les suspensions bactériennes sont regroupées deux à deux afin de réduire les bidons à deux bidons contenant 200 mL de suspensions bactériennes. Cette fois-ci, après centrifugation et élimination du surnageant, les culots bactériens sont repris dans 13 mL de glycérol 10 % stérile à 4°C, et les suspensions sont





transférées dans des tubes de 50 mL. Après centrifugation 15 min à 3 214 g à 4°C, le surnageant est éliminé, et les culots sont repris dans 1 à 2 mL de glycérol 10 % stérile à 4°C.

Entre 50 et 100 µL de cette solution sont alors répartis dans des tubes de 1,5 mL stériles et froids, aussitôt plongés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

Il est important que les bactéries soient manipulées à 4°C durant toute la réalisation du protocole, et que les surnageants de lavage soient éliminés rapidement dans leur totalité pour réaliser des bactéries électrocompétentes efficaces.

### II.7.1.b. Transformation de *R. radiobacter* électrocompétentes

Un tube de 50 µL de bactéries *R. radiobacter* électrocompétentes est décongelé sur de la glace pendant une dizaine de minute. Une fois décongelées, entre 2 et 2,5 µL de miniprep de plasmide sont mis en contact avec les bactéries électrocompétentes. Il est important de ne pas homogénéiser par pipetage pour ne pas léser les bactéries, mais uniquement en remuant délicatement avec le cône de la pipette. Les bactéries sont laissées 30 min dans la glace pour la mise en contact avec les plasmides.

Le mélange bactéries/plasmides est alors transféré dans des cuves à électroporation de 2 mm froides, à l'aide d'un cône coupé pour ne pas léser les bactéries. L'électroporation est réalisée à 2,5 Kvol et à 25µFarad pendant 5 millisecondes. Aussitôt l'électroporation terminée, 950 µL de LB liquide sont ajoutés. Le tout est transféré dans des tubes de 15 mL, et incubé 1 h à 28°C à 200 rpm. Les tubes sont centrifugés 5 min à 6 000 g, puis 800 µL de surnageant sont éliminés et le culot bactérien est repris par pipetage dans le surnageant restant. La suspension bactérienne restante est alors étalée sur milieu LB gélosé contenant l'antibiotique nécessaire à la sélection des clones transformés. Les boîtes sont incubées 2 jours minimum à 28°C.

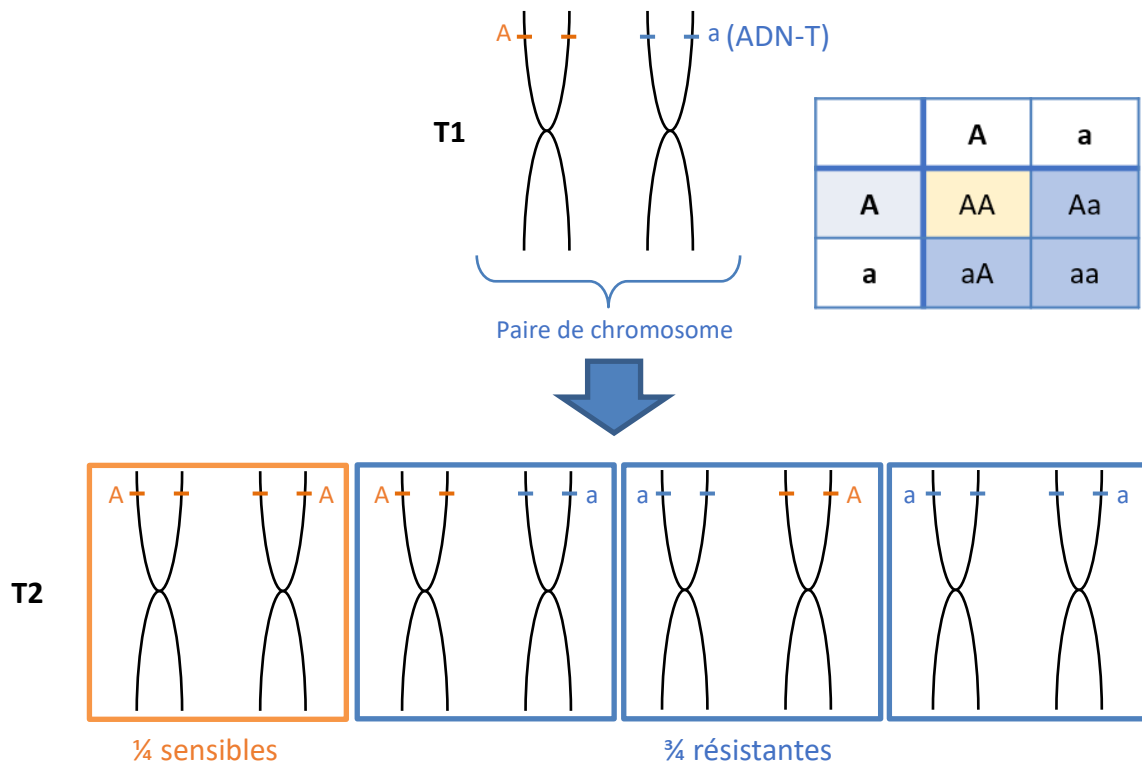
Les vecteurs Gateway™ sont transformés dans la souche C58C1 de *R. radiobacter*, alors que les vecteurs Greengate sont transformés dans la souche GV3101 qui contient le vecteur pSOUP nécessaire à la transformation des plantes (voir chapitre I paragraphe I.2.).

## II.7.2. Transformation stable d'*Arabidopsis thaliana*

### II.7.2.a Transformation d'*A. thaliana* par « floral dip »

La transformation d'*A. thaliana* par les constructions réalisées par clonage se fait grâce aux bactéries *R. radiobacter*, selon le protocole optimisé par Clough et Bent, (1998). Pour cela, 400 mL de culture des bactéries ayant une DO<sub>600nm</sub> aux alentours de 0,8 sont centrifugés 20 min à 3 214g à 10°C, dans un biberon de 500 mL autoclavé. Le culot est repris dans 135 mL d'une solution de transformation composée de 5 % de saccharose et 0,05 % d'un agent tensioactif comme le tritonX 100. Le triton permet de réduire la tension de surface, ce qui facilite l'entrée des bactéries dans les tissus végétaux (Clough and Bent, 1998).

Les hampes florales des plantes à transformer sont plongées dans la solution de transformation de façon à être totalement humidifiées (entre 30 s et 1 min). Les hampes



**Figure 47 : Transmission de l'ADN-T à la génération T2.** La première génération (T1) possède une copie de l'ADN-T sur un seul chromosome. La descendance T2 est soit homozygote (aa), soit hétérozygote (aA et Aa), soit sauvage (AA). Ainsi, ¼ de la génération T2 est sensible à l'agent de sélection (en orange), alors que les ¾ restants sont résistants (en bleu), puisqu'une seule copie de l'ADN-T suffit à rendre la plante résistante.

florales doivent mesurer entre 2 et 10 cm pour des résultats optimum (Clough and Bent, 1998) et posséder de nombreux boutons floraux encore fermés (après 4 à 5 semaines de culture en serre).

Puis les pots sont couchés sur des plateaux de culture, et les hampes sont recouvertes de film étirable. Les pots sont laissés ainsi en serre pendant 24 h afin de favoriser la transformation, puis sont remis à la verticale, et les hampes sont tuteurées.

### II.7.2.b Sélection des plantes transformées

Une fois la transformation réalisée, un mois est nécessaire pour obtenir les graines des plantes transformées. Ces graines comportent une grande majorité de graines non transformées, et quelques graines transformées. Elles sont donc semées sur milieux sélectifs (MS  $\frac{1}{2}$  complémenté d'un antibiotique) définis par le plasmide utilisé, puis les *primo* transformants (T1) résistants sont mis en terre. Chaque T1 correspond à un évènement de transformation distinct, l'ADN-T n'est donc pas intégré dans le même endroit du génome suivant la plante T1, ou « lignée T1 ». De plus, chaque T1 possède une seule copie de l'ADN-T, elles sont donc hétérozygotes.

Environ deux mois plus tard, les graines obtenues correspondent à la génération T2. Ces graines possèdent soit deux copies de l'ADN-T (elles sont alors homozygotes), soit une seule copie (ce qui correspond à des plantes hétérozygotes), soit aucune (et sont alors sauvages. Voir [figure 47](#)). On observe alors sur milieux de sélection que  $\frac{1}{4}$  des T2 sont sensibles à l'agent de sélection, alors que  $\frac{3}{4}$  sont résistantes, si l'ADN-T n'est pas inséré dans un gène dont la mutation est létale. C'est pourquoi il est important de vérifier que le rapport  $\frac{3}{4}$  -  $\frac{1}{4}$  est bien respecté. Une douzaine de plantes résistantes, qui correspond à un mélange de plantes homozygotes et hétérozygotes, est mis en terre afin d'obtenir la génération T3. Il est également possible d'utiliser certaines d'entre elles pour de premières observations, suivant le plasmide intégré.

Les plantes T2 hétérozygotes possèdent une descendance comportant des T3 homozygotes, hétérozygotes et sauvages tout comme la descendance de la génération T1. En revanche, les T2 homozygotes possèdent une descendance à 100 % homozygotes et résistante à l'agent de sélection. C'est ainsi que la sélection des T2 homozygotes est effectuée.

Il est préférable d'utiliser des lignées homozygotes pour les observations de marquages, car le signal sera plus intense que chez des lignées hétérozygotes. De plus, le maintien des lignées (par semis de graines pour l'obtention d'une nouvelle génération) est facilité par des lignées homozygotes qui ont des descendance homogènes.

### II.7.3. Transformation transitoire en feuilles de tabac

L'expression transitoire de vecteur est réalisée en feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*), par infiltration des solutions de rhizobactéries contenant le vecteur dans les feuilles, à l'aide d'une seringue sans aiguille (Yang et al., 2016).



Pour cela, des cultures de 10 mL de *R. radiobacter* sont réalisées dans des tubes de 50 mL avec les antibiotiques adéquats, à 28°C et 200 rpm. Plusieurs souches sont nécessaires : la souche contenant le plasmide qui contient l'ADN-T que l'on souhaite introduire dans la plante, et une souche contenant le plasmide p19, qui code une protéine virale qui empêche le silencing (la suppression de l'expression de la protéine recombinante). La souche *R. radiobacter* possédant ce plasmide est résistante à la gentamycine (25 µg.mL<sup>-1</sup>) et à la kanamycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>).

Lorsque les cultures atteignent une DO<sub>600nm</sub> de 1 (prévoir éventuellement une préculture sur la nuit), les cultures sont centrifugées 5 min à 6 000 g à température ambiante. Les surnageants sont éliminés, et les culots sont repris dans 4 mL de milieu d'infiltration stérilisé par filtration (1 M de Magnesium chloride hexahydrate [MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O], 1 M de MES monohydrate, et 0,1 M d'acétosyringone). L'acétosyringone contenu dans le milieu d'infiltration est un composé phénolique naturellement produit par la plante lorsqu'elle est attaquée par *R. radiobacter*, et est nécessaire à l'expression des facteurs de virulence de la bactérie. Les solutions sont alors incubées 30 min à 28°C à 150 rpm pour que les bactéries s'habituent au nouveau milieu. La DO<sub>600nm</sub> doit être entre 0,5 et 0,8. La concentration est éventuellement ajustée avec du milieu d'infiltration.

La culture de *R. radiobacter* avec le plasmide d'intérêt doit être co-infiltrée avec la culture de p19. La DO<sub>600nm</sub> finale doit être entre 0,5 et 0,8 (elle est éventuellement ajustée avec du milieu d'infiltration). Il est nécessaire de prévoir un volume suffisant (8 à 10 mL) pour inoculer une quantité satisfaisante de feuilles. Des feuilles doivent également être infiltrées avec la souche p19 seule, afin de servir de témoin lors de l'observation au microscope confocal. L'infiltration se fait sur la surface abaxiale de feuilles de tabac de 4 semaines, à l'aide d'une seringue sans aiguille. Le contour de la zone d'infiltration est entouré au marqueur (après avoir essuyé les feuilles) pour savoir quelles zones ont été infiltrées, car elles sont visibles lorsqu'elles sont fraîches, mais disparaissent par la suite. L'observation au microscope confocal est réalisée 72 h après l'infiltration (voir chapitre V).

## II.8. Transformation de levures *Pichia pastoris*

### II.7.1. Linéarisation du vecteur

Pour pouvoir transformer *P. pastoris* avec le vecteur pPICZα, le vecteur doit être produit en grande quantité, car 5 à 10 µg de plasmide linéarisé sont nécessaires pour chaque transformation. Pour cela, 30 mL de culture d'*E. coli* avec le plasmide désiré sont préparés dans du LB réduit en sel et complémenté de 25 µg.mL<sup>-1</sup> de Zéocine™. La culture est réalisée dans un erlen baffle de 100 mL. Les baffles permettent une meilleure oxygénation des cultures, qui peut être un facteur limitant des cultures.

L'extraction des plasmides se fait avec le kit « Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System » de Promega en suivant les instructions du fournisseur. Dans la mesure où la culture est d'un volume important, 5 colonnes d'extraction sont nécessaires. Une fois les 5 éluats regroupés, l'ADN est concentré au speed vac 1h20 à 45°C.



Le plasmide doit ensuite être linéarisé en découpant l'ADN dans la région 5'AOX1 du plasmide, pour pouvoir être intégré dans *P. pastoris*. Les sites de restriction recommandés sont les sites des enzymes Sac I, Pme I, ou BstX I. Il est nécessaire de digérer entre 50 et 100 ng de plasmide. Pour cela, environ 30 µL du vecteur concentré sont mélangés à 3 µL d'enzyme de restriction, 5 µL de tampon de l'enzyme 10 X, et le volume est ajusté à 50 µL avec de l'eau mQ stérilisée. La digestion est réalisée 1 h 30 à la température optimale de l'enzyme de restriction.

Après digestion, l'ADN est purifié sur colonne (voir « Amplification et purification des séquences à cloner », sous partie du paragraphe II.6.1.a.), et élué avec 2 x 50 µL d'eau. 1µL est déposé sur gel d'agarose 0,7 % pour vérifier la linéarisation par électrophorèse. Le produit digéré restant est concentré au speed vac à 45°C. La concentration est ensuite vérifiée au (Thermo Fisher scientific).

## II.7.2. Transformation de *Pichia pastoris* (X-33)

### II.7.2.a. Production de levures électrocompétentes

Une préculture de la souche X-33 de *P. pastoris* est lancée le matin dans du milieu YPD sans antibiotique, dans un erlen bafflé de 125 mL, à 29,5°C et à 250 rpm.

Le lendemain, la DO<sub>600nm</sub> de la culture est mesurée. Elle doit être située entre 40 et 70. Puis deux erlens de 1 L avec 250 mL de YPD sontensemencés avec la préculture, avec 10 µL pour l'un et 40 µL pour l'autre, pour être sûr d'atteindre la phase exponentielle le lendemain (DO<sub>600nm</sub> entre 1,3 et 1,5).

Le troisième jour, la DO<sub>600nm</sub> est mesurée. Pour l'erlen en phase exponentielle de croissance, la culture est centrifugée à 1 500 g pendant 10 min à 4°C dans 5 tubes de 50 mL. À partir de cette étape, toute opération doit être impérativement effectuée à 4° C. Le matériel et les solutions doivent également être froids. Après centrifugation, les surnageants sont éliminés, et les culots sont repris dans 50 mL d'eau froide stérile. Les tubes sont à nouveau centrifugés 10 min à 1 500 g à 4°C. Puis les surnageants sont éliminés, et les culots sont regroupés deux à deux dans 50 mL d'eau froide. Après centrifugation 10 min à 1 500 g à 4°C, les culots sont tous regroupés dans 10 mL de sorbitol 1 M stérile froid. Après une dernière centrifugation 10 min à 1 500 g à 4°C, le culot est repris dans 0,9 mL de sorbitol 1 M froid. La solution obtenue est divisée dans des tubes, avec 80 µL de solution par tube. Les levures électrocompétentes sont conservées dans de la glace jusqu'à utilisation dans la journée, et le reste est plongé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C.

### II.7.2.a. Transformation de levures électrocompétentes par pPICZα

La transformation des levures X-33 par le vecteur pPICZα linéarisé est effectuée par électroporation. Pour cela, la cuve d'électroporation de 2 mm est préalablement incubée dans de la glace pour être refroidie, et un tube de 80 µL de X-33 électrocompétentes est décongelé 10 min sur glace. Une fois décongelées, les levures sont mélangées avec 5 à 10 µg de plasmide linéarisé. Le mélange est incubé 5 min sur glace.





Puis le mélange est transféré dans la cuve. L'électroporation est effectuée à 1 500 V pendant 5 sec. Aussitôt après, 1 mL de sorbitol 1 M froid stérile sont ajoutés dans la cuve. Le mélange est transféré dans un tube de 15 mL, puis il est incubé 1 h 30 à 30°C sans agitation.

Les levures transformées sont étalées sur deux boîtes YPDS contenant 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Zéocine™. Un volume de 200  $\mu\text{L}$  sont étalés sur une première boîte, puis le restant est centrifugé 5 min à 1 500 g. Une partie du surnageant est éliminée, puis le culot est repris dans le surnageant restant, et étalé sur une 2<sup>e</sup> boîte. Le sorbitol du milieu permet de stabiliser les levures devenues sensibles à l'osmolarité.

Les boîtes sont incubées 2 à 3 jours sur l'envers dans du papier aluminium à 29,5°C.



## Chapitre III : Biochimie

### III.1. Extraction et analyses de PG pariétales

#### III.1.1. Extraction de PG pariétales

L'extraction de PG pariétales se fait à partir d'échantillons broyés dans de l'azote liquide. Dans des tubes de 1,5 mL contenant 50 mg de matériel végétal broyé, 100 µL de tampon acétate de sodium 50 mM pH 5 + 1 M de LiCl sont ajoutés. Les tubes sont placés sous agitation à 4°C pendant 1 h à 225 rpm. Puis les tubes sont centrifugés 10 min à 13 000 g. Les surnageants sont ensuite placés dans de nouveaux tubes puis centrifugés à nouveau 10 min à 13 000 g. Ces deux étapes de centrifugation permettent d'éliminer plus efficacement les résidus cellulaires qu'en effectuant une seule centrifugation de 20 min. Les extraits à partir de feuilles peuvent demander une centrifugation supplémentaire. Les surnageants sont finalement récupérés dans des tubes propres.

Les surnageants sont ensuite débarrassés du LiCl grâce à des colonnes Millipore™ Amicon™ Ultra 10 kDa, 0,5mL (Thermo Fisher scientific). Dans un premier temps, 500 µL de tampon sodium phosphate 50 mM pH 7,5 sont déposés dans les tubes Amicon™ afin d'équilibrer leurs membranes. Ils sont ensuite centrifugés 5 min à 13 000 g à 4°C. Le tampon collecté dans les tubes collecteurs est éliminé, mais le tampon restant dans les colonnes est conservé. Les surnageants obtenus à l'étape précédente sont déposés à leur tour dans les colonnes. Celles-ci sont centrifugés 15 min à 13 000 g à 4°C. Puis 100 µL de tampon sodium phosphate 50 mM pH 7,5 (le même volume que le surnageant) sont déposés sur les colonnes, puis les tubes sont centrifugés 10 min à 13 000 g à 4°C. Les échantillons concentrés situés dans les colonnes sont ensuite placés dans de nouveaux tubes. Leur volume est ajusté au volume désiré afin de réaliser les dosages d'activités enzymatiques et le dosage protéique. Entre 100 et 120 µL sont nécessaires.

#### III.1.2. Dosage de la quantité de protéines extraites

Les protéines totales extraites sont dosées grâce au dosage de Bradford (Bradford, 1976 ; Bradford Reagent, référence B6916, Sigma-Aldrich®, Merck). Pour cela, 2 µL d'échantillons sont ajoutés à 98 µL de tampon d'extraction de protéines sodium phosphate (en triplicata) dans des plaques à puit prévues pour un spectrophotomètre à lecteur de plaque (Power Wave XS2, Biotek Instruments©). La quantité de protéines des extraits est évaluée grâce à une gamme étalon protéique de sérum albumine bovine en triplicata, composée de 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 et 3,5 µg de protéines dans du tampon d'extraction protéiques sodium phosphate 50 mM pH 7,5 avec un volume final de 100 µL.

Dans chaque puit (contenant les échantillons ou la gamme), 100 µL de réactif de Bradford sont ajoutés à l'aide d'une pipette multicanaux, et homogénéisés par pipetage. La coloration allant du bleu pâle pour une absence de protéine à un bleu assez vif pour des quantités de protéines importantes apparaît à peu près en une minute. La lecture de la DO<sub>595nm</sub> est réalisée une fois les puits homogénéisés.



La quantité de protéines est évaluée en divisant la moyenne de  $DO_{595nm}$  des échantillons par la pente de la courbe de la gamme protéique.

### III.1.3. Dosage d'activité PG d'extraits de plante

#### III.1.3.a. Principe du dosage d'activité PG

Le protocole utilisé pour doser l'activité PG d'extrait de plante est un protocole adapté de celui de Nelson-Somogyi, afin d'être réalisé en microplaques (Baldwin et al., 2014; Green III et al., 1989). Il consiste à doser les sucres réduits du substrat PGA (polygalacturonic acid), formés par l'hydrolyse des liaisons osidiques reliant deux résidus Gal-A par des PG. Le dosage est réalisé grâce à deux réactions d'oxydoréduction. La première a lieu entre les sucres réducteurs et le cuivre contenu dans le premier tampon de dosage. Cette réaction va produire du  $Cu_2O$ , qui sera lui-même réduit dans la deuxième réaction d'oxydoréduction par l'arsénomolybdate du deuxième tampon de dosage, ce qui va provoquer la formation d'un composé vert-bleu dosé à 540 nm.

#### III.1.3.b. Réaction des PG extraites sur le substrat

La première étape consiste à laisser agir les PG des extraits de plante sur le PGA (référence 81325, Sigma-Aldrich®, Merck) pendant 1 à 2 h à 37°C, dans une plaque de micro-puits à PCR. Pour cela, 12,5  $\mu$ L d'échantillon (extraits dans du tampon pH 7,5) sont mélangés à 12,5  $\mu$ L de tampon sodium acétate 50 mM pH 5 et à 25  $\mu$ L de PGA 1 % (le PGA est dissous dans du tampon sodium acétate 50 mM pH 5. Le PGA étant très acide, le pH sera proche de 1 après dissolution. Mais le mélange de l'échantillon à pH 7,5, du tampon à pH 5 et du PGA aura un pH final proche de 5, qui est le pH optimum des PG).

Il est également nécessaire d'effectuer un témoin négatif avec des échantillons bouillis, qui servira de blanc aux échantillons. De cette façon, les sucres réducteurs déjà présents dans les échantillons ne seront pas pris en compte. Pour cela, un volume supérieur à 12,5  $\mu$ L d'échantillon est bouilli 10 min à 100°C. Après refroidissement, 12,5  $\mu$ L d'échantillons bouillis sont mélangés à 12,5  $\mu$ L tampon à pH 5 et à 25  $\mu$ L de PGA 1 % tout comme les échantillons non-bouillis.

En parallèle, un blanc constitué de 12,5  $\mu$ L de tampon d'extraction des PG (tampon sodium phosphate 50 mM pH 7,5), de 12,5  $\mu$ L de tampon sodium acétate 50 mM pH 5 et de 25  $\mu$ L de PGA 1 % est réalisé.

Une gamme de Gal-A est également réalisée, composée de 0 ; 10 ; 15 ; 25 ; 50 et 100 nmol de Gal-A dans du tampon pH 5, avec un volume final de 75  $\mu$ L. 25  $\mu$ L de PGA 0,1 % sont également ajoutés à chaque puits.

Les réactions des échantillons et des échantillons bouillis sont réalisées en triplicata. La gamme est réalisée en duplicata.

Le PGA est ajouté en dernier à l'aide d'une pipette multicanaux, afin que les réactions démarrent à peu près en même temps.



La plaque contenant l'ensemble de ces échantillons, du blanc et de la gamme sont incubés 1 à 2 h à 37°C afin que les PG agissent sur leur substrat.

### III.1.3.c. Dosage de l'activité PG (test Nelson-Somogyi miniaturisé)

Le dosage est réalisé en deux étapes. La première consiste à ajouter à chaque échantillon 75 µL de réactif cuivrique. Ce réactif est un mélange de 25 mL d'une solution A et de 1 mL d'une solution B. La solution A contient 0,2 M de sodium carbonate, 0,1 M de potassium sodium tartrate tétrahydrate, 0,2 M de bicarbonate de sodium, et de 1,4 M de sulfate de sodium. La solution B contient 15 % (p/v) de sulfate de cuivre pentahydrate et 1 à 2 gouttes d'acide sulfurique concentré pour 100 mL de solution. Les solutions A et B sont mélangées extemporanément. Le réactif cuivrique est ajouté dans chaque puit à l'aide d'une pipette à multicanaux, et les puits sont mélangés par flux et reflux. La plaque est alors incubée 30 min à 80°C, puis elle est refroidie. Il est préférable de transférer le contenu des puits dans une plaque de dosage d'absorbance à 96 puits à cette étape, à l'aide d'une pipette à multicanaux.

La deuxième étape du dosage consiste à incorporer dans chaque puit 75 µL de réactif arsénomolybdate. Ce réactif est constitué de 5 % d'ammonium molybdate tétrahydrate, 0,55 % de sodium arsénate dibasique heptahydrate et de 0,8 % d'acide sulfurique concentré. Pour le réaliser, 2,5 g d'ammonium molybdate tetrahydrate sont dissous dans 45 mL d'eau mQ. Tout en homogénéisant, 2,1 mL d'acide sulfurique sont ajoutés. En parallèle, 0,3 g de sodium arsénate dibasique heptahydrate sont dissous dans 2,5 mL d'eau. La solution précédente (d'ammonium molybdate tetrahydrate et acide sulfurique) est ajoutée petit à petit à la solution de sodium arsénate pour ne pas former de précipité. Ce mélange est ensuite conservé dans une bouteille opaque à 37°C pour qu'il ne précipite pas.

Le réactif arsénomolybdate est à ajouter très précautionneusement, petit à petit, car le mélange de celui-ci avec le réactif cuivrique provoque une réaction effervescente.

Une fois les puits homogènes et les bulles éliminées, l'absorbance à  $\lambda = 620 \text{ nm}$  des échantillons est lue au spectrophotomètre à lecteur de plaque (Power Wave XS2, Biotek Instruments©).

Pour calculer l'activité PG, la  $DO_{620\text{nm}}$  des échantillons bouillis est soustraite de celle des échantillons. Puis grâce à la pente de la gamme (dont la  $DO_{620\text{nm}}$  à 0 nmol de Gal A est soustraite à la gamme), l'activité en nmol de Gal A/µg de protéine est calculée.

## III.2. Production, extraction et analyses de PG produites par *Pichia pastoris*

Nous avons souhaité produire *in vitro* les PG d'intérêt de cette étude, afin d'analyser leurs spécificités de pH, de substrat, de température, et leurs paramètres cinétiques  $V_m$  et  $K_m$ . Pour cela, nous avons choisi le système hétérologue en levure : *P. pastoris*.

### III.2.1. Production des PG en système hétérologue par *P. pastoris*

Les protéines recombinantes sont produites à partir d'une préculture dans du milieu Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY), puis dans du milieu Buffered Methanol-complex





Medium (BMMY) dans un volume plus important, et après plusieurs jours d'induction de la production de la protéine grâce au méthanol.

La préculture se fait dans un erlern bafflé de 250 mL (avec un bouchon perméable à l'air) avec 10 mL de BMGY, supplémenté de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Zéocine™. La culture est incubée à 29,5°C et à 250 rpm pendant 24 h.

Après 24 h, la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de la préculture est mesurée. Elle permet de calculer le volume de préculture à centrifuger afin de resuspendre le culot dans 100 mL de milieu BMMY avec une  $\text{DO}_{600}$  de 1 (équivalent à  $5\cdot 10^7$  cellules. $\text{mL}^{-1}$ ), selon la relation suivante :

$$V \text{ à prélever} = \frac{(1 \times 50)}{\text{DO}_{600} \times 100}$$

Le volume de préculture calculé est centrifugé à 1 400 g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé. S'il est trouble, cela témoigne d'une contamination bactérienne. Le culot est repris dans 100 mL de milieu BMMY 0,5X sans antibiotique. Ce milieu contient du méthanol, il permet donc l'induction de l'expression de la protéine hétérologue. La culture est transférée dans un erlen bafflé de 1 L, où le bouchon est remplacé par un film stérile perméable à l'air.

Les jours suivants, et approximativement à la même heure, du méthanol filtré (concentration de 25 %) est ajouté à la culture pour une concentration finale de méthanol de 0,5 %. L'induction se fait pendant 3 à 4 jours.

### III.2.2. Purification des PG produites par *P. pastoris*

#### III.2.2.a. Principe de la purification des PG recombinantes

Grâce à la séquence  $\alpha$ -factor, les protéines recombinantes sont sécrétées dans le milieu de culture. Pour les purifier, la culture est d'abord centrifugée dans des tubes de 50 mL (pas plus de 45 mL par tube pour éviter les fuites) à 1 400 g pendant 6 min afin d'éliminer les levures. Les surnageants sont ensuite transférés dans de nouveaux tubes de 50 mL.

La première étape de purification consiste à concentrer les protéines du surnageant en les précipitant au sulfate d'ammonium, puis en les dissolvant dans un tampon adapté à la purification sur colonne. Les surnageants concentrés sont ensuite dialysés afin d'éliminer le sulfate d'ammonium.

Les protéines sont ensuite purifiées sur des colonnes de purification chargées en nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), grâce à l'affinité du tag histidine en C-terminal des protéines recombinantes pour le nickel. Une fois purifiée, les protéines sont concentrées, puis un changement de tampon est effectué. Les protéines sont ensuite dosées, et sont alors prêtes à être analysées.

#### III.2.2.b. Précipitation des PG recombinantes au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium peut se faire par paliers, en centrifugeant le milieu de culture entre chaque palier, et en récupérant le culot de protéines précipitées à chaque

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																		
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0	% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5	
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10	
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15	
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20	
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25	
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30	
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35	
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40	
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45	
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50	
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55	
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60	
									0	31	63	97	132	168	205	244	65	
										0	32	65	99	134	171	209	70	
											0	32	66	101	137	174	75	
												0	33	67	103	139	80	
													0	34	68	105	85	
														0	34	70	90	
															0	35	95	
																0	100	

**Figure 48 : Quantité (en grammes) de sulfate d'ammonium à ajouter en fonction du pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium initial, et du pourcentage de saturation final désiré.** <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e.html>.

fois, afin de faire un premier tri des protéines, et ainsi faciliter la purification. Mais il est également possible de procéder sans palier, en amenant à 95 % la saturation de sulfate d'ammonium, puis en récupérant les protéines précipitées par une seule centrifugation finale.

La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter est déterminée en fonction du tableau de la **figure 48**. Ainsi, pour avoir une saturation à 95 % d'un surnageant avec une saturation initiale de 0 %, il faut ajouter  $650 \text{ g.L}^{-1}$  de sulfate d'ammonium. Que l'on désire réaliser une centrifugation par paliers ou non, le sulfate d'ammonium s'ajoute cuillère par cuillère, avec des temps d'attente de 20 min environ entre chaque ajout, afin que le sulfate d'ammonium se dissolve bien, et que les protéines ne précipitent pas en agrégats. La totalité de la procédure se déroule à 4°C.

A la fin de la précipitation au sulfate d'ammonium, le surnageant est centrifugé 8 min à 12 000 g à 4°C dans des tubes Corex® de 50 mL fermé par du Parafilm® M (Bemis Company©). Ces tubes sont en verre, capables de résister à une ultra-centrifugation. Le surnageant est éliminé, et les culots sont repris dans 200 µL à 1 mL de tampon de dialyse sodium phosphate 25 mM, NaCl 250 mM pH 7,4 (tampon nécessaire pour la purification sur colonne HisTrap™ Fast Flow). La reprise du culot se fait à l'aide d'une pipette, de façon délicate pour ne pas former de bulles, qui compliquent la reprise du culot. Cette étape est assez longue.

Les protéines concentrées sont alors dialysées sur la nuit dans du tampon de dialyse. Il faut compter un volume de tampon de dialyse 1 000 fois plus important que le volume de protéines concentrées. Pour effectuer la dialyse, les protéines concentrées sont insérées dans des tubes « D-Tube™ Dialyzer Midi, MWCO 8 kDa » (EMD Millipore, Sigma Aldrich®, Merck). Ces tubes ont une capacité de 800 µL. La dialyse se fait sous agitation douce, une nuit à 4°C.

Une fois dialysées, les protéines concentrées sont prêtes à être purifiées sur colonne.

### III.2.2.c. Purification des PG recombinantes sur colonne de nickel

Les colonnes qui ont été utilisées sont les colonnes HisTrap™ Fast Flow 1 mL de GE Healthcare (Sigma-Aldrich®, Merck), et sont chargées en Ni Sepharose®.

La purification doit se faire à 4°C. Les tampons sont donc conservés dans de la glace, et les échantillons en sortie de colonne sont aussitôt placés sur glace. De plus, toutes les solutions doivent être filtrées avec un filtre de 0,2 microns, afin de ne pas faire entrer de particules susceptibles d'encombrer la colonne, et d'éliminer le maximum d'air. En effet, aucune bulle ne doit être incorporée dans la colonne. Le passage des différents tampons sur la colonne se fait à l'aide d'une pompe péristaltique, qui permet de faire rentrer goutte à goutte les tampons dans la colonne.

La purification sur colonne HisTrap™ Fast Flow (1 mL) comporte plusieurs étapes. La colonne est d'abord lavée à l'eau, puis mise en solution par le passage d'un tampon permettant l'accrochage des protéines sur la colonne. L'échantillon est ensuite passé sur la colonne afin de fixer les protéines recombinantes. Deux lavages sont réalisés afin d'éliminer les protéines indésirables, et enfin les protéines recombinantes sont éluées.



### *Lavage et préparation de la colonne avant utilisation*

La colonne est d'abord lavée avec de l'eau mQ, afin d'éliminer l'éthanol 20 % contenu dans la colonne pour la conserver. En effet, l'éthanol risquerait de faire précipiter les sels des tampons, et d'endommager la colonne. A cette étape, le débit d'écoulement est ajusté et calculé. Il faut environ 1 min pour écouler 1 mL d'eau. La colonne est lavée avec 5 à 10 volumes d'eau (volume de la colonne, soit 1 mL). Puis la colonne est tamponnée en passant 5 à 10 volumes de tampon d'accrochage sur la colonne, qui correspond au tampon utilisé pour la dialyse (sodium phosphate 25 mM, NaCl 250 mM pH 7,4). Le liquide en sortie de colonne n'est pas conservé.

### *Passage de l'échantillon sur la colonne et fixation des PG recombinantes*

C'est ensuite l'échantillon de protéines recombinantes qui est déposé sur la colonne, après dilution des protéines dans du tampon d'accrochage pour obtenir un volume final d'environ 12 mL. Cette dilution favorise la purification des protéines. L'échantillon est chargé dans son intégralité sur la colonne (il faut toutefois conserver environ 20 µL pour les analyses après purification). L'échantillon passé sur colonne est appelé « Load » (pour « chargé »). Les protéines recombinantes sont alors fixées à la colonne grâce aux interactions  $\text{Ni}^{2+}$  - His. Le liquide en sorti de colonne, appelé « Flow Through » (FT ; pour liquide passé sur la colonne) est recueilli par fractions de 1 mL. Il correspond au tampon et aux protéines qui ne sont pas fixés sur la colonne.

### *Lavages de la colonne avant élution*

5 à 10 volumes de tampon d'accrochage sont à nouveau passés sur la colonne pour effectuer un lavage des protéines non fixées. Il est préférable de récupérer le liquide en sortie de colonne au cas où les protéines recombinantes ne se soient pas bien fixées à la colonne.

La colonne est ensuite lavée par 10 volumes du tampon sodium phosphate 25 mM, NaCl 250 mM pH 7,4 additionné de 25 mM d'imidazole. L'imidazole possède également une affinité pour les ions nickel, et permet donc, en forte concentration (500 mM) de décrocher les protéines recombinantes de la colonne. Mais à seulement 25 mM, l'imidazole permet de décrocher les protéines ayant une faible affinité pour la colonne, ce qui permet d'effectuer un lavage des protéines indésirables. À nouveau, il est préférable de collecter le liquide en sortie de colonne, par fractions de 0,5 à 1 mL, au cas où les protéines recombinantes se détachent. 5 mL sont ainsi récupérés, puis les 5 volumes suivants sont éliminés.

### *Elution des protéines recombinantes*

L'élution des protéines recombinantes est effectuée par 5 volumes de tampon sodium phosphate 25 mM, NaCl 250 mM pH 7,4 additionné de 500 mM d'imidazole. Le liquide en sortie de colonne comprend les protéines recombinantes décrochées par l'imidazole. Les 5 mL sortant en premier de la colonne sont recueillis par fractions de 0,5 à 1 mL, et correspondent aux éluats. Puis la colonne est lavée par 5 volumes de tampon supplémentaires.



Enfin, la colonne est lavée par 5 à 10 volumes d'eau mQ, puis par 5 volumes d'éthanol 20 %. La colonne est conservée à 4°C et peut être réutilisée.

#### III.2.2.d. Concentration des protéines et changement de tampon

Les éluats issus de la purification sont ensuite concentrés. La concentration se fait dans des tubes Amicon® Ultra-4 (Merck). Pour cela, les filtres des tubes sont d'abord lavés deux fois par 4 mL d'eau mQ, et deux centrifugations de 7 min à 7 500 g à 4°C après chaque lavage. Les échantillons sont ensuite ajoutés par fraction de 400 µL dans chaque tube, puis ceux-ci sont centrifugés 7 min à 7 500 g à 4°C.

Un changement de tampon est ensuite réalisé. Celui-ci est nécessaire afin de placer la protéine dans le tampon idéal pour les dosages d'activité (pour les PG, il s'agit d'un tampon avec un pH acide). Il se fait dans des PD Spintrap™ G-25 (GE Healthcare, Merck), qui contiennent le milieu de chromatographie « Sephadex G-25 medium ». Le milieu de chromatographie contenu dans les colonnes est d'abord resuspendu à l'aide d'un vortex. Le bouchon est ensuite retiré, les colonnes sont placées dans des tubes de 1,5 mL, et ceux-ci sont centrifugés 1 min à 800 g afin d'éliminer la solution de conservation.

Les colonnes sont ensuite équilibrées par 400 µL de tampon sodium acétate 50 mM à pH 5 (correspondant au tampon nécessaire à l'activité PG), puis les tubes sont centrifugés 1 min à 800 g, et le liquide collecté est éliminé. Cette opération est répétée 10 fois. Les colonnes sont placées dans des tubes 1,5 mL propres, puis les échantillons sont déposés au centre des colonnes. Enfin, les protéines sont éluées en centrifugeant les tubes 2 min à 800 g. Les protéines sont collectées au fond des tubes de 1,5 mL.

#### III.2.3. Dosage de la quantité de protéine recombinante produite

Les protéines totales purifiées et concentrées sont dosées grâce au dosage de Bradford (Bradford, 1976 ; Bradford Reagent, référence B6916, Sigma-Aldrich®, Merck), de la même façon que dans le paragraphe III.1.2.

#### III.2.4. Mise en évidence de la protéine par migration par électrophorèse de type SDS-PAGE

##### III.2.4.a. Confection du gel SDS-PAGE

Pour savoir si les protéines recombinantes ont bien été purifiées, celles-ci sont séparées par électrophorèse dénaturante de type SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis). La dénaturation des protéines permet de les séparer suivant leur taille. Puis le gel SDS-PAGE est soit coloré pour visualiser les bandes protéiques, soit il est utilisé pour réaliser un Western blot, afin de détecter les protéines recombinantes à l'aide d'anticorps spécifiques aux tag 6 x His ou *c-myc* des protéines recombinantes.

Dans un premier temps, on coule dans un moule de 0,75 ou 1,5 mm, constitué de deux plaques de verre, un gel de séparation composé d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5/1 ; v/v ; volume/volume), de Tris HCl pH 8,8, de SDS, d'ammonium persulfate (APS) et de TEMED (N,

**Tableau 12 : Composition des gels de séparation et de concentration qui composent les gels électrophorèse de type SDS-PAGE, de 12 et 15 %. Ces volumes permettent de réaliser un gel de 1,5 mm ou deux gels 0,75 mm.**

	<b>Gel de séparation (10 mL) 12 %</b>	<b>Gel de séparation (10 mL) 15 %</b>
<b>Eau mQ</b>	2,05 mL	1,05 mL
<b>30 % Acryl/Bis</b>	4 mL	5 mL
<b>1 M Tris-HCl pH 8,8</b>	3,75 mL	3,75 mL
<b>10 % SDS</b>	100 µL	100 µL
<b>10 % APS</b>	100 µL	100 µL
<b>TEMED</b>	4 µL	4 µL
	<b>Gel de concentration (8 mL) 12 %</b>	<b>Gel de concentration (8 mL) 15 %</b>
<b>Eau mQ</b>	5,03 mL	5,03 mL
<b>30 % Acryl/Bis</b>	1,03 mL	1,03 mL
<b>1 M Tris-HCl pH 6,8</b>	1,05 mL	1,05 mL
<b>10 % SDS</b>	80 µL	80 µL
<b>10 % APS</b>	80 µL	80 µL
<b>TEMED</b>	8 µL	8 µL



*N, N', N'*-tétraméthyléthylènediamine), selon le [tableau 12](#) (en bleu). Suivant la taille des protéines, deux concentrations de gel (12 et 15 %) sont possibles. Le gel de séparation est coulé en premier dans le support permettant la confection de gels SDS-PAGE. La ligne d'horizon du gel peut être lissée en déposant délicatement de l'eau à la surface du gel, ou de l'isopropanol. Une fois que le gel est polymérisé (la polymérisation se fait à température ambiante, grâce aux UV de la lumière naturelle. Elle est réalisée en 15 min environ), l'eau ou l'isopropanol ajouté est éliminé, et rincé dans le cas de l'imidazole avec de l'eau mQ. On coule alors le gel de concentration sur le gel de séparation. Il est composé des mêmes solutions que le gel de séparation, excepté le Tris HCl qui est à pH 6,8, et les réactifs qui sont dans des concentrations différentes ([tableau 12](#), en vert). Après avoir versé le deuxième gel, un peigne permettant la formation des puits est ajouté. Ce gel polymérise en 5 min environ à température ambiante.

Une fois le deuxième gel polymérisé, le peigne est retiré délicatement, et le gel est placé dans la cuve électrophorèse, contenant du tampon TGS (Tris Glycine SDS) 1 X.

#### III.2.4.b. Migration des protéines par SDS-PAGE

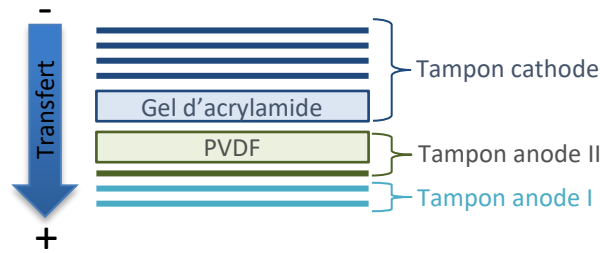
Les échantillons à faire migrer (de 10 à 20 µL suivant les peignes et l'épaisseur des gels utilisés) sont mélangés avec un tampon appelé « loading buffer » 5 X (Tris HCl 250 mM pH 6,8, SDS 10 %, Glycérol 30 % [v/v], dithiothréitol 10 mM, Bleu de Bromophénol 0,05 % [p/v]), pour une concentration finale de 1 X. Les échantillons sont ensuite incubés 5 min à 95°C, afin de dénaturer les protéines, ce qui permet une migration des protéines suivant leur taille.

Puis les échantillons ainsi qu'un marqueur de taille sont déposés à l'intérieur des puits. Dans le cadre de la vérification de la purification des protéines recombinantes en système hétérologue, il est important de faire migrer le « Flow Through » et les échantillons de lavage également, dans le cas où les protéines recombinantes se seraient mal accrochées à la colonne.

Les échantillons sont ensuite mis à migrer à 25 mA, puis lorsque les échantillons ont pénétré le gel de concentration, ils sont mis à migrer entre 30 et 35 mA. Une fois que la migration est satisfaisante, le gel SDS PAGE est alors récupéré, puis il est soit coloré au bleu de Coomassie afin de visualiser les bandes protéiques séparées, soit il est utilisé pour réaliser un western blot.

#### III.2.4.b. Coloration des bandes protéiques au bleu de Coomassie

La coloration au bleu de Coomassie est réalisée grâce à la solution « PageBlue™ Protein Staining Solution » (Thermo Fisher scientific). Pour cela, le gel est placé dans un récipient supportant le chauffage au micro-onde, dans de l'eau mQ. Le tout est chauffé pendant 1 min, puis le gel est placé sous agitation douce pendant 4 min, avant d'éliminer l'eau. Cette étape est répétée 2 fois. Puis l'eau du dernier lavage est éliminée, et la solution PageBlue™ est versée sur le gel, de façon à ce que celui-ci soit totalement recouvert. Le tout est chauffé pendant 30 sec au micro-onde. La solution ne doit pas bouillir. Le gel est alors placé sous agitation douce pendant 20 min. La solution est alors éliminée (elle peut être réutilisée pour



**Figure 49 : Transfert d'un gel d'électrophorèse sur membrane : Montage du gel d'acrylamide SDS-PAGE, de la membrane PVDF, et des papiers Whatman® imbibés de différents tampon, pour le transfert de protéines en système semi-sec.**

**Tableau 13 : Programmes de transfert de protéines sur membrane (PVDF ou nitrocellulose) pour Western blot.**

<b>1 mini gel</b>	Gel 0,75 mm	25 V 1,0 A 30 min
	Gel 1,5 mm	25 V 1,3 A 10 min
<b>2 mini gel ou 1 midi gel</b>	Gel 0,75 mm	25 V 1,0 A 30 min
	Gel 1,5 mm	25 V 2,5 A 10 min

d'autres gels), et le gel est rincé 2 fois à l'eau mQ. Puis le gel est décoloré sous agitation douce dans de l'eau mQ, de 5 min à une nuit. L'ajout de papier absorbant dans le récipient permet également d'améliorer la décoloration du gel, permettant la révélation des bandes protéiques.

La détection de cette solution est de 5 à 500 ng de protéines (pour des quantités inférieures, la coloration au nitrate d'argent permet de visualiser à partir de 0,2 ng de protéines par bande).

### III.2.5. Détection des PG recombinantes par Western blot

Pour réaliser un Western blot, il est nécessaire d'effectuer au préalable une migration SDS-PAGE (avec un gel de 1,5 mm préférentiellement, ce qui permet de faire migrer 20 µL d'échantillons au lieu de 10 µL. Voir paragraphe précédent), puis de transférer les protéines sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride). La membrane PVDF peut être colorée au Rouge Ponceau afin de vérifier que le transfert s'est déroulé correctement, puis elle est décolorée, et le western blot (la fixation d'anticorps) peut être réalisé.

#### III.2.5.a. Transfert des protéines du SDS-PAGE sur membrane PVDF

Le transfert des protéines du gel SDS-PAGE sur la membrane PVDF est réalisée grâce à une électrophorèse en cellule de transfert semi-sec (Transfert-Blot® Turbo™ Transfert System, Bio Rad), et à différents tampons : un tampon cathode (25 mM de Tris pH 9,4, 40 mM de Glycine, éthanol 10%), un tampon anode I (300 mM de Tris pH 10,4, éthanol 10%) et un tampon anode II (25 mM de Tris pH 10,4, éthanol 10 %)

Le gel SDS-PAGE est incubé 15 min dans le tampon cathode. En parallèle, la membrane PVDF découpée à la taille du gel est incubée sous agitation douce 15 sec dans de l'éthanol pur, puis 2 min dans de l'eau adoucie, et pour finir 5 min dans le tampon anode II. Puis le gel et la membrane sont positionnés sur la plaque de la cellule de transfert, entre plusieurs couches de papier Whatman® (Sigma-Aldrich®, Merck) de la taille du gel, imbibés des différents tampons ([figure 49](#)).

Le programme de migration est choisi en fonction de la taille et du nombre de gels ([tableau 13](#)).

#### III.2.5.b. Coloration de la membrane PVDF au Rouge Ponceau

Après transfert, la membrane peut être colorée avec du Rouge Ponceau (0,2 % de Ponceau S, référence P3504 Sigma-Aldrich®, Merck ; et 3 % d'acide trichloroacétique), qui est une coloration réversible des protéines sur membrane. La membrane est trempée dans la solution jusqu'à ce qu'elle soit entièrement colorée, puis elle est rincée à l'eau pour éliminer le surplus et permettre l'apparition des bandes protéiques. La membrane est ensuite séchée entre des feuilles de papier absorbant. Après avoir pris une photo de la membrane présentant les bandes protéiques, celle-ci est à nouveau rincée à l'eau, pour éliminer le maximum de coloration, puis rincée dans de l'éthanol pur. Elle est ensuite séchée à nouveau entre des



feuilles de papier absorbant. Les résidus éventuels de rouge Ponceau ne nuisent pas au Western blot, car ils seront éliminés dans les premières étapes de celui-ci. La membrane séchée peut être conservée durant plusieurs mois au sec et à l'abri de la lumière avant d'être analysée par Western blot.

### III.2.5.c. Réalisation du Western blot

#### *Principe du Western blot*

La membrane PVDF est d'abord incubée dans des solutions qui vont permettre la saturation de sites non-spécifiques aux anticorps de protéines. Puis la fixation des anticorps sur la membrane est réalisée. Il est parfois nécessaire d'incuber un anticorps primaire puis un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire afin d'augmenter le signal de détection, mais au cours de cette étude, seuls des anticorps primaires ont été utilisés : soit un anticorps anti-his, soit un anti-corps anti-*c-myc*, directement liés à une enzyme permettant la révélation. Après la fixation des anticorps, la membrane est lavée plusieurs fois pour éliminer les anticorps excédants. Puis elle est séchée, et révélée grâce à un système de détection adapté aux anticorps utilisés.

#### *Saturation de la membrane*

Cette étape nécessite deux tampons : du TBS 10 X (200 mM de Tris pH 7,4 et 1,50 M de NaCl), qui permet de réaliser extemporanément du TBST (TBS 1 X et 0,5 % de Tween®20, Sigma-Aldrich®, Merck)

La membrane PVDF est incubée 30 min dans du lait à 4 % (à partir de lait en poudre demi-écrémé commercial) dans du tampon TBST pour saturer la membrane. Puis la membrane est lavée 2 fois quelques secondes avec le tampon TBST.

#### *Fixation des anticorps*

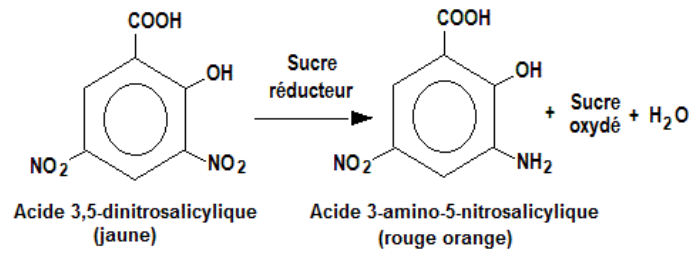
La membrane est alors incubée 1 h dans une solution de lait 0,5 % dans du TBST, avec l'anticorps dilué au 1/5 000. Elle est ensuite lavée par deux lavages de 12 min dans du TBST, un lavage de 5 min dans du TBST, et pour finir un lavage de 5 min dans de l'eau adoucie.

La membrane est alors séchée à l'air libre sur du papier absorbant, puis elle est révélée.

#### *Révélation des anticorps par le kit Pierce™ DAB Substrate*

Les anticorps utilisés dans cette étude sont liés à une peroxydase de raifort. Pour révéler sa présence, le kit Pierce™ DAB Substrate (Thermo Fisher scientific) est utilisé.

Ce kit fournit à la peroxydase sont substrat, le DAB (3,3' -diaminobenzidine tetrahydrochloride), ce qui permet la détection chromogénique de son activité. En effet, le DAB réagit avec la peroxydase en présence de peroxyde, ce qui conduit à la formation d'un produit insoluble brun, à l'endroit où la peroxydase conjuguée aux anticorps est liée à échantillons.



**Figure 50 : Conversion du DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) en ANS (acide 3-amino-5-nitrosalicylique) par les sucres réducteurs.** Cette réaction permet de quantifier les sucres réducteurs en solution, en dosant la quantité d'ANS formé au cours de la réaction, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde entre 540 et 550 nm. <https://www.ilephysique.net/sujet-dosages-288153.html>

La révélation est très rapide. Elle est réalisée en mélangeant 0,5 mL de la solution DAB 10 X avec 4,5 mL du tampon « Stable Peroxide Substrate Buffer ». Ce mélange est réparti sur la membrane, et la coloration brune apparaît en quelques minutes. La réaction est stoppée par un rinçage à l'eau.

Elle est ensuite séchée à l'aide de papier absorbant, et prise en photo. La coloration brune disparaît après quelques semaines.

### III.2.6. Test d'activité PG par dosage au DNS

#### III.2.6.a. Principe du dosage de l'activité PG au DNS

L'activité PG est proportionnelle au nombre de sucres réduits du substrat (PGA) par l'enzyme. La mesure du nombre de sucres réducteurs permet donc d'estimer l'activité PG. Cette mesure est réalisée grâce au test DNS, basé sur la réduction du DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) en ANS (acide 3-amino-5-nitrosalicylique), et durant cette réaction, le groupe aldéhyde des sucres réducteurs est oxydé en acide carboxylique (Saqib and Whitney, 2011). L'ANS est un composé aromatique qui absorbe fortement la lumière à 540 - 550 nm. La réaction est au départ jaune grâce au DNS, puis devient rouge-orangée par la présence de l'ANS ([figure 50](#)).

#### III.2.6.b. Réaction des PG purifiées sur le substrat

La réaction des PG purifiées sur le substrat est réalisée en microtubes, dans lesquels 12 µL d'échantillon de protéines d'environ 1 µg/µL sont mélangés avec 12 µL de PGA (référence 81325, Sigma-Aldrich®, Merck) 0,8 % (dans du tampon sodium acétate 50 mM pH 5).

Un « blanc » est également effectué pour chaque échantillon. Pour cela, un volume légèrement supérieur à 12 µL est bouilli 10 min à 100°C. Après refroidissement, 12 µL d'échantillon bouilli sont mélangés à 12 µL de PGA 0,8 % et constitue le témoin négatif.

Pour finir, un témoin positif est effectué en mélangeant 12 µL de la polygalacturonase « *endo*-polygalacturonanase M2 » d'*Aspergillus aculeatus* (EC 3.2.1.15, référence E-PGALUSP, Megazyme) avec 12 µL de PGA 0,8 %.

Chaque échantillon est réalisé en triplicata. Le PGA est ajouté en dernier à la pipette multicanaux afin que les réactions démarrent en même temps.

La réaction est de façon basique incubée 1 à 2 h à 37°C, voir tout une nuit.

#### III.2.6.c. Dosage de l'activité PG au DNS

Pour doser les sucres réducteurs, et donc l'activité PG, 150 µL de DNS (DNS 1 %, NaOH 1 %, sulfite de sodium 0,05 %, potassium sodium tartrate tétrahydrate 30 %) sont ajoutés dans chaque microtube à l'aide d'une pipette multicanaux. Les microtubes sont alors incubés dans un thermocycleur 8 min à 95°C. Après refroidissement, 100 µL des réactions sont déposés dans les puits d'une plaque du spectrophotomètre à lecteur de plaque (Power Wave XS2, Biotek Instruments©). L'absorbance à 550 nm est mesurée.





La concentration en sucres réducteurs est estimée à l'aide d'une gamme de GalA, composée de 0 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 nM de GalA. L'activité PG est exprimée en nmol de Gal A/ $\mu$ g de protéine.

#### III.2.6.d. Caractérisation *in vitro* de l'activité PG

Le test d'activité des PG purifiées peut être adapté afin de connaître le pH et la température optimale des enzymes, ainsi que leurs substrats préférentiels, leur  $V_m$  (vitesse maximale) et leur  $K_m$  (constante de Michaelis).

##### *pH optimal*

Différents tampons sont utilisés pour connaître le pH optimum des enzymes, allant de pH 4 à pH 8. Les tampons pH 4 et 5 sont composés de sodium acétate 50 mM, et les tampons pH 6, 7 et 8 sont composés de sodium phosphate 50 mM.

Il est important de vérifier le pH à l'aide d'une micro-sonde après dissolution du PGA, car celui-ci est très acide. Il est donc nécessaire de réajuster le pH. Une gamme étalon pour chaque pH est réalisée afin d'avoir le coefficient d'extinction molaire pour chaque pH.

Le substrat utilisé est donc le substrat de base (PGA) dissous dans les tampons aux différents pH, et les réactions sont incubées 1 h à 37°C. La révélation puis la lecture est réalisée comme au paragraphe III.2.6.c.

##### *Température optimale*

Pour réaliser ce test, les tampons et réactifs sont les mêmes que dans les conditions de base (paragraphe II.5.2.b.), hormis que les tubes sont placés dans différentes étuves de 6, 30, 40, 50, 65, 80 et 95°C pendant 1 h, pour réaliser le test d'activité. La révélation puis la lecture est réalisée comme au paragraphe III.2.6.c.

##### *Substrat préférentiel*

Pour ce test, au lieu d'utiliser seulement du PGA 0,8 %, d'autres substrats (à 0,8 %) sont utilisés : des pectines de citron à différents DM (30, 35, 71, 55-70, et supérieur à 85 %), des pectines de pomme, et des pectines de betterave.

Le tampon utilisé est le tampon sodium acétate 50 mM à pH 5, et la réaction est réalisée 1 h à 37°C. La révélation puis la lecture est réalisée comme au paragraphe III.2.6.c.

##### *Détermination du $V_m$ et du $K_m$ des PG*

Les paramètres cinétiques des enzymes sont déterminés en faisant varier la concentration en substrat. Le substrat utilisé est le PGA à différentes concentrations : 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 12 ; 16 ; 20 et 24 mg.mL<sup>-1</sup>, dans du tampon sodium acétate 50 mM à pH 5. La réaction est incubée pendant 20 min à 37°C afin d'être dans les conditions de vitesse initiale de la réaction. La révélation puis la lecture est réalisée comme au paragraphe III.2.6.c.



La détermination du  $K_m$  et du  $V_m$  est réalisée par la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk.

Plus le  $K_m$  est élevé, plus la concentration de substrat nécessaire à une activité importante de l'enzyme est élevée et donc plus le  $K_m$  est faible, plus l'enzyme a de l'affinité pour son substrat.



## Chapitre V : Imagerie micro et macroscopique

### V.1. Préparation d'échantillons GUS

#### V.1.1. Principe de la coloration GUS

Le gène rapporteur *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase) est un système très utilisé pour analyser l'expression de gènes dans des plantes transformées. Le principe est de placer le gène de la  $\beta$ -glucuronidase (provenant de *E. coli*) sous le contrôle du promoteur natif du gène étudié. Ainsi, l'enzyme sera produite uniquement dans les cellules où le promoteur du gène d'intérêt est activé. La  $\beta$ -glucuronidase est capable de cliver une large variété de  $\beta$ -glucuronides, dont beaucoup d'entre eux sont disponibles dans le commerce en tant que substrats spectrophotométriques, fluorométriques et histochimiques. Pour révéler les cellules ayant produit la  $\beta$ -glucuronidase, les plantes sont donc plongées dans un tampon possédant un des substrats de cette enzyme : le X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoyl  $\beta$ -D-glucuronide). Ce composé est incolore, mais devient bleu une fois dégradée par la  $\beta$ -glucuronidase (Jefferson et al., 1987).

#### V.1.2. Coloration GUS

##### V.1.2.a. Coloration avec le tampon GUS classique

Les plantes à colorer sont plongées dans du tampon GUS (tampon sodium phosphate 100 mM pH 7,2, Na<sub>2</sub>-EDTA 10 mM, Triton X-100 0,1 %, X-Gluc 2 mM), dans des plaques à puit. Elles doivent être totalement immergées.

Le tampon GUS est un mélange de deux solutions : une solution A 4 X composée de sodium phosphate 1 M pH 7,4, de NaOH-EDTA 0,5 M et de Triton X-100 10 %. Cette solution peut être conservée plusieurs mois à température ambiante. Elle est mélangée à la solution X-Gluc 40 X, composé de X-GlcA cyclohexylammonium salt (référence X1405, Duchefa Biochemie) 40 mM, dissous dans du *N,N*-Diméthylformamide. Pour 10 mL de tampon GUS, 2,5 mL de la solution A 4 X est mélangé à 250  $\mu$ L de solution X-Gluc 40 X, et le volume est ajusté avec de l'eau mQ. Le tampon GUS doit être protégé de la lumière, et peut être conservé à -20°C.

Les échantillons baignant dans le tampon GUS sont placés dans une cloche à vide. Le vide est créé dans la cloche, puis il est cassé après quelques secondes. Cette opération est répétée deux fois. Le vide est à nouveau créé, et est maintenu pendant 10 min. Cette étape favorise la pénétration du tampon GUS à l'intérieur des tissus. La coloration est réalisée une nuit à 37°C, à l'abri de la lumière (le tampon GUS étant sensible à la lumière).

Suite à cette incubation, le tampon GUS est éliminé. Les plantes sont ensuite décolorées avec de l'éthanol 95 %, afin d'éliminer la chlorophylle. Cette étape peut prendre deux jours pour que les échantillons soient correctement décolorés. Les échantillons sont ensuite conservés dans de l'éthanol 50 % à 4°C avant observation. La coloration est stable dans le temps.



### V.1.2.b. Tampon GUS supplémenté de ferri-/ ferrocyanide

Dans le cas où la coloration GUS serait trop importante, il est possible d'ajuster celle-ci soit en diminuant le temps d'incubation des plantes dans le tampon GUS, soit en ajoutant à celui-ci un mélange de ferricyanide/ ferrocyanide (p/p ; Mascarenhas and Hamilton, 1992). Ce mélange (qui est un couple d'oxydoréduction) permet d'éviter les diffusions artéfactuelles des produits de la dégradation du X-Gluc par la  $\beta$ -glucuronidase vers les cellules et tissus adjacents, et diminuant ainsi l'activité de l'enzyme GUS. En effet, le ferricyanide est un inhibiteur de cette enzyme. À forte concentration, la coloration GUS disparaît totalement.

Au cours de cette étude, un tampon GUS supplémenté de 2,5 mM de ferri-/ ferrocyanide a été utilisé pour certaines lignées sous le contrôle du promoteur du gène *PG R*.

### V.1.3. Observation de la coloration GUS

Suivant la partie de la plante considérée, l'observation de la coloration peut se faire soit à la loupe binoculaire pour les organes relativement grands (feuilles, racines dans leur intégralité, hypocotyles étiolés), soit au microscope à lumière transmise.

Pour pouvoir être observés au microscope à lumière transmise, les échantillons sont montés entre lame et lamelle dans une solution de chloralhydrate (8/3/1 [p/v/v] de chloral hydrate/glycérol/ eau ; Kästner et al., 2014) à pH 7 (Schöpke et al., 1997), pendant quelques heures voir une nuit. Cette solution rend les tissus transparents sans affecter la coloration GUS.

## V.2. Observations

Différents types d'observations ont été nécessaires pour cette étude : des observations à la loupe binoculaire, des observations au microscope à lumière transmise, et enfin des observations au microscope confocal.

### V.2.1. Loupe binoculaire

Deux loupes binoculaires ont été utilisées : une loupe Leica EZ4 HD qui a servi à imager les différentes pièces des plantes GUS, et un stéréomicroscope M125 couplé à une caméra DFC 295 (Leica) au laboratoire Glyco-MEV (EA 4358), qui a servi à observer en détail les racines du mutant *pg r* en comparaison avec les racines du Col-0.

### V.2.2. Microscope à lumière transmise

Le microscope Nikon eclipse 90i a été utilisé pour visualiser les racines des plantes GUS, montées entre lame et lamelle avec une solution de chloralhydrate. De plus, le microscope Leica DMLB couplé à une caméra DFC300FX du laboratoire Glyco-MEV (EA 4358) a été utilisé pour observer les BLC (border cell-like) des racines du mutant *pg r* et du sauvage. Les racines ont été montées entre lame et lamelle avec de l'eau. Les lamelles utilisées sont des lames adhésives SuperFrost Plus (VWR™).

**Tableau 14 : Spectres d'émission et d'excitation des fluorophores utilisés.**

<b>Fluorophore</b>	<b>Longueur d'onde d'excitation</b>	<b>Spectre d'émission</b>
<b>eYFP</b>	514 nm	516-597 nm
<b>GFP</b>	488 nm	493-549 nm
<b>Iodure de propidium</b>	561 nm	566-718 nm (racines <i>A. thaliana</i> ) 570-655 nm (feuilles tabac)



### V.2.3. Confocal

Les observations au microscope confocal ont été réalisées à la plateforme iCAP d'Ingénierie Cellulaire et Analyses des Protéines de l'Université Picardie Jules Verne, équipée d'un microscope confocal Zeiss LSM780.

#### V.2.3.a. Traitement des échantillons avant observation

##### *Coloration des parois des cellules de racines*

La paroi des cellules racinaire est colorée par un bain de 5 à 15 min dans  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'iodure de propidium dans des plaques à puits, suivi de deux lavages à l'eau mQ. Les racines sont montées entre lame et lamelle dans un mélange d'eau et de glycérol (v/v), le glycérol permettant d'augmenter le signal de fluorescence.

##### *Observation des expressions transitoires en feuilles de tabac*

###### ➤ *Coloration des parois des cellules de tabac*

Pour colorer la paroi, les fragments de feuilles de tabac sont plongés 5 min dans  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'iodure de propidium dans des plaques à puits, puis sont rincés deux fois à l'eau mQ avant d'être montés entre lame et lamelle. Le montage est constitué d'eau et de glycérol (v/v).

###### ➤ *Plasmolyse des feuilles de tabac*

La plasmolyse des cellules, qui consiste à vider l'eau contenue dans les vacuoles par osmose, permet de séparer la membrane de la paroi cellulaire, afin d'affiner la localisation de protéines membranaires ou pariétales.

Après coloration et rinçage, les fragments sont incubés 40 min dans du sorbitol 1 M dans de l'eau de ville (pH 8). Les fragments de feuilles sont ensuite montés entre lame et lamelle dans du sorbitol 1 M.

#### V.2.3.b. Observation de différents fluorophores

Plusieurs fluorophores ont été utilisés : la GFP (green fluorescent protein), la eYFP (enhanced yellow fluorescent protein), ainsi que l'iodure de propidium. Le principe des molécules fluorescentes est qu'elles émettent une fluorescence dans des longueurs d'onde spécifiques (appelé spectre d'émission), si elles sont excitées avec des longueurs d'ondes spécifiques (appelée longueur d'onde d'excitation). Les spectres des fluorophores utilisés sont récapitulés dans le [tableau 14](#). Deux spectres d'émission ont été utilisés pour l'iodure de propidium car les chloroplastes des feuilles de tabac sont marqués par l'iodure de propidium au spectre d'émission utilisé pour les racines d'*A. thaliana*.



## Chapitre VI : Analyses statistiques

### VI.1. Logiciel utilisé

Les analyses statistiques de ce projet ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® version 7.00 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

### VI.2. Nécessité d'analyses statistiques

Elles ont été nécessaires pour évaluer la valeur statistique des différences de longueurs de racines ou d'hypocotyles entre les mutants et les sur-expresses des gènes d'intérêt par rapport au sauvage, ainsi que la différence de densité de racines latérales.

### VI.3. Tests réalisés

#### VI.3.1. Vérification de la normalité et de l'homogénéité des échantillons.

Les tests de Shapiro-Wilk et d'Agostino et Pearson ont d'abord été réalisés pour savoir si les échantillons suivent une loi normale. Si ce n'est pas le cas, le test de comparaison multiple qui sera appliqué sera un test non-paramétrique. Si les échantillons suivent une loi normale, un test d'homogénéité (test de Brown-Forsythe) est alors appliqué. Si les échantillons ne sont pas homogènes, le test de comparaison multiple qui sera appliqué sera également un test non-paramétrique.

#### VI.3.2. Élimination des valeurs aberrantes

Les valeurs aberrantes peuvent être éliminées grâce au test de ROUT ( $Q = 5\%$ ).

#### VI.3.3. Comparaison des mutants et sur-expresses au sauvage

Afin de comparer les données des mutants ou des sur-expresses par rapport au sauvage, des tests de comparaison multiple par rapport au sauvage ont été réalisés. Si les échantillons suivent une loi normale et sont homogènes, le test appliqué est le test paramétrique de comparaison multiple One-way ANOVA (test de Dunnett,  $\alpha = 5\%$ ).

Si les échantillons ne suivent pas une loi normale, ou s'ils suivent une loi normale mais qu'ils ne sont pas homogènes, un test non-paramétrique est utilisé (comparaison multiple de Dunn,  $\alpha = 5\%$ ).

### VI.4. Mise en forme des résultats

Les résultats de la comparaison multiple sont présentés sous forme d'histogrammes, et la valeur de la  $P_{\text{value}}$  ( $P_v$ ) est indiquée par :

ns :  $P_v > 0,05$  ; \* :  $P_v \leq 0,05$  ; \*\* :  $P_v \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $P_v \leq 0,001$  ; \*\*\*\* :  $P_v \leq 0,0001$ .

Proteins predicted			
Protein name	omega-site position	Specificity	Protein sequence
AT3G15720	430	100.0%	MKKKTWFLNFSLFFLQIFTSNALDVTOFGAVGDGVTDDSOAFL KAWAVCSGTGDGQFVVVPAGMTFMLQPLKFGSCKSTPVFVOML GKLVAPSKGNWGRDQWILFTDIEGLVIEGDGEINGOGSSWWE HKGSRPTALKFRSCNNLRSLGTHLDSFMAHIIHSECNYVTISS LRINAPESSPNTDGDVIGASSNVVIQDCIATGDDCIAINSGTS NIHISGIDCGPGHGIGISGLGKDEGTATVENVCVONCNFRGTMN GARIKTWQGGSGYARMITFNGITLDNVENPIIIDOFYNGGSDN AKDRKSSAVEVSKVVFNSFIGTSKSEYGVDFRCSEVPCTEFL RDMKIETASSGSGOVAQGCCLNVRGASTIAVPGLECLELSTDMF SSAQLLEQTCSAQSVPRTTQPMQDPIWVFGSRGKQLRVYNI AIIVSFISLVTYLLAR
<b>PME11</b>			
AT1G48020	151	99.6%	MAANLRNNAFLSMLFLLIGSSYAITSSSEMSTICDKTLNPSFC LKFLNTRKFAFPNLOALAKTTLDSTOARATOTLKKLQSIIDGGVD PRSKLAYRSCVDEYESAIGNLEEAFFHLASGDGMGMNPKVSAAL DGADTCLDDVKRLRSVDSVVVNSKTIKNLGGIALVLSNMLPRN
AT3G48950	449	99.6%	MIRPTFGLLVFLAIFLFFAIESRSHRNSVTSKIEFSAIINCRKHS AIIIDFGAVDGGTNTKAFRNAISKLSQMATDGGAAQLVVPFGK WLPCEFNLTSHFTLPIQRGATILASQDESEVPVIAPLPSYGRGR DCTGTGRFNLSISGTLNFDVVITGNNGTINQGOQWWDKFKKQ FKITRPLYLIEILFSKNIQISNITLIDSPSNHHPYVCNSVIVKS VTVLAQVTVNTDGINPDSCNTFLIEDCYIVSGDDCIAVRSQWD QYGIKFGMPTQQLSIRRTCTISPKSAGVALGSEMGGIKVRIE DVTLTNTESAIRIKTAVGRGAYVKDIYARRITMKMTKVFVWMSG NYGSHDDEGFDPKALPEITNINVRDMTAENVMTMSASLDGIDKDP FTGICISNVTIALAAKAKMWNCTDVAAGVTSRVTPPCSLLPE KKAQAKNVDCAPFSDLIPIESVVLKKEFL
AT1G60390	594	99.0%	MNNIEATLFLCFFCIFSSSNVHFAGAKQTAGNITPSENPFPA SLIRYWNHNGDSEKPSFFLSKASPLTAVDSTRFASLASNHAL NTHHSDFCSAKLFCEPFLAHSLEKHGDDVNFAYSGKMFNY GSDRLSGADSFKNYSGGDNTAVDSFRYRSNSAGHDDGFTNYAG EVNVAQDSFTTYATCTGCGSGEFTNYNTDANEENGRFTSYSDKA NGRSQTFPTYSENGNTGYQSFYSKNGGAPNEFSGYGTGSNV VNTGPTKYGESANGANDSFTSYGENGNVPVNEFKYGDGNGGAV YCFKRYRQSNIGVDSFSSYARNSNNEKVNFNKGFENLSDN FTYGQDNVGGNVSEKTYGQGSFKVYTKDGVVVFARYSNVSSN GKTVNKNVVEKGFREAMELKECTLMQMPDIKDKMPPKRTFLPRNI VKNLPPSSSTIGEINRWFVAGENSMMAGIISAVSACERPAHSG ETKRCVGSAAEDMIDPATSVLGRGVVVRTENVVGSKKVVIGKV NGINGGDVTRAVSCHOSLYPYLLYCHSVPRVRVYEDLLDPKS LEKINHGAICHIDTSAWSPSHGAPLALGSGPGQIEVCHWIFEN DMTWNIIID

**Figure 51 : Résultats de la recherche de protéines présentant une ancre GPI putative parmi les PG d'A. thaliana (d'après PredGPI).** La protéine PME11 (at1g48020) dont la présence d'une ancre GPI a été prouvée expérimentalement (De Caroli et al., 2011), a été utilisée comme référence. L'acide aminé en rouge correspond à la position du site  $\omega$ , et la séquence en bleu correspond au peptide signal de l'ajout de l'ancre GPI. La probabilité de la présence d'une ancre est donnée en pourcentage. Le pourcentage en vert correspond à une présence hautement probable, en jaune à une présence probable, en marron à une présence faiblement probable, et enfin en rouge une absence d'ancre GPI putative. <http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/>

# Résultats

## Chapitre I : Recherche des gènes candidats

### I.1. Recherche d'une PG candidate à ancre GPI

#### I.1.1. Recherche bio-informatique de PG avec une ancre GPI

Les PG font partie de la famille multigénique « glycoside hydrolase 28 » comptant 67 membres chez *A. thaliana* (Senechal and Wattier et al., 2014). Afin d'identifier des PG avec une ancre GPI putative, le logiciel PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/>) a été utilisé. Les logiciels de prédiction des protéines à ancre GPI identifient des motifs spécifiques des peptides signaux de sécrétion à l'extrémité N-terminale de la protéine, et d'autres correspondant à des peptides signaux d'ajout de l'ancre GPI du côté C-terminal. Ils permettent également d'identifier le site  $\omega$  où le peptide signal à l'extrémité C-terminal est clivé pour être remplacé par une ancre GPI (voir le chapitre IV du matériel et méthode, paragraphe IV.8.).

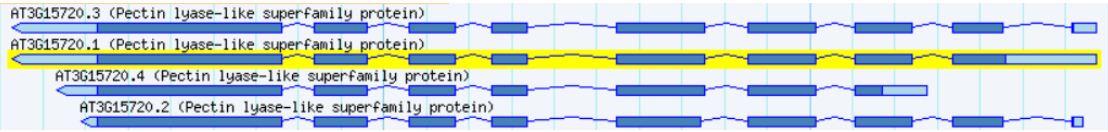
Le logiciel PredGPI a trouvé 3 PG parmi les 67 PG d'*A. thaliana* avec une probabilité importante d'être liées à une ancre GPI (**figure 51**). La PG AT3G15720 présente un score de 100 %. Selon le logiciel, la présence d'une ancre GPI est donc « hautement probable ». La PG AT3G48950 possède un score de 99,6 %, la présence de l'ancre est considérée comme « probable ». Enfin, AT1G60390 possède un score de 99,0 %. Le logiciel considère que ce score correspond à la présence « faiblement probable » d'une ancre GPI. Ces trois gènes ont donc été sélectionnés pour notre étude.

Par la suite, d'autres logiciels de prédiction des ancras GPI ont été également consultés pour comparer les résultats avec ceux obtenus avec PredGPI. L'analyse par le logiciel big-PI Predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant_server.html)) n'a pas identifié de PG pouvant présenter une ancre GPI. Cependant, il ne parvient pas non plus à détecter la présence d'une ancre GPI à la protéine PME11 (AT1G48020), pour laquelle la liaison à la membrane *via* une ancre GPI a pourtant été prouvée expérimentalement (De Caroli et al., 2011). Chez cette protéine, PredGPI a assigné le score de 99,6 % (ancre GPI probable ; **figure 51**).

Enfin, le logiciel GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) a trouvé 6 PG avec un signal en C-terminal, dont 5 PG avec une ancre GPI putative, car elles possèdent à la fois un signal en C-terminal ainsi qu'en N-terminal. Ces 5 PG sont AT1G02790 (meilleure correspondance pour le site de clivage en C-28), AT1G43090, AT1G43100, AT3G07830 et AT3G15720 (meilleure correspondance pour le site de clivage en C-27). La PG AT3G15720 ressort donc à la fois avec ce logiciel et le logiciel PredGPI.

Entre les différents logiciels consultés, c'est donc un total de 7 PG qui sont prédites pour être potentiellement liées à une ancre GPI, ce qui représente donc une minorité parmi les 67 PG d'*A. thaliana*. Pour savoir si la liaison des PG à une ancre GPI est une modification post-traductionnelle conservée, nous nous sommes intéressés à la présence de PG prédites pour

### AT3G15720



### AT3G48950



### AT1G60390

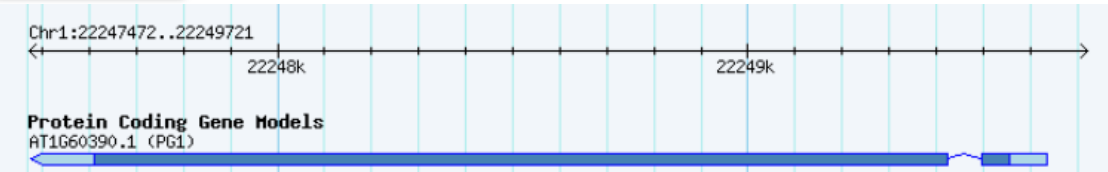


Figure 53 : Représentation schématique des séquences génomiques de AT3G1720, AT3G48950 et AT1G60390. D'après le site TAIR (<https://www.arabidopsis.org>).

Proteins predicted			
Protein name	omega-site position	Specificity	Protein sequence
AT3G15720.1	430	100.0%	MKKKTWFLNFSLFFLQIFTSSNALDVTQFGAVGDGVTDDSQAFK KAEAVCSGTGGQFVVPAGMTFMLQPLKFGGSCCKSTPVFVQML GKLVAPSKGNWKGDKDQWILFTDIEGLVIEGDGEINGQSSWWE HKGSRPTALKFRSCNNLRLSGLTHLDSMAHIHISECNYVTISS LRINAPESSPNTDGDIVGASSNVVIQDCIIATGDDCIAINSCTS NIHISGIDCGPHGISIGSLGKDGETATVENVCVQNCNFRGTMN GARIKTWQGGSGYARMITFNGITLDNVENPIIIDQFYNGGSDN AKDRKSSAVEVSKVVFNSFIGTSKSEYGVDFRCSERPCTEIFL RDMKIETASSGSGQVAQGQCLNVRGASTIAVPGLECLELSTDMF SSAQLLEQTCMSAQSVQPRTTTQPMQDPIWVVFQSRGKQLRVYNI AILVSFISLVTYILAR
AT3G15720.2	426	99.9%	MKKKTWFLNFSLFFLQIFTSSNALDVTQFGAVGDGVTDDSQAFK AWEAVCSGTGGQFVVPAGMTFMLQPLKFGGSCCKSTPVFVQMLG KLVAPSKGNWKGDKDQWILFTDIEGLVIEGDGEINGQSSWWEH KGSRPTFRSCNNLRLSGLTHLDSMAHIHISECNYVTISSLRIN APESSPNTDGDIVGASSNVVIQDCIIATGDDCIAINSCTSNIHI SGIDCGPHGISIGSLGKDGETATVENVCVQNCNFRGTMNGARI KTWQGGSGYARMITFNGITLDNVENPIIIDQFYNGGSDNAKDR KSSAVEVSKVVFNSFIGTSKSEYGVDFRCSERPCTEIFLDMK IETASSGSGQVAQGQCLNVRGASTIAVPGLECLELSTDMFSSAQ LLEQTCMSAQSVQPRTTTQPMQDPIWVVFQSRGKQLRVYNIALLV SFISLVTYILAR
AT3G15720.3	429	99.9%	MKKKTWFLNFSLFFLQIFTSSNALDVTQFGAVGDGVTDDSQAFK AWEAVCSGTGGQFVVPAGMTFMLQPLKFGGSCCKSTPVFVQMLG KLVAPSKGNWKGDKDQWILFTDIEGLVIEGDGEINGQSSWWEH KGSRPTALKFRSCNNLRLSGLTHLDSMAHIHISECNYVTISSL RINAPESSPNTDGDIVGASSNVVIQDCIIATGDDCIAINSCTS NIHISGIDCGPHGISIGSLGKDGETATVENVCVQNCNFRGTMN ARIKTWQGGSGYARMITFNGITLDNVENPIIIDQFYNGGSDNA KDRKSSAVEVSKVVFNSFIGTSKSEYGVDFRCSERPCTEIFL DMKIETASSGSGQVAQGQCLNVRGASTIAVPGLECLELSTDMF SSAQLLEQTCMSAQSVQPRTTTQPMQDPIWVVFQSRGKQLRVYNI AILVSFISLVTYILAR
AT3G15720.4	366	99.6%	MTFMLQPLKFGGSCCKSTPVFVQMLGKLVAPSKGNWKGDKDQWIL FTDIEGLVIEGDGEINGQSSWWEHKGSRPTALKFRSCNNLRLS GLTHLDSMAHIHISECNYVTISSLRINAPESSPNTDGDIVGAS SNVVIQDCIIATGDDCIAINSCTSNIHISGIDCGPHGISIGSL GKDGETATVENVCVQNCNFRGTMNGARIKTWQGGSGYARMITF NITLDNVENPIIIDQFYNGGSDNAKDRKSSAVEVSKVVFNSFI GTSKSEYGVDFRCSERPCTEIFLDMKIETASSGSGQVAQGQ CLNVRGASTIAVPGLECLELSTDMFSSAQLLEQTCMSAQSVQPR TTQPMQDPIWVVFQSRGKQLRVYNIALLVSPFISLVTYILAR

Figure 52 : Probabilité de la présence d'une ancre GPI chez les quatre isoformes de la protéine AT3G15720 (d'après PredGPI).

être liées à une ancre GPI chez des familles de plantes moins évoluées. Nous avons donc étudié la présence de PG à ancre GPI chez *Physcomitrella patens*, une bryophyte, et chez *Brachypodium distachyon*, une poacée. En combinant les résultats des logiciels PredGPI, big-PI Predictor et GPI-SOM, *P. patens* posséderait une seule PG avec une ancre GPI prédite sur une famille multigénique de 11 membres, et *B. distachyon* en posséderait 9 sur 43. La présence de PG liées à une ancre GPI semble donc être conservée, ce qui pourrait indiquer un rôle important de la liaison de certaines PG à une ancre GPI. Ceci est cohérent avec le fait que les mutations de l'assemblage des ancres GPI sont souvent létales, prouvant ainsi leur importance pour la plante (Gillmor et al., 2005; Yeats et al., 2018). Mais la faible représentation des PG à ancre GPI sur la totalité des PG de ces plantes indique également que pour la plupart des PG, l'adressage à certaines zones préférentielles de la membrane n'est pas essentiel à leur fonction.

### I.1.2. Analyse bio-informatique des PG d'*A. thaliana* avec ancre GPI (PredGPI)

#### I.1.2.a. Informations sur les PG avec ancre GPI d'après le site TAIR

Nous avons donc sélectionné comme PG avec ancre GPI candidates les PG d'*A. thaliana* AT3G15720, AT3G48950 et AT1G60390, qui étaient celles trouvées par le logiciel PregPGI.

D'après le site TAIR (the Arabidopsis Information Resource) (<https://www.arabidopsis.org>), AT3G15720 et AT3G48950 font partie de la super-famille « pectin lyase-like », alors que AT1G60390 est uniquement décrite comme étant une polygalacturonase.

La protéine AT3G15720 possède quatre variants : AT3G15720.1 (456 acides aminés [AA]), AT3G15720.2 (452 AA), AT3G15720.3 (455 AA) et AT3G15720.4 (392 AA), qui correspondent à des variations de l'épissage. Sur TAIR, le gène *AT3G15720.1* est le modèle de gène représentatif de *AT3G15720*. Le gène *AT3G15720* est constitué de 7 à 8 exons et 6 à 8 introns, selon les variants ([figure 52](#)).

Bien que les quatre protéines variantes soient dotées de la même séquence à l'extrémité C-terminale prédite par le logiciel PredGPI pour être une séquence signal ancre GPI, seul le variant AT3G15720.1 affiche un score de 100 % pour posséder une ancre GPI. Les variants AT3G15720.2 et AT3G15720.3 possèdent un score de 99,9 %, et AT3G15720.4 un score de 99.6 % ([figure 53](#)).

Le gène *AT3G48950* dispose de 4 exons et 3 introns ([figure 52](#)), et n'a qu'un seul variant (*AT3G48950.1* ; 469 AA).

Enfin, le gène *AT1G60390* est composé de deux exons et un intron ([figure 52](#)), et lui aussi ne possède qu'un seul variant (*AT3G48950.1* ; 624 AA).

#### I.1.2.b. Recherche de peptide signal de sécrétion

Si les protéines AT3G15720, AT3G48950 et AT1G60390 sont prédites pour avoir une ancre GPI, elles possèdent en N-terminal un peptide signal de sécrétion en plus d'un signal ancre GPI

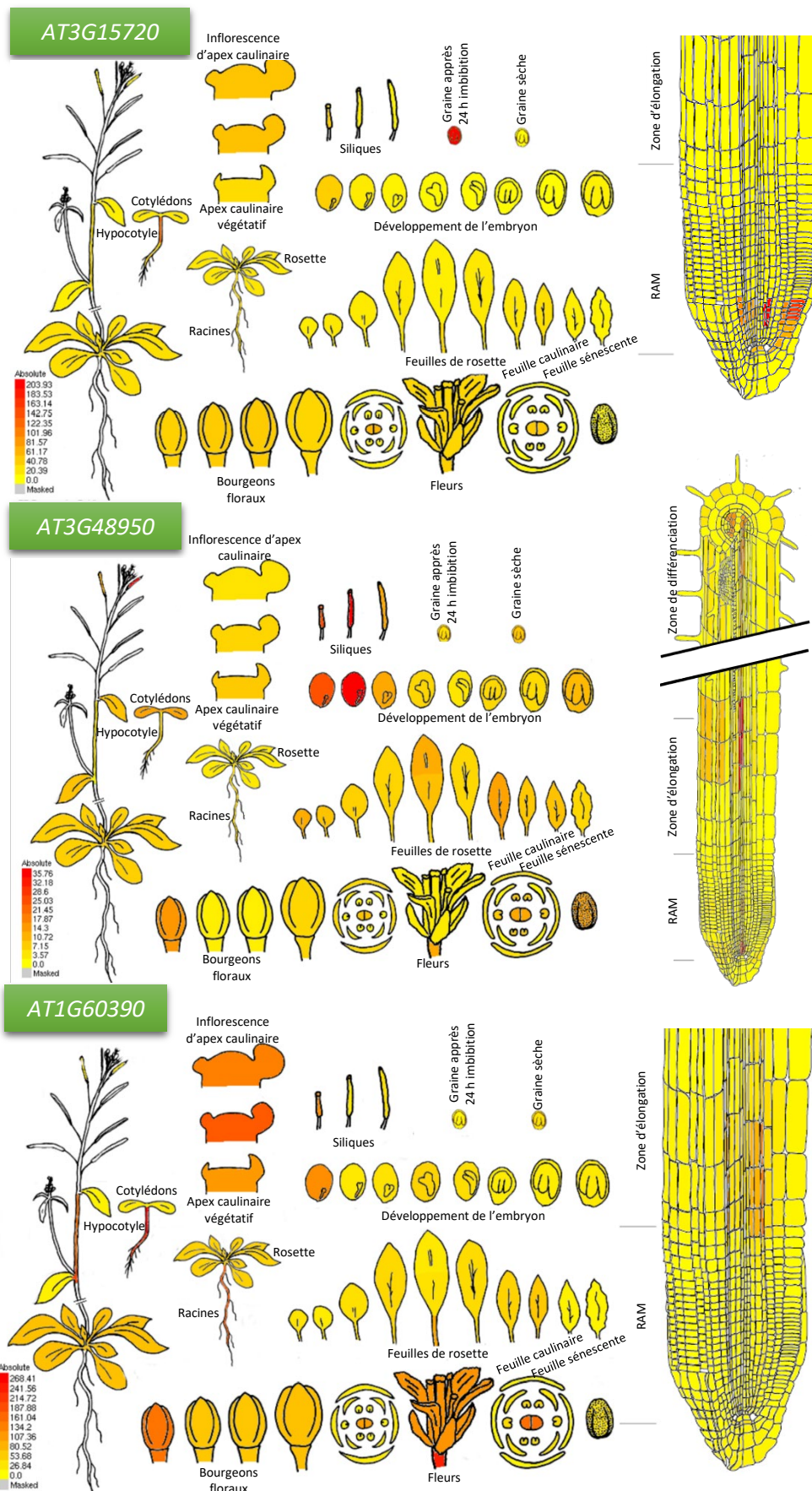


Figure 54 : Localisation de l'expression des gènes AT3G15720, AT3G48950 et AT1G60390 selon l'Arabidopsis EFP browser. Le niveau d'expression est représenté du jaune (le plus faible) au rouge (le plus fort). (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).



en C-terminal. Afin de connaître la position du signal de sécrétion en N-terminal, nous avons eu recours au logiciel SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> ; Petersen et al., 2011). Ainsi, le signal de sécrétion de AT3G15720 est situé du 1 au 23<sup>e</sup> AA, celui de AT3G48950 du 1<sup>e</sup> au 22<sup>e</sup> AA, et celui de AT1G60390 du 1<sup>e</sup> au 26<sup>e</sup> AA ([annexe 2](#)).

### I.1.2.c. Prédiction de la localisation de l'expression des PG à ancre GPI

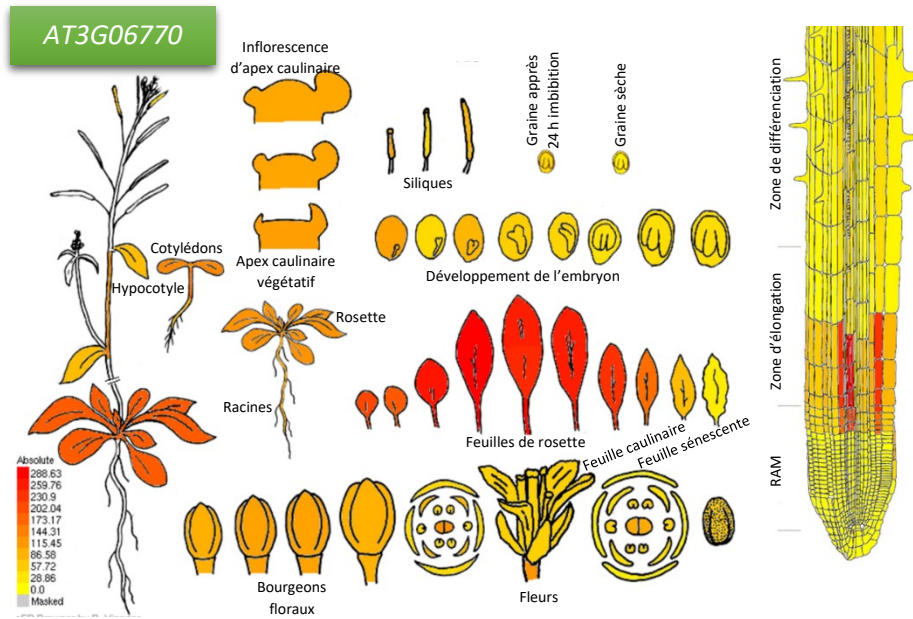
La localisation de l'expression des gènes d'*A. thaliana* peut être estimée par le site Arabidopsis EFP (Electronic Fluorescent Pictograph) browser (Winter et al., 2007 ; <https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Ce site fournit la localisation de l'expression des gènes d'*A. thaliana* à différents stades de croissance et sous différents traitements, sur la base de données publiques d'analyses de microarray. Les résultats sont regroupés dans la [figure 54](#).

D'après l'Arabidopsis EFP browser, AT3G15720 serait uniquement exprimé au niveau de la graine après 24 h d'imbibition, au niveau de l'hypocotyle, et à l'apex des racines, au niveau du RAM. La localisation de l'expression du gène au niveau de la pointe racinaire a particulièrement retenu notre attention, puisqu'il s'agit d'une zone où l'expression des gènes est hautement contrôlée, pour permettre le fonctionnement du méristème primaire racinaire. Le rôle d'une PG avec une ancre GPI putative dans cette zone est donc particulièrement intéressant.

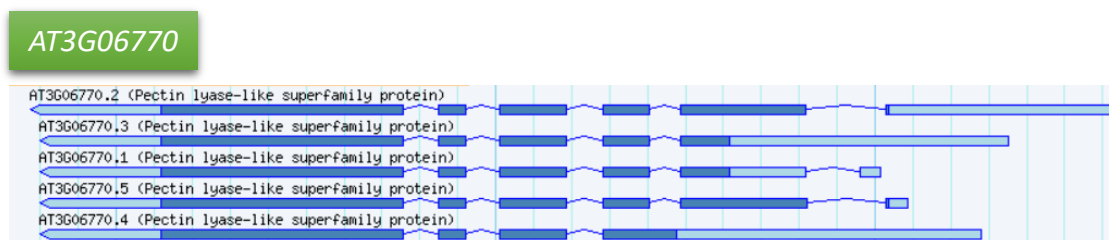
AT3G48950 serait principalement exprimé lors du développement des graines et des siliques, mais serait également exprimé au niveau de la stèle des racines sur toute leur longueur, au niveau des bourgeons et des fleurs, des feuilles, et des cotylédons.

Enfin, AT1G60390 serait exprimé à la fois à l'apex caulinaire, durant les premiers stades de la formation des siliques et lors du développement de l'embryon. Il serait également exprimé au niveau de l'hypocotyle, des tiges des inflorescences, des bourgeons, des fleurs, et enfin au niveau des racines, principalement dans la zone d'élongation.

Le patron d'expression de ces trois gènes codant des PG liées à ancre GPI putative est donc différent. On peut en déduire qu'elles auraient chacune des fonctions ou caractéristiques bien spécifiques, justifiant la nécessité d'une diversité des PG. En effet, si les PG ne présentaient qu'une seule modalité d'action, une seule PG exprimée de façon ubiquitaire serait suffisante, ce qui n'est pas le cas. Ceci ne s'applique pas uniquement à ces trois PG, mais à l'ensemble de la famille des PG. Il est probable que les PG se démarquent en terme de substrat (degré de déméthylestérisation des HG), de pH optimal (qui pourrait être variable suivant la localisation dans la paroi : paroi primaire, lamelle moyenne), de vitesse d'action, d'affinité pour leur substrat, et de régulation (libération contrôlée des PG liées à une ancre GPI, régulation de l'expression des gènes via différents facteurs de transcription, eux-mêmes régulés par différentes voies). Un nombre aussi important de PG permettrait de contrôler avec justesse la dégradation des HG par celles-ci, pour pouvoir répondre aux besoins spécifiques de chaque tissu, et suivant le stade de développement concerné.



**Figure 55 : Localisation de l'expression du gène AT3G06770 selon l'Arabidopsis EFP browser.** Le niveau d'expression est représenté du jaune (le plus faible) au rouge (le plus fort). (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).



**Figure 56 : Représentation schématique des séquences génomiques des cinq variants du gène AT3G06770.** D'après le site TAIR (<https://www.arabidopsis.org>).

*AT3G15720*, *AT3G48950* et *AT1G60390* ne sont donc pas exprimés dans les mêmes tissus et stades de développement de la plante, mais il semblerait qu'ils soient tous les trois exprimés au niveau de la racine. De plus, *AT3G48950* et *AT1G60390* seraient exprimés dans la zone d'élongation des racines et seraient donc de très bons candidats pour étudier le rôle des PG à ancre GPI dans l'élongation cellulaire. En parvenant à localiser les PG au niveau cellulaire, à l'aide de constructions avec ou sans le signal permettant l'accrochage d'une ancre GPI lié à une protéine fluorescente, nous pourrions mettre en évidence le rôle de cette ancre dans l'adressage préférentiel des PG aux parois longitudinales des cellules en élongation.

## I.2. Recherche d'une PG sans ancre GPI exprimée dans la racine

### I.2.1. Recherche d'une PG candidate sur le site Arabidopsis EFP browser

Afin d'établir une comparaison entre la fonction et la localisation cellulaire des PG liées à une ancre GPI et une sans ancre GPI, une PG sans ancre GPI exprimée dans la racine a été recherchée sur l'Arabidopsis EFP browser. Ces deux types de PG nous permettront de renforcer l'étude du rôle de l'ancre GPI dans la régulation de l'adressage des PG, et donc de leur fonction. En parallèle, l'étude d'une autre PG exprimée dans la racine nous permettra de compléter nos connaissances sur les modifications subies par les pectines au cours de la croissance racinaire.

Une PG a été choisie : *AT3G06770*. Le gène *AT3G06770* semble être exprimé de façon relativement ubiquitaire, son expression est rapportée aussi bien dans les feuilles, les racines (en particulier dans la zone d'élongation), au niveau de l'hypocotyle, des bourgeons floraux, des siliques, lors du développement de l'embryon, et pour finir au niveau du méristème apical caulinaire (**figure 55**). Ce gène a été choisi par rapport à son expression au niveau des racines. Tout comme *AT3G48950* et *AT1G60390*, l'expression putative de *AT3G06770* dans la zone d'élongation de la racine fait de cette PG une candidate idéale pour étudier le rôle des PG dans l'élongation cellulaire.

### I.2.2. Analyse bio-informatique de la PG *AT3G06770*

#### I.1.2.a. Informations sur le site TAIR

Tout comme *AT3G15720* et *AT3G48950*, la protéine *AT3G06770* fait partie de la super-famille « pectin lyase-like ». Cette dernière possède 5 variants : *AT3G06770.1* (377 AA), *AT3G06770.2* (446 AA), *AT3G06770.3* (377 AA), *AT3G06770.4* (359 AA) et *AT3G06770.5* (447 AA). Le gène modèle représentatif sur TAIR est *AT3G06770.2*. Le gène *AT3G06770* possède 4 à 5 exons et 3 à 5 introns, suivant les variants (**figure 56**).

#### I.1.2.b. Recherche de peptide signal de sécrétion

Il est fort probable que la protéine *AT3G06770* possède également un peptide signal de sécrétion, afin de pouvoir être sécrétée dans l'apoplaste, et d'accomplir sa fonction présumée de dégradation des HG. D'après le logiciel SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen et al., 2011), *AT3G06770* possède

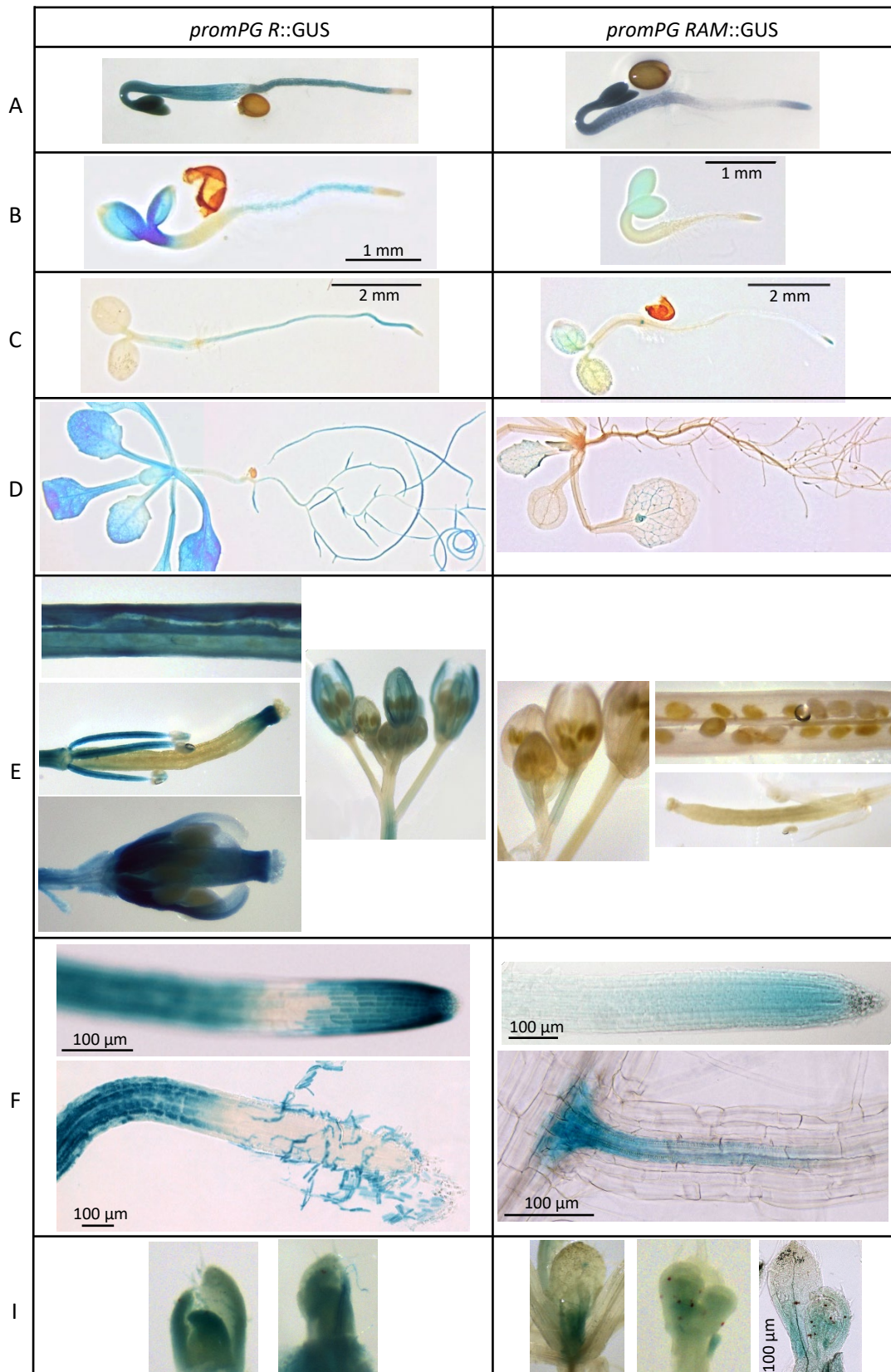


effectivement un signal de sécrétion prédit entre les 1<sup>e</sup> et 19<sup>e</sup> AA ([annexe 2](#)). Cette information est importante à prendre en compte lors de la réalisation des constructions de fusion de la PG à une protéine fluorescente, puisque ce peptide signal sera clivé au cours de l'adressage.

### I.1.2.c. Recherche de domaines transmembranaires

Nous avons voulu savoir si la protéine AT3G06770 possède un domaine transmembranaire. La présence d'un domaine transmembranaire pourrait nous permettre d'établir une comparaison entre les deux systèmes d'ancrage à la membrane, en terme de localisation et de fonction.

D'après le logiciel TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), la protéine AT3G06770 ne possède pas de domaine transmembranaire prédit ([annexe 3](#)). Au vu de l'absence de système de fixation à la membrane, on peut émettre l'hypothèse que cette PG possède une action uniforme sur le pourtour cellulaire. Par conséquent, si cette PG possède un rôle dans la croissance anisotrope des cellules, il est possible que la restriction de son activité aux parois latérales soit due à la localisation de son substrat au niveau de ces parois. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les HG déméthylestérifiés, le substrat préférentiel des PG, soient restreints au niveau des parois longitudinales des cellules en élongation. Il est également possible que le confinement de l'activité de cette PG aux parois latérales soit dû à un environnement pariétal particulier comme, par exemple, un pH plus ou moins élevé.



**Figure 57 : Localisation de l'activité des promoteurs des gènes AT3G15720 (PG RAM) et AT3G06770 (PG R) dans différents organes de plantules d'*A. thaliana* (gènes rapporteurs *GUS*).** **A)** Hypocotyles étiolés de 2 jours. **B-I)** Conditions de culture 16 h de lumière - 8 h de jour. **B)** Plantules de 2 jours. **C)** Plantules de 3 jours. **D)** Plantes de 10 jours. **E)** Différentes pièces florales (siliques, pistils, étamines, bourgeons floraux). **F)** Apex racinaires, et émergence d'une racine latérale. **I)** Apex caulinaires. Les photos sans échelle ont été prises avec une loupe binoculaire qui ne fournit pas l'échelle de ces images.

## Chapitre II : Localiser l'expression des gènes

### II.1. Localisation de l'expression à l'échelle tissulaire

Afin de connaître où les gènes d'intérêt sont exprimés, des constructions promoteur-rapporteur *GUS* ont été utilisées. Celles-ci sont composées du gène de la  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) placé sous le contrôle des promoteurs natifs des gènes d'intérêt. Ce gène rapporteur permet de mettre en évidence la localisation de l'expression des gènes au niveau tissulaire, grâce à la formation d'un composé bleu.

Malheureusement, la première étape nécessaire à l'obtention du gène rapporteur *promAT1G60390::GUS* (clonage dans le vecteur d'entrée pENTR™ D TOPO®) n'a pas abouti, malgré plusieurs tentatives. Ce gène a donc été retiré de la liste des gènes étudiés dans ce projet.

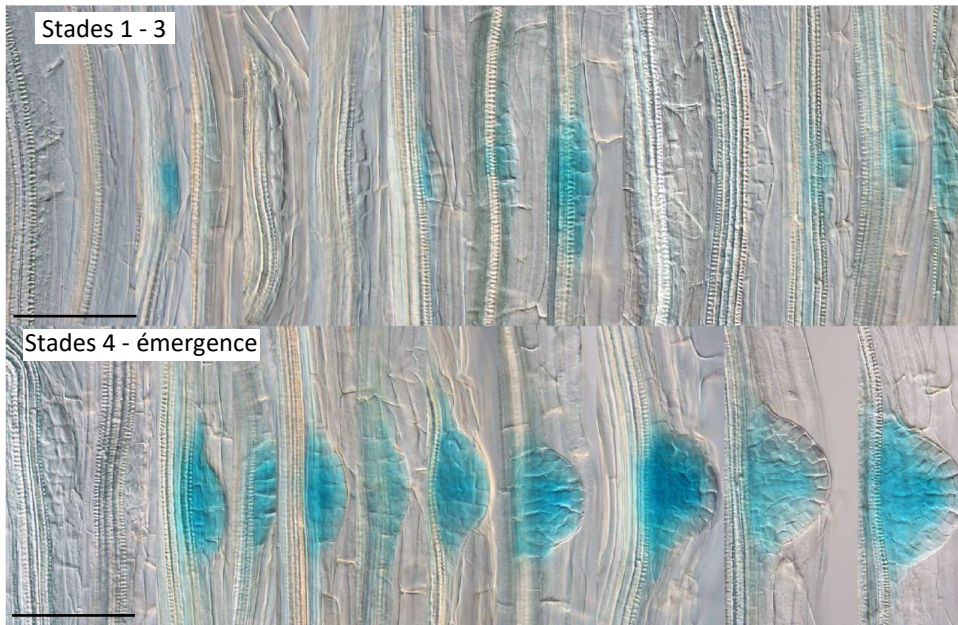
Plusieurs lignées issues de transformations indépendantes pour chaque promoteur ont été étudiées, puisque suivant le lieu d'insertion de l'ADN-T dans le génome, l'expression *GUS* peut varier. Ainsi, suite à l'examen des 5 lignées des transformants *promAT3G48950::GUS*, le gène *AT3G48950* a également été éliminé du projet, car les transformants ont révélé que le promoteur de ce gène présentait une faible activité au niveau de la plante. En effet, le seul marquage retrouvé chez plus d'une lignée est un marquage au niveau des graines en formation au niveau des siliques (voir [annexe 4](#)).

Les gènes *AT3G15720* et *AT3G06770* sont donc les deux seuls gènes qui ont été conservés pour cette étude. Quatre lignées d'insertion indépendantes ont été obtenues pour chacun de ces gènes. Les résultats sont présentés dans la [figure 57 et 58](#), compilant les marquages retrouvés chez les différentes lignées. Des photos de plusieurs lignées pour chacune des constructions, réalisées par Melanie Venant et Tom Beeckman du VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) à Gand (Belgique), sont également disponibles dans l'[annexe 5](#).

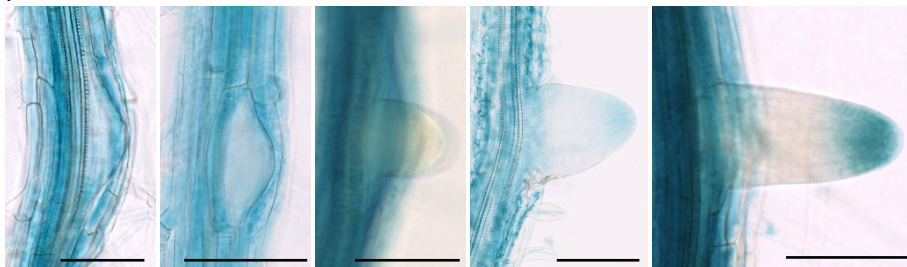
Pour *AT3G06770*, deux lignées présentent un marquage GUS au niveau des feuilles et des racines, comme dans la [figure 57 D](#), mais les deux autres présentent uniquement un marquage au niveau des racines. Pour toutes les lignées, le marquage au niveau des racines est présent sur la totalité de la longueur des racines, mais s'arrête à l'apex racinaire, où seule la coiffe latérale est marquée ([figure 57 F](#)). Le marquage à la coiffe latérale se met en place à un stade tardif d'émergence de la racine latérale, une fois que celle-ci est bien sortie des tissus de la racine source, et que la coiffe commence à se développer ([figure 58](#)). Ce gène est également exprimé au niveau des jeunes cotylédons, des hypocotyles étiolés, ainsi qu'au niveau de certaines pièces florales telles que l'enveloppe des bourgeons floraux, le pistil, le filet des étamines, et les siliques. Enfin, un marquage GUS semble être présent au niveau du méristème apical caulinaire ([figure 57 I](#)).

Le gène *AT3G15720* serait quant à lui exprimé au niveau des cotylédons, des hypocotyles étiolés, des vaisseaux conducteurs des feuilles, dans le méristème apical caulinaire, à l'apex des racines, et enfin dans la stèle des racines latérales émergentes, à la base de cellules-ci

*promPG RAM::GUS*



*promPG R::GUS*



**Figure 58 : Expression des gènes AT3G15720 (PG RAM) et AT3G06770 (PG R) au cours de l'émergence des racines latérales.** Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. Les images de l'émergence des racines latérales de la construction *promPG RAM::GUS* ont été réalisées par Mélanie Venant et Tom Beckman, du VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) à Gand (Belgique).



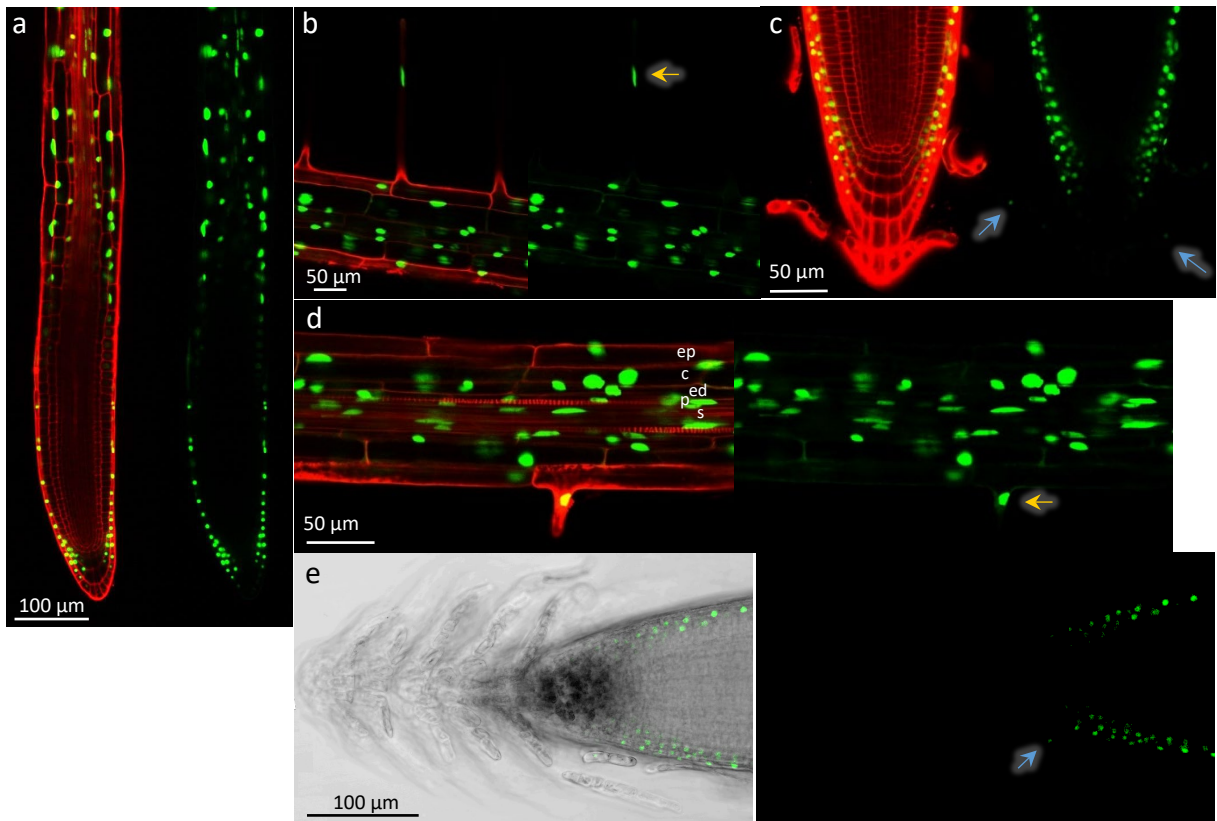
([figure 57](#)). Plus précisément, le marquage est plus intense au niveau du méristème apical racinaire (RAM), et l'expression diminue vers la zone d'élongation, puis disparaît totalement. Le marquage au niveau de la columelle n'est pas toujours observé, suivant le stade de croissance de la racine. Il est davantage observable chez les jeunes racines. Au niveau de l'émergence des racines secondaires, le gène *AT3G15720* semble être exprimé au niveau de la stèle de la racine source, au niveau de la zone d'émergence, ainsi que dans le début de la stèle de la racine secondaire ([figure 57 F](#)). De plus, *AT3G15720* est exprimé dès les stades les plus précoces de l'émergence des racines latérales ([figure 58](#)).

Le marquage GUS a donc permis de confirmer les prédictions fournies par l'Arabidopsis EFP browser, même si ce marquage n'est pas suffisant pour dire si *AT3G06770* est exprimé au niveau de la zone d'élongation, ou si l'expression débute dans la zone de division. De plus, le marquage GUS a révélé que le patron d'expression des deux gènes PG est complémentaire au niveau des racines. Il est donc probable qu'elles aient des modes d'action et des fonctions bien distinctes. Au vu de la localisation de l'expression des deux gènes, *AT3G06770* a été nommé *PG ROOT (PG R)* et *AT3G15720* a été nommé *PG ROOT APICAL MERISTEM (PG RAM)*.

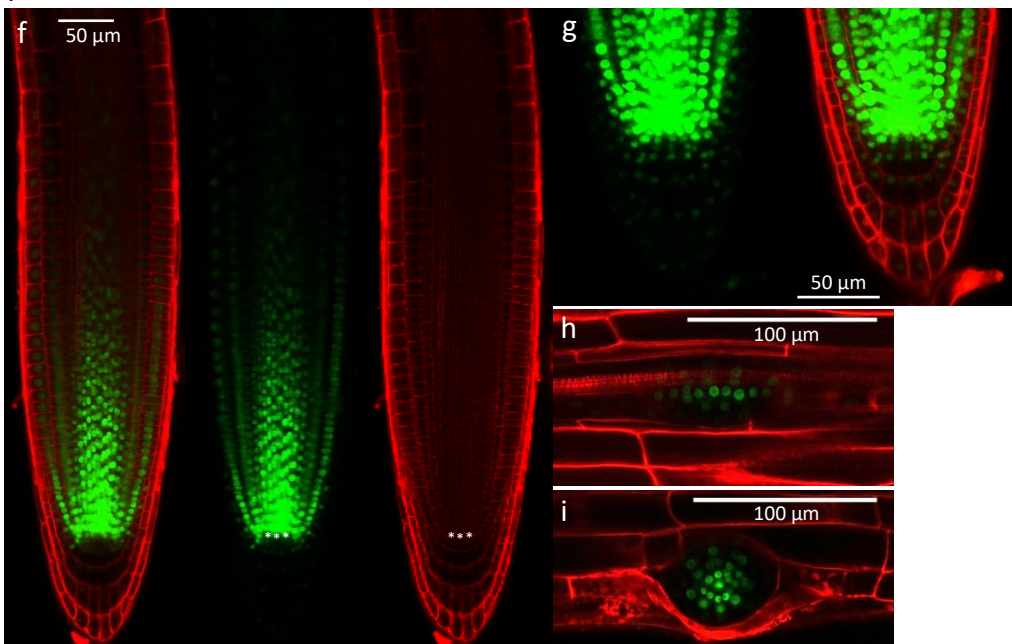
La localisation de l'expression du gène *PG RAM* au niveau du méristème apical racinaire tend à indiquer que *PG RAM* pourrait avoir un rôle dans le fonctionnement de celui-ci, ainsi que dans l'émergence des racines latérales. On peut émettre l'hypothèse que la dégradation des HG au niveau des parois des cellules en division limite la formation de structure en boîtes à œufs. En effet, il est possible que la présence de boîtes à œufs dans cette zone ait pour conséquence d'empêcher la division cellulaire en augmentant la cohésion entre les cellules. Par ailleurs, dans la mesure où l'expression du gène *PG RAM* est observée à la base des racines latérales, depuis la zone d'émergence de celles-ci, au niveau de la stèle, il est également possible que *PG RAM* participe au développement de ces tissus. Enfin, l'expression de *PG RAM* au niveau des hypocotyles étiolés en élongation pourrait indiquer que la protéine possède une fonction dans l'élongation cellulaire des hypocotyles, probablement par l'assouplissement de la paroi. En effet, la croissance des hypocotyles est uniquement due à l'élongation cellulaire, puisque les cellules de l'épiderme et les cellules corticales ne présentent pas de divisions significatives (Gendreau et al., 1997).

*PG R* pourrait avoir un rôle, d'après la localisation de son expression dans la coiffe latérale, dans l'élimination de ces cellules, et ainsi permettre leur renouvellement. En effet, sur certaines images, on peut voir la pointe racinaire entourée de cellules de la coiffe latérale détachées, marquées par la coloration GUS ([figure 57](#)). Il est donc possible que *PG R* intervienne dans le détachement de ces cellules. En effet, les pectines de la lamelle moyenne permettant l'adhésion de ces cellules entre elles, leur dégradation devrait aboutir à la séparation cellulaire. De plus, l'expression du gène *PG R* au niveau des zones d'élongation et de différenciation cellulaire suggère que *PG R* pourrait intervenir également dans le remodelage de la paroi lors de l'élongation et de la différenciation cellulaire. En effet, au cours de ces processus, la paroi nécessite des modifications. *PG R* pourrait promouvoir l'assouplissement pariétal nécessaire à l'allongement cellulaire de la zone d'élongation. Au niveau de la zone de différenciation, on peut imaginer que *PG R* facilite l'émergence des

*promPG R::GFP-NLS*



*promPG RAM::GFP-NLS*



**Figure 59 : Localisation de l'expression des gènes PG R et PG RAM au niveau des racines (gènes rapporteurs GFP-NLS).** Observation de racines latérales de plantules de 10 jours. Coloration des parois à l'iodure de propidium (en rouge). Flèches jaunes : expression de PG R au niveau d'un poil absorbant. Flèches bleues : expression de PG R au niveau de cellules bordantes. Astérisques : centre quiescent. ep : épiderme ; c : cortex ; ed : endoderme ; p : pérycyle ; s : stèle. Les images b, c, d, f et g ont été réalisées par Patrick Schäfer, de l'Université de Warwick.

racines latérales, par le remodelage de la paroi des cellules des tissus de la racine source que doit traverser la racine émergente (l'endoderme, le cortex et le rhizoderme), ou par la modification de l'adhésion de ces cellules. Ceci est cohérent avec le fait que plusieurs enzymes de remodelage de la paroi ont été rapportées comme étant exprimées dans les cellules racinaires adjacentes au primordium. Il a été supposé que leur expression engendre la séparation cellulaire, afin de permettre l'émergence du primordium (Péret et al., 2009). Or la dégradation des pectines est d'autant plus indiquée pour ce processus, puisque les pectines permettent l'adhésion cellulaire. Cependant si *PG R* n'intervenait que dans ce cas de figure, son expression serait restreinte aux tissus que les racines latérales doivent traverser. Il est donc possible que son expression ubiquitaire au niveau de la zone de différenciation vise un autre but, comme celui d'équilibrer les processus de rigidification qui s'opèrent, notamment, par la formation de structures en boîtes à œufs. Il est également possible que *PG R* s'exprime sur toute la longueur de la zone de différenciation, mais que les protéines soient produites sous forme inactive. L'activation de *PG R* (par phosphorylation, ou un autre système) se produirait uniquement dans le cas où une racine latérale serait initiée, dans les tissus proximaux, afin de permettre l'émergence de la nouvelle racine. Pour finir, l'expression de *PG R* au niveau des hypocotyles étiolés en élongation indiquerait qu'elle agit également dans l'élongation cellulaire des hypocotyles, par le biais de l'assouplissement pariétal, tout comme au niveau de la zone d'élongation racinaire.

## II.2. Précision de la zone d'expression tissulaire

Pour préciser la localisation de l'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* à l'échelle tissulaire, des plantes d'*A. thaliana* transformées par les constructions *promoteurs natifs::GFP-NLS* ont été obtenues. Le signal NLS (nuclear localization sequence) est un signal de localisation nucléaire, qui permet de relocaliser la GFP dans le noyau après sa production. Ce type de construction apporte des résultats complémentaires, car elle permet de visualiser plus précisément quelles cellules expriment la construction. Les résultats obtenus sont présentés dans la [figure 59](#).

Les résultats montrent que *PG R* est exprimé au niveau de la coiffe latérale, ainsi que dans le rhizoderme, le cortex, l'endoderme, le péricycle et la stèle ([figure 59 a et d](#)). De plus, en mesurant la taille des cellules de chaque file à partir du méristème, et en déterminant les cellules dans lesquelles le signal GFP apparaît, on peut s'apercevoir que le marquage est présent dans les cellules un peu avant que celles-ci n'entrent en phase d'élongation (voir [annexe 6](#)). On observe également un décalage dans l'initiation de l'expression du marquage GFP. Celui-ci débute au niveau des tissus externes du rhizoderme, puis l'expression s'étend petit à petit dans les tissus internes de la racine, d'abord dans le cortex, puis dans l'endoderme, jusqu'à la stèle. Pour finir, certains noyaux de poils absorbants peuvent également être marqués par la GFP ([figure 59 b et d](#)), de même que certaines cellules bordantes détachées depuis peu de la coiffe latérale ([figure 59 c et e](#)).

*PG RAM* est fortement exprimé au niveau du méristème racinaire, au niveau des cellules initiales et des files de cellules de l'épiderme, du cortex, de l'endoderme, du péricycle et de la



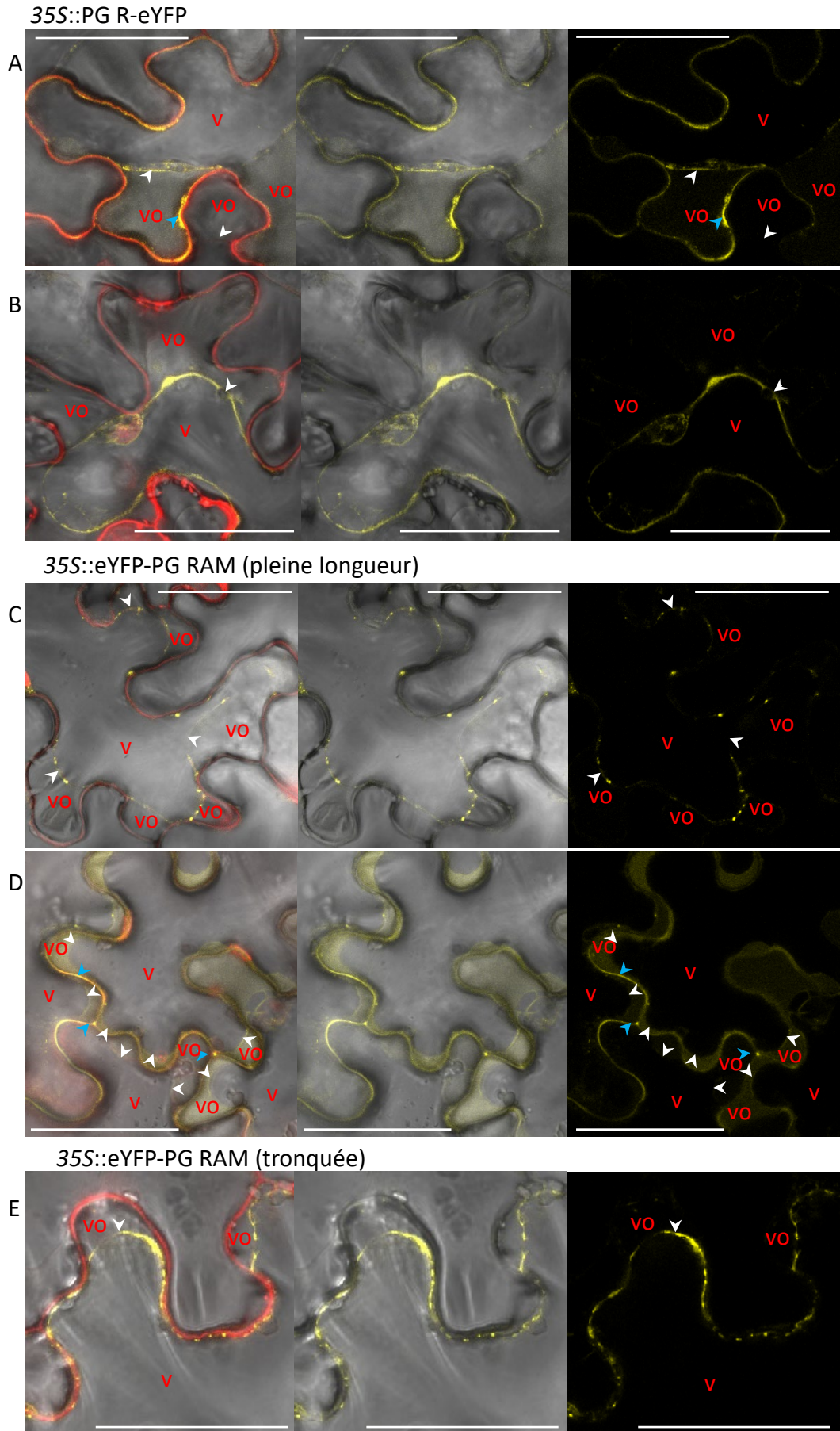
stèle. Plus les cellules sont éloignées du centre quiescent, moins *PG RAM* est exprimé, puis l'expression disparaît totalement dans la zone d'élongation. Aucun marquage n'est visible dans le centre quiescent ([figure 59 f](#)). L'expression de *PG RAM* peut aussi être observée dans la columelle, mais ce marquage n'est pas toujours observé, et est beaucoup plus faible qu'au niveau de la partie supérieure du centre quiescent ([figure 59 g](#)). Enfin, *PG RAM* est exprimé dans les primordia racinaires dès les stades précoces ([figure 59 h et i](#)).

Les marquages GFP-NLS sont donc en accord avec les marquages GUS, et nous apportent de nouvelles précisions sur la localisation de l'expression des gènes *PG R* et *PG RAM*, permettant d'émettre des hypothèses sur leurs fonctions. En effet, *PG R* semble être exprimé en amont de l'élongation cellulaire de la zone d'élongation racinaire, ce qui pourrait confirmer un rôle de la protéine dans l'élongation cellulaire. De plus, le fait que certaines cellules bordantes soient marquées par la GFP, tout comme la coiffe latérale, pourrait témoigner du rôle de *PG R* dans le détachement des cellules de la coiffe latérale, par la dégradation des pectines de la lamelle moyenne de ces cellules. L'expression du gène *PG R* au niveau des poils absorbants laisse supposer que *PG R* puisse posséder une fonction dans l'allongement des poils absorbants, grâce à un assouplissement pariétal de ces cellules spécialisées. Cependant, comme le gène *PG R* est également exprimé dans des cellules qui ne sont pas en élongation, comme les cellules de la zone de différenciation, seule une preuve expérimentale pourra le confirmer. Enfin, un marquage GFP-NLS est observé, tout comme le marquage GUS, sur toute la longueur de la zone de différenciation. Les mêmes hypothèses que précédemment peuvent donc être formulées, à savoir que *PG R* pourrait intervenir dans l'émergence des racines latérales, ou équilibrerait la formation des structures en boîtes à œufs, ou encore serait présente sous forme inactive. Cependant, si *PG R* est produite sous forme inactive, en attendant d'être activée pour permettre l'émergence d'un primordium racinaire, il est surprenant d'observer l'expression de *PG R* dans la stèle et le périoderme. En effet, ces tissus ne sont pas traversés par les primordia, puisque ceux-ci sont formés à partir du péricycle (Péret et al., 2009). En conclusion, soit les protéines *PG R* s'accumulent sous une forme inactive en attendant leur activation, pour permettre à la fois la formation du primordium ainsi que son émergence, soit *PG R* est exprimé au niveau dans la zone de différenciation afin de compenser la formation de complexes des HG par le calcium, pour que les racines restent souples.

*PG RAM*, quant à elle, pourrait être impliquée dans la division cellulaire des cellules du RAM, à l'exception des cellules de la columelle et de la coiffe latérale. Enfin, il est probable que *PG RAM* participe à l'initiation et/ou au développement des primordia racinaires. Si l'expression de *PG RAM* au niveau des cellules en division permet de dégrader les HG, empêchant par la même occasion la formation de boîtes à œufs, et promouvant ainsi la division cellulaire, on peut se demander pourquoi *PG RAM* n'est pas exprimé au niveau des cellules en division de la columelle et de la coiffe latérale, de la même façon que dans le reste du RAM. De plus, on peut se demander ce qui différencie ces cellules du reste du RAM. Une réponse envisageable est que l'activité et la différenciation de ces cellules ne sont pas contrôlées par les mêmes facteurs que le reste du RAM, et que ces facteurs ne permettent



pas l'expression de *PG RAM*. On peut également imaginer que si le gène *PG RAM* n'est pas exprimé dans ces cellules, c'est que l'action de *PG RAM* n'est pas adaptée aux cellules de la coiffe latérale et de la columelle. Par exemple, sa vitesse de dégradation pourrait être trop importante pour ces tissus. En effet, il est possible que la columelle et la coiffe latérale nécessitent une croissance plus faible que les autres tissus racinaires. Dans ces conditions, une action trop importante d'une PG au niveau de cellules avec une vitesse de division plus faible pourrait en effet avoir pour conséquence un manque de cohésion pariétal, et une perte d'adhésion cellulaire. Il est également possible que le degré de méthylestérification des HG des parois des cellules de la columelle et de la coiffe latérale soit différent des autres tissus, et que *PG RAM* ne puisse pas les dégrader. Parmi les 67 PG d'*A. thaliana*, il existe peut-être un ou plusieurs gènes codant des PG exprimés spécifiquement dans ces tissus, dont l'expression serait contrôlée par des facteurs de transcription propres à ces cellules, et dont les protéines auraient des caractéristiques adaptées à ces tissus.



**Figure 60 : Expression hétérologue et transitoire des constructions 35S::PG-eYFP (PG R, PG RAM pleine longueur et PG RAM tronquée) en feuilles de tabac.** Marquage de la paroi à l'iodure de propidium (en rouge). v : vacuole. vo : vide optique entre la membrane plasmique et la paroi. Tête de flèches blanches : membrane plasmique de la cellule plasmolysée. Tête de flèches bleues : marquage eYFP à la paroi. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m.



## Chapitre III : Localisation cellulaire des PG

Après avoir identifié les tissus dans lesquels les gènes *PG RAM* et *PG R* sont exprimés, nous avons souhaité déterminer dans quels compartiments cellulaires ces PG étaient localisées, et en parallèle, démontrer la présence ou l'absence de l'ancrage de *PG RAM* à la membrane, *via* une ancre GPI. Nous avons choisi pour cela deux approches : une expression transitoire en feuilles de tabac de constructions *35S::PG-eYFP* (enhanced yellow fluorescent protein), et une transformation stable d'*A. thaliana* avec des constructions similaires, ainsi que des constructions *prom natif::PG-eYFP* (la composition exacte des constructions est détaillée dans le [tableau 10](#) du matériel et méthodes, chapitre II, paragraphe II.6.).

L'avantage de l'expression transitoire en feuilles de tabac est l'obtention rapide de résultats. En effet, une fois que le clonage est terminé et que le plasmide est inséré dans *Rhizobium radiobacter*, des feuilles de tabac peuvent être infiltrées, et le marquage est observable en 72 h. A l'inverse, les transformations stables dans *A. thaliana* nécessitent 5 mois minimum pour obtenir et sélectionner des lignées homozygotes, ou 3 mois pour des lignées hétérozygotes. Cependant, l'avantage de réaliser des transformations stables dans *A. thaliana* est d'observer les protéines dans leur organisme natif, et donne la possibilité de placer les protéines recombinantes sous le contrôle de leur promoteur natif, et ainsi d'observer leur localisation dans les cellules où elles sont naturellement produites *in planta*, ce qui n'est pas possible en feuilles de tabac.

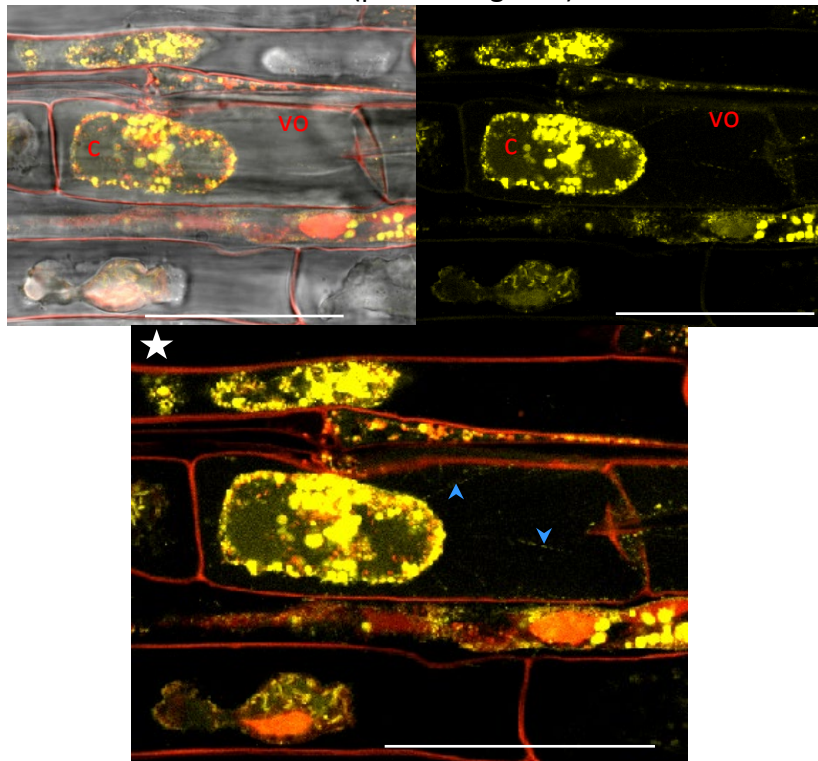
### III.1. Approche en expression transitoire en feuilles de tabac

Des feuilles de tabac de plantes de 4 semaines ont donc été transformées par des constructions *35S::PG R-eYFP*, *35S::eYFP-PG RAM PL* (pleine longueur), et *35S::eYFP-PG RAM T* (tronquée). La version *PG RAM* tronquée correspond à la séquence codante de *PG RAM* dépourvue du signal pour l'ancre GPI en C-terminal, à partir du site  $\omega$ . La protéine eYFP est placée à l'extrémité N-terminale de *PG RAM* (PL ou T), entre le peptide signal et la séquence codante de la protéine, pour ne pas gêner le signal ancre GPI à l'extrémité C-terminale (voir schéma en [annexe 7](#)). Pour *PG R*, la protéine eYFP est placée à l'extrémité C-terminale, à cause de la présence du signal de sécrétion à l'extrémité N-terminale ([annexe 7](#)). L'avantage de la protéine eYFP est que sa fluorescence est compatible avec le marquage de la paroi à l'iodure de propidium, présente un bon niveau de fluorescence, et la chlorophylle n'induit pas d'auto-fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation de la eYFP.

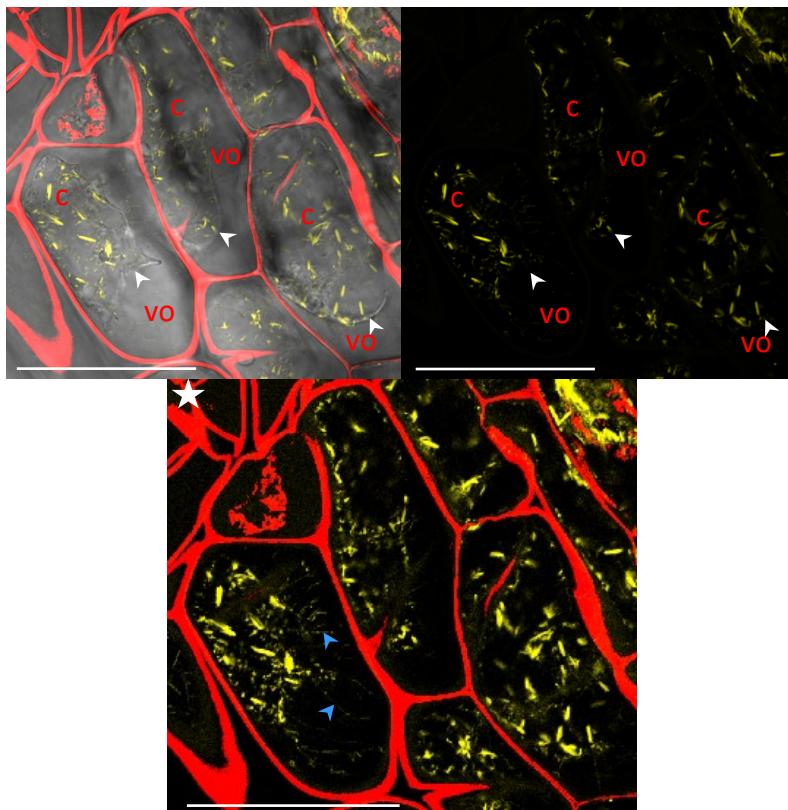
L'expression transitoire des protéines de fusion en feuilles de tabac permettent d'observer si celles-ci sont sécrétées, ou si elles restent de la cellule (cytoplasme, membrane plasmique ou organites). Afin de séparer la paroi et la membrane plasmique, les cellules ont été plasmolysées grâce à une solution hypertonique (sorbitol 1 M).

Les résultats sont regroupés dans la [figure 60](#). Deux cas de figures ont été observés. Dans certaines cellules, *PG R* et *PG RAM PL* sont observées uniquement au niveau cellulaire (au niveau de la membrane plasmique, du cytoplasme, et/ou des organites) ([figure 60 B et C](#)) ;

Racine 35S::eYFP-PG RAM (pleine longueur)



Hypocotyle 35S::eYFP-PG RAM (pleine longueur)



**Figure 61 : Localisation subcellulaire de la protéine PG RAM pleine longueur dans des transformants stables d'*A. thaliana* portant la construction 35S::eYFP-PG RAM (pleine longueur) au niveau de la racine et de l'hypocotyle.** Marquage de la paroi à l'iodure de propidium (en rouge). Têtes de flèches bleues : travées cytoplasmique reliant la membrane plasmique et la paroi. La luminosité des images marquées d'une étoile blanche a été augmentée afin de mieux les voir. Têtes de flèches blanches : membrane de cellules plasmolysées. c : cellule. vo : vide optique entre la membrane plasmique et la paroi. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m.

dans d'autres, elles sont présentes au niveau cellulaire mais également dans le vide optique, entre la membrane plasmique et la paroi, et s'accumulent au niveau de la paroi ([figure 60 A et D](#)). On observe néanmoins une différence de localisation entre PG R et PG RAM PL, puisque sur les 20 images obtenues pour PG RAM PL, celle-ci est observée seulement 3 fois à la paroi, alors que PG R est observée 6 fois à la paroi sur 15 images. De plus, le marquage eYFP est parfois présent dans l'apoplasme (comme sur les images [figure 60 A et D](#)), mais avec une absence d'accumulation au niveau de la paroi ([annexe 8](#)). C'est le cas pour 9 images sur 20 pour PG RAM PL, et 10 images sur 15 pour PG R. En résumé, PG RAM PL est observée 10 fois sur 20 au niveau cellulaire uniquement, contre seulement 5 fois sur 15 pour PG R.

En ce qui concerne PG RAM T, celle-ci a été observée uniquement au niveau cellulaire, sans être sécrétée dans l'apoplasme, et sans accumulation à la paroi ([figure 60 E](#)). Mais seulement 6 images au total ont pu être obtenues.

Pour finir, des feuilles de tabac ont également été transformées par la construction 35S::eYFP-PG AT3G48950 (pleine longueur), pour pouvoir déterminer si cette protéine est bien ancrée à la membrane plasmique au moyen d'une ancre GPI. Tout comme PG R et PG RAM PL, la PG AT3G48950 est observée aussi bien au niveau cellulaire uniquement (7 photos sur 14, [annexe 9A](#)), qu'au niveau de la paroi (4 photos sur 14, [annexe 9C](#)), ou au niveau de l'apoplasme sans accumulation à la paroi (6 photos sur 14, [annexe 9B](#)).

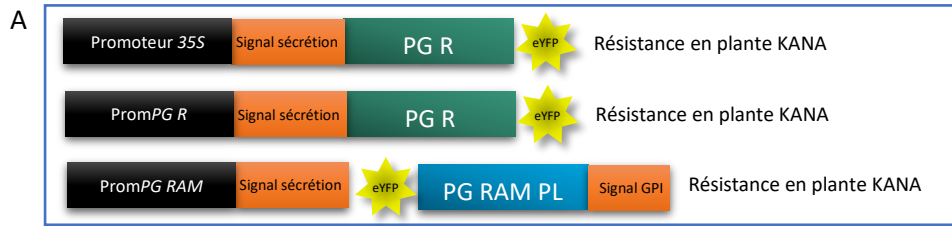
PG R semble donc davantage s'accumuler dans la paroi que PG RAM PL. Néanmoins, PG RAM PL a tout de même observée au niveau pariétal dans quelques cellules, tout comme PG AT3G48950. De plus, contrairement à ce qui était attendu, PG RAM T (version tronquée sur laquelle aucune ancre GPI ne pourra *a priori* être greffée), n'a jamais été observée à la paroi et n'est donc pas davantage sécrétée que la version pleine longueur. Ces résultats ne sont donc pas suffisants pour prouver la présence d'une ancre GPI chez PG RAM et la PG AT3G48950, et tendent plutôt à prouver l'absence de liaison des protéines à une ancre GPI.

### III.2. Approche en expression stable dans *A. thaliana*

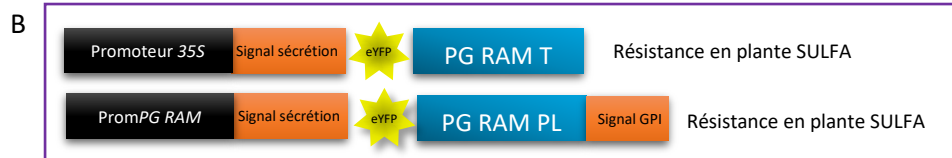
Nous avons ensuite souhaité observer les PG dans leur organisme d'origine. En effet, les mécanismes et signaux d'adressage en système hétérologue en feuilles de tabac peuvent être différents de ceux de l'organisme natif. Les constructions 35S::PG-eYFP ont pour cela été réutilisées et intégrées au génome d'*A. thaliana*. De plus, des plantes transformées par des constructions semblables mais sous le contrôle des promoteurs natifs ont été examinées, dans le but d'observer les protéines dans les tissus où elles sont naturellement produites.

Les transformants exprimant la construction 35S::eYFP-PG RAM PL présentent un marquage au niveau des organites ([figure 61](#)). Au niveau de l'hypocotyle, aucun marquage n'est clairement visible au niveau de la membrane plasmique ou de la paroi, ce qui est en désaccord avec les résultats obtenus en transformation transitoire chez le tabac. En revanche au niveau des racines, la membrane plasmique semble être marquée, même si la présence de nombreuses vésicules exprimant la eYFP empêche une bonne lecture. De même, en augmentant fortement la luminosité des images, on constate la présence de travées

### Fond sauvage (Col-0)



### Fond mutant *pg ram*



### Fond mutant *pg r*



**Figure 62 : Transformants PG-eYFP réalisés en fond sauvage (A) ou en fond mutant (B et C). KANA : kanamycine. Sulfa : sulfadiazine.**

cytoplasmiques marquées par la eYFP, au niveau des cellules de l'hypocotyle ainsi que des racines (**figure 61**, flèches bleues). Ces travées cytoplasmiques étant de fins prolongements de la membrane plasmique, cela pourrait indiquer que PG RAM PL est localisée à la membrane. Mais il est aussi possible qu'il s'agisse du cytoplasme, et enfin, on ne peut pas exclure l'hypothèse qu'il s'agisse d'un marquage non spécifique.

Des transformants *35S::PG R-eYFP*, *promPG R::PG R-eYFP* et *promPG RAM::eYFP-PG RAM PL* ont également été obtenus (**figure 62 A**). Malheureusement, sur 9 à 11 transformants issus d'évènements de transformations indépendants obtenus pour chaque construction, aucun marquage n'a été observé. Il a été supposé que les protéines PG R et PG RAM natives pourraient empêcher la production des protéines de fusion. En conséquence, de nouvelles transformations ont donc été réalisées avec les mêmes constructions, mais dans les fonds génétiques mutants correspondants au lieu du sauvage. En effet, un mutant *pg r* est disponible, ainsi que deux mutant *pg ram* : *pg ram1* et *pg ram3* (voir le chapitre I du matériel et méthode et le chapitre IV des résultats).

Ainsi la construction *promPG R::PG R-eYFP* a été utilisée pour transformer le mutant *pg r* (**figure 62 C**). La transformation *35S::PG R-eYFP* n'a pas été réalisée à nouveau en fond mutant, car PG R étant exprimé de façon relativement ubiquitaire, et dans des cellules où la localisation cellulaire de la protéine aurait facilement été observée, sa sur-expression n'a pas été jugée indispensable. Nous avons donc préféré nous concentrer sur les autres transformations. Il a pour cela fallu réaliser de nouvelles constructions *35S::eYFP-PG RAM T* et *promPG RAM::eYFP-PG RAM PL*, avec un gène de sélection en plante à la sulfadiazine (**figure 62 B**). En effet, les premières constructions contenaient un gène de sélection par la kanamycine, or les mutant *pg ram1* et *pg ram3* sont partiellement résistants à cet antibiotique (voir matériel et méthode, chapitre I). Malheureusement, malgré plusieurs transformations réalisées par construction, aucun des nouveaux transformants obtenus n'a présenté de marquage, malgré deux tentatives de transformation.

En conclusion, à la vue des résultats obtenus, la présence de l'ancre GPI de PG RAM est incertaine, mais n'est pas totalement exclue. L'étude de l'activité *in vitro* de PG RAM PL et T est donc le seul élément pouvant encore apporter des informations sur la présence potentielle de l'ancre GPI chez PG RAM.

**Gène AT3G06770.2, orientation anti-sens**

3' **aaaatgaaactatctctcctttttattatattaatggcttgtggaactgctgaaacaaaatttcttctgtttacacatgaatgaagaatg**  
aacctgtacagatttcttatctcagaatatgcaaacacataaaaaataggaaccagaataaccgaaaggaacatgatgatctaaagaca  
tgtggtttactttaggaagaatctgaccttcttaactccacaaaaatgaaatgattgatgaattgaaatcctatcaaaagaaatccaagaa  
atgtttcttgccttttttttttttttttttttttttgcagctctgttca **CTA**GACTGCAGCTCTACCCTAAGCATCAGCATCTCTCTTCAGCTCGG  
GACACGGTTCAGGAACTGACTGACTCCGAGGACCCGTAAACGTAGGAGCATTCGCAAGAAACAGAAGAACCCTGAGCTCATTGCAAAAGAAACA  
TTCGACAAAGTCA **[<GK061E08>**CTGAGCTAAATGGAGATTCTTTGATCCCAACAATTTCCCGCAATGCCAATGTTCTCTCCAGAAATG  
TTGCTTAATCTGATGTGACTCACAAGTGGGAGAGCATTACATCATATTTATCATCAGGCTGAGATCCAAAGCTACCATTAGCAACAATGGC  
AGTACCTATCTCAACATATCGATGTTTGAATATCGATCTCTTTGATATAACCACTCTGCCTTTTGTGGTCTAAAGGCAATGCCGGTTA  
ACGAGTAGTGATATGA **[<GK061E08>**GCGTTATCAACCACACATCAGATATCCACCAGACATTTCACTGCAAAAGGAGATAGAGAAC  
CAGAAGCTCCTCGAAGGTACACATTTCTTATATGAACATTTTCAGTGGGACGAGAATAGGCAATCCATATTCATCCCAACCGCTTTTGAGG  
GAAATCGGTCATACCCACGTTAATGGTAGAGTTTGGATGCGAGCTAAATCAGAAGAATctgagaaacatacaaaaaacataagacatttc  
gttcttctatgcttagacacacaaaaagggtttagtctagaagaagtagagacaactaacCTGGTACAATACCATTGATATAAGGAGATT  
TAGAGAAAGAACTGATAAAGCATTTATGAATATATACATGCTGTCACAAGCAGTATTAGAGTCAAGCCTTTATCCAAAAACAAAA  
aaaagggttagggcctagatagtggtgaactatctcttacCTAGAGTAGATTGAATAGATTGAATAAGCAGGAGCATTCAAGAACGTAAGATT  
GGAGACAATTACATTTTCAGAAAGAAAGAACTCGATGAGGTGAGGACGGTTATACTTTAAGGAATGAGAAGTAAACCGATCCACCAAACCA  
AGCCTTGACCATCTATAGTTCCATTATCACcctaaccaaggaaaaaggatggagtaaccataattataatttgaaggatattgtaacaagtgaaa  
atgaaataaaaaatggtataaagcattgttggttacCTGTTACAACAACATCTAGCTTGTACCCTGTACCCTGTTCAAACTCTGTATCGCTTCCC  
AGGCAAATCAATTTCCCCTTCCGATGAAGGTAAGGATCAACCCTTCCAATGCGATGGATCcttttgaaagtaaaaaatttgggggttttgg  
ataaatttaaaagtttgggataaagtgtgagaatgagaaagaagcattgtaataacCTGAGAAGCGACTATAACGGCGCCGTTTTTCGAGAAA  
GAGAGTGGGTGGCTGGTGAGGCTAAAACCTCCGGTGAGCAATGTCCGGCGGAACATAGAGCTGGGCCCCACCTTTGTGGCGAAAGACA  
TAAGATAGAAAAACGGCTTTTGAACCGAAGAGTGTGGAGCTTTGGCATCTCCAACAGCTCCAAAATCTGTAATGGAGACACTGTGTGGT  
CTTGTACTCAATGATCGCCGCCAAGTTCTGTCGATATTTTCCGGCGCCGTGAACGTTTGGTAAATGGGAATAACACTGGTTAATGCCAG  
TATCAAGATTGTTACCACTctgctacaacagaagaatctgagttagaattacagatccaggtttgtcaaaactgtttagaatccgatccaacgg  
aatgatgaaaaatagagaagtaaatagttaaagaacagtagaagaagcaattccgagaaagggacaacctgagaagaagaggtatgta  
gtaatgtagtaagtagaagaagcaaaagagagagaacgcacttac**TGACAT**ctttatttgtaacgaagctgtcggaataattaaagagataaaa  
aagctataaagtgagaacttttcgcccacaaatgtaaccagacactcagagagagagagagagaagaagaagaagaataagaaggag  
aaggagaagagttctttctcgtaacacaccacacaaaacagtgaagggtttttttttt 5'

**Gène AT3G15720.1, orientation anti-sens**

3' **CTA**TCTAGCTAAAATATATGTAACCAAAGAGATAAAATGAAACTAATATGGCAATATTGTAACCTCTAAGTGTGTTCCCTCTGCTTTGAAA  
AACCCATATTGGATCTTGCAATCGGTTGTGTGTTGTCTTGGTGGACTGATTGTGCCGACATGCAAGTTTGTCCAGCAATTGCGCCGATG  
AAAACATATCTGTGAAAGTTCTAAAACATTTAGACCTGGTACAGCAATTTAGACGCACTCTCACGTTTAAACACTGTCTCTGTGCGACT  
GTGCTGATCTGATGATGCGGTTCTATTTTCATGTCTCTCAAGAAACTCTGTGATGGAACCTCTCTCGTGCATCGGAAGTCAACACC  
GTACTCTGACTTTTGAGCTCCCAATGAAATTAATAAACACCACTTTCTGCTCACTTCCACTGCCGACGActacaaaaccgacacaaaaaaacttaa  
attttgtta **[SALK\_062374>**ttaaaaacagctcttatgatcaaaagtaaatgagatacgtacCTTACGATCTTTGGCATTATCGGAATC  
GCCACCGTTATAGAACTGATCGATTATGATTTGATTTTCAACATTTCTAGAGTAATCCATTGAAAGTAAATCATTCTCGCGTAACCCGATC  
**[SALK\_062374>**CGCCctatgtatatataaccagaacttattttaaagaacaagaaaaagaacacatgtaaggtagactgaaacatgaga  
gtttaaataagaaaattcaaaagtacctaataCTGCCAAGTTTATGATCCGAGCTTCCAGCTCATAAGTTTCCCTCTAAGTTCCTCTAAGTTCAGCATA  
CATTCTCCACTGTAGCTGTCTCTCCATCTTTTCCCAAGCTTCCTATGcattttacaatatacataggtttatctatatatatgtaaaacatag  
ataacattttgtagtacatttttaatttggttaacCTTATCCCATTGGCCTGGTCCCAATCTATACCGGAATGTGGATGTTAGACGCTCCC  
GAATTAATCGCAATGCAATCATCACctgtcaatgatgataaactcagtaaaattccaaatgacattatttgatagtagacatttggtggaccgctc  
atttgacatgtagtaagattggtcattcacaacacacccgttccaaaactgtcttttggtttttcaataatgtatataaaatggagcacaata  
actgtatattgtaaaatttgcaagagctcctcaaaaatcgagttttatctacacCGGTTGCGATGATGCAATCTGGATGACAACGTTGGATGAA  
GCCCTACGTCGATGCCATCGGTGTAGGACTTGATTCAGGTGCATTTATTCGTAGGCTTGAGATGGTC **[SALK\_009840>**ACATAGTTG  
CACTCGCTTATGTGAATGTGAGCCATTGGACTATCTAAATGCGTTAAACC **[<SALK\_008496]**ACTCAATCTAAGGTTGTTGCAGCTCCTG  
AACTCAATGCcttaaatctcaataatctcttggtttataatggtttttatgctcaaaaactgcatacaaaaacgaaatcaatggttttgggaaaaaa  
acagetaacgtgatactcacGGTAGGCTAGAGCCTTTGTGTTCCCAACCAGCTCGAACCCGTTGCGGTTAAATTTACCGTCACTTCAATCAC  
AAGTCCCTCAATGTCTGTA AAAAAGATCCATTGATCTTTGTCCTCTTCCAAATTTCTTT **[SALK\_009840>**ACTCGGTGCAACAGCTT  
GCCTAACATcttcaattaaattcaaaaactagtaattacttactctcaaaaatattcgctcattaatccaaggaaaaaaacaggggaaaaaa  
cagagtacCTGAACAAAAACAGGGGTGGATTGGCAAGACCTTTGATCCGAGCTTCAAACTCAGGGCTGTAACATAAATGTCATCCCTGGCGAACACAAA  
CTGCCATCTCCTGTTCGCTACACACAGCTTCCCAAGCTTTCAAGAACGCcttttggttttttaaattccaggaaaaaaactttgatatttta  
ggaaacttttccgattataatggacaaatgacaactacagaacttagttttacCTGTGAATCGTCTGTAACCTCACTCTCAACCCGCTCCGA  
ATTGAGTAACATCCAATGCATTGCAAGATGTGAAGATTGAAAGAAAGAACAGTGAGAAATTCAGAACCAAGTCTTCTCTT**CAT** 5'

atcg : UTR **[xxx]** : insertion observé de l'ADN-T  
atcg : Intron **[xxx]** : insertion théorique de l'ADN-T, d'après le site tair.  
ATCG : Exon **[xxx]** : insertion de l'ADN-T non vérifiée  
**[xxx>**] : ADN-T sens  
**[<xxx]** : ADN-T antisens  
SALK\_062374 : pg ram1  
SALK\_008496 : pg ram2  
SALK\_009840 : pg ram3

**Figure 63 : Lieu d'insertion des ADN-T GABI-KAT et SALK dans les mutants pg r et pg ram. La localisation des ADN-T disponible sur le site TAIR (surligné en rouge ; https://www.arabidopsis.org) a été vérifié par séquençage, et s'est révélé incorrecte. La position observée d'après séquençage est indiqué en vert. La vérification de la position de l'ADN-T du mutant pg ram2 n'a pas pu être vérifié (surligné en rose) à cause d'une absence d'amplification par PCR, probablement due à l'absence de l'ADN-T à l'endroit indiqué par le site TAIR.**

## Chapitre IV : Etude de la fonction des PG *in planta*

L'étude de mutants est couramment employée afin d'établir la fonction de gènes. Il existe pour cela des banques de mutants disponibles pour le gène désiré, que l'on peut retrouver sur le site TAIR (<https://www.arabidopsis.org>). Le phénotype mutant est ensuite comparé au phénotype sauvage, afin de déterminer la fonction de la protéine absente chez le mutant. La fonction d'une protéine peut également être étudiée par le biais de sur-expresser de cette protéine. Cette méthode peut être utile dans le cas de l'étude d'une protéine appartenant à une famille multigénique, comme dans le cas des PG. En effet, la redondance génétique peut accroître le risque que les effets de la mutation soient masqués (Xiao et al., 2014). Enfin, il est possible de déduire la fonction d'une protéine en étudiant sa sur-expression ou sa sous-expression dans différentes conditions de cultures (comme des stress biotiques ou abiotiques) par RT-qPCR, ou en étudiant la modification du pattern d'expression grâce à des transformants de type *prom::GUS*.

### IV.1. Mutants et sur-expressesurs *pg ram* et *pg r* disponibles

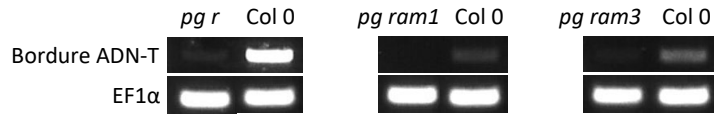
#### IV.1.1. Lieu d'insertion de l'ADN-T des mutants

Afin de caractériser les fonctions des PG R et PG RAM, des mutants d'insertion d'ADN-T provenant de différentes collections ont été commandés : un mutant *pg r* (GK061E08), ainsi que trois mutants *pg ram*, dont les lieux d'insertion de l'ADN-T sont différents (SALK062374, SALK008496 et SALK009840, nommés respectivement *pg ram1*, *pg ram2* et *pg ram3*). Le lieu d'insertion des ADN-T sont disponibles sur le site TAIR (<https://www.arabidopsis.org>), et sont présentés en rouge dans la [figure 63](#). Pour vérifier le lieu d'insertion des ADN-T, des amplifications d'ADN par PCR ont été réalisées à l'aide d'une amorce encadrant le lieu d'insertion théorique des ADN-T, et d'une amorce en bordure des ADN-T. La séquence des amplicons a été obtenue par séquençage, et comparée à la séquence théorique. Cette procédure a permis de mettre en évidence que les lieux d'insertion des ADN-T annoncé sur le site TAIR étaient incorrects. Les positions observées d'après séquençage sont indiquées en vert dans la [figure 63](#).

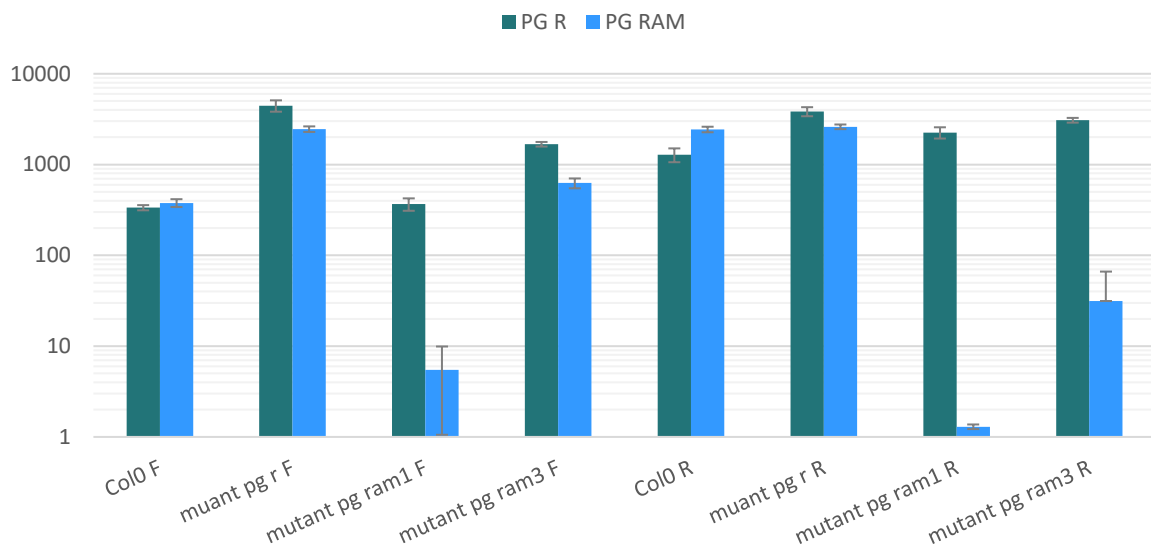
Ces résultats montrent que l'ADN-T du mutant *pg r* est inséré dans le 5<sup>e</sup> exon du gène, celui de *pg ram1* dans le 6<sup>e</sup> intron, et enfin celui de *pg ram3* dans le 3<sup>e</sup> exon. En ce qui concerne le mutant *pg ram2*, la position correcte de l'ADN-T n'a pas pu être vérifiée, en raison de l'absence d'amplification d'ADN. Les amorces utilisées n'encadrent probablement pas l'ADN-T, par conséquent celui-ci ne doit pas être situé à l'endroit attendu. Il n'a donc pas été étudié dans ce projet, l'étude de deux allèles mutants étant considérée comme suffisante.

#### IV.1.2. Vérification de l'absence de transcrits chez les mutants

Avant d'analyser le phénotype des mutants homozygotes, la vérification de l'absence de transcrits de chaque mutant a été réalisée à la fois par PCR semi-quantitative (ou en point final) et par RT-qPCR, à partir d'ADNc de plantes mutantes *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3*, ainsi que de plantes sauvages Col-0.



**Figure 64 : Vérification de l'absence de transcrits PG R et PG RAM chez les mutants respectifs *pg r* ainsi que *pg ram1* et *pg ram3*, par amplification d'ADN par PCR.** Ces PCR ont été réalisées à partir d'ADNc de plantes Col-0 et de mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3*. Les amorces qui ont été utilisées sont les amorces en bordure du lieu d'insertion des ADN-T, ainsi que des amorces spécifiques au gène *EF1α* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha) utilisé comme gène de référence.



**Figure 65 : Expression relative des gènes PG R et PG RAM chez le sauvage, les mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3*.** F : feuilles. R : racines. Sondes Taqman (Thermo Fisher scientific). Gène de référence : *APT1*.



Les sites d'hybridation des amorces utilisées pour réaliser les PCR semi-quantitatives sont visibles en [annexe 10](#). Ces sites ont été choisis afin d'encadrer le lieu d'insertion des ADN-T, ce qui permet d'obtenir des résultats plus fiables. Les amplifications par PCR montrent que les transcrits de *PG R* et *PG RAM* sont bien présents chez le sauvage, en revanche l'expression de *PG R* est fortement diminuée chez le mutant *pg r*, de même que pour *PG RAM* chez le mutant *pg ram3*. Les transcrits de *PG RAM* sont totalement absents chez le mutant *pg ram1* ([figure 64](#)). Ces résultats indiquent que les mutants *pg r* et *pg ram3* sont des mutants « knock-down » (KD ; qui sous-expriment les gènes mais les expriment tout de même), et que le mutant *pg ram1* est un mutant « knock-out » (KO ; qui n'exprime pas du tout le gène). La présence de transcrits résiduels chez les mutants *pg r* et *pg ram3* n'implique pas pour autant que ces transcrits soient ensuite traduits en protéines.

Afin de compléter ces résultats, et pour connaître le niveau d'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* dans la plante sauvage, mais également dans les mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3*, les ADNc de leurs ARNm respectifs ont été quantifiés par RT-qPCR.

Des RT-qPCR ont été réalisées grâce au PowerUp SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher scientific). Les sites d'hybridation des amorces utilisées sont visibles en [annexe 11](#). Malheureusement, les amorces utilisées amplifiaient deux amplicons, aussi bien pour le gène *PG R* que pour le gène *PG RAM* ([annexe 12](#)). C'est en effet courant dans le cas de l'étude de familles multigéniques, car les séquences des gènes d'une même famille comportent des redondances. Afin d'éviter ce problème, des sondes TaqMan (Thermo Fisher scientific) ont été élaborées pour chacun des gènes. Les sondes TaqMan ont l'avantage d'être beaucoup plus spécifiques, car elles reconnaissent une courte séquence au nucléotide près. Les sites d'hybridation des amorces et des sondes TaqMan sont indiqués dans l'[annexe 13](#). Les sites d'hybridation des sondes TaqMan ont été choisis afin d'amplifier une séquence consensus aux différents variants des gènes et qui n'est pas présente chez les autres gènes *PG*.

Les résultats par RT-qPCR obtenus montrent que les niveaux d'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* sont identiques entre eux au niveau des feuilles du sauvage. Au niveau racinaire, le niveau d'expression de *PG RAM* est légèrement plus important que *PG R* ([figure 65](#)). Ce résultat est surprenant au vu de l'étendue du patron d'expression de *PG R* au niveau racinaire, par rapport à *PG RAM*, dont l'expression est très localisée et très restreinte. Cela démontre l'importance de l'expression de *PG RAM* au niveau du méristème racinaire. Les quantifications des transcrits des gènes *PG R* et *PG RAM* chez le sauvage nous apprennent également que ces deux gènes sont davantage exprimés au niveau des racines que des feuilles, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec les constructions *prom::GUS*.

Au niveau des feuilles comme des racines, l'expression relative de *PG R* dans le mutant *pg r* est étonnamment plus élevée que chez le sauvage ([figure 65](#)). Ces résultats sont donc à l'opposé de ce qui a été observé par amplification par PCR semi-quantitative ([figure 64](#)). La différence entre les résultats de PCR et de RT-qPCR est probablement due aux sites d'hybridation des amorces utilisées. En effet, les amorces de PCR ont été conçues pour amplifier la zone où l'ADN-T du mutant *pg r* est implanté, alors que les amorces de RT-qPCR



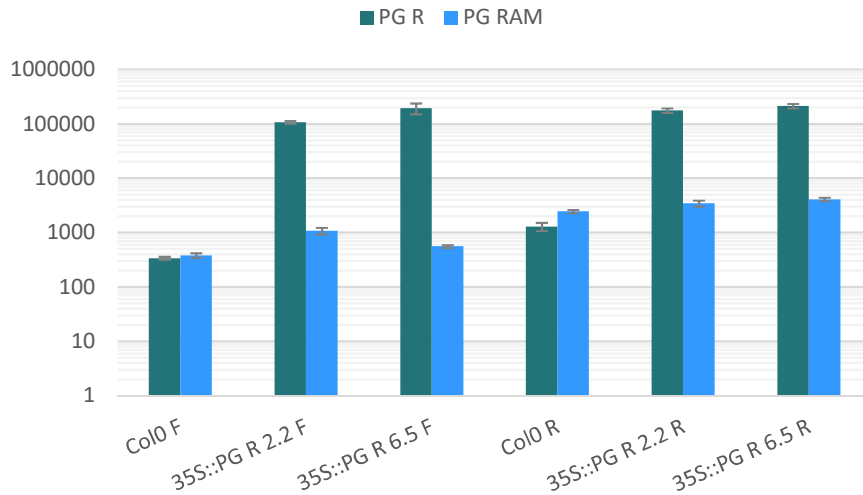
ont été conçues pour n'amplifier que les transcrits du gène *PG R*. La figure en [annexe 13](#) montre que les amorces de RT-qPCR se fixent sur la séquence de l'ADNc du gène *PG R* en amont du lieu d'insertion de l'ADN-T (visible en aval sur la séquence, puisque le gène est présenté dans l'orientation anti-sens). Ceci pourrait expliquer pourquoi la transcription du gène *PG R* est visible chez le mutant *pg r* en RT-qPCR. En effet, malgré la présence de l'ADN-T dans le gène, le promoteur est actif. Le début de la séquence du gène *PG R* pourrait donc être transcrite jusqu'à l'ADN-T du mutant *pg r*, puis la transcription serait stoppée dans l'ADN-T. Comme les sites d'hybridation des amorces de RT-qPCR sont en amont de l'ADN-T, des transcrits du gène *PG R* sont observés. Cependant, cela ne signifie pas que les ARNm soient par la suite traduits. Cette explication n'est qu'une supposition, cependant, il est préférable de ne prendre en compte que les résultats de PCR en point final ([figure 64](#)).

Par ailleurs, l'augmentation du nombre de transcrits du gène *PG R* observée au niveau du mutant *pg r* pourrait être interprétée comme une augmentation du niveau d'expression de *PG R*. La transformation du mutant *pg r* par un gène rapporteur tel que la construction *promPG R::GUS* pourrait le confirmer. Cela signifierait que le mutant perçoit l'absence de l'activité de la protéine *PG R*, résultant en une augmentation de l'expression de son gène, afin de rétablir l'activité de *PG R*. Dans ce cas, il doit exister un signal de l'absence de l'activité de *PG R*, qui résulte en l'activation de son promoteur. Mais ces spéculations nécessitent d'être vérifiées avant d'être prises en compte.

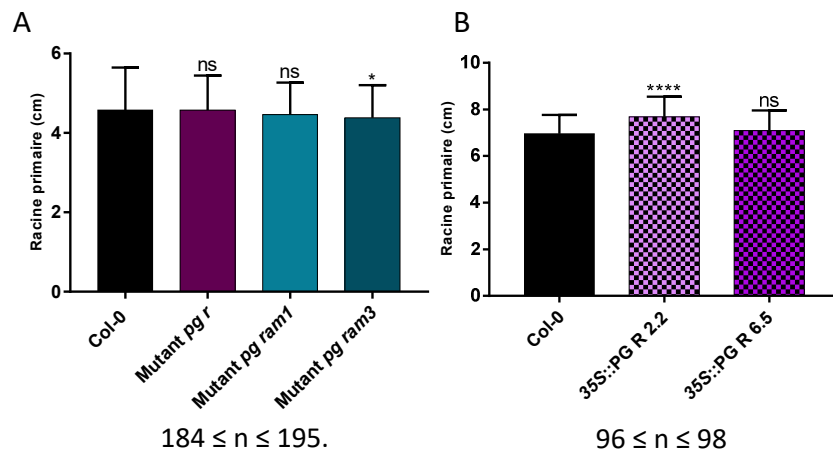
Au niveau racinaire, le niveau d'expression de *PG RAM* est constant chez le sauvage et le mutant *pg r*. En revanche, au niveau des feuilles, *PG RAM* semble être sur-exprimé chez le mutant *pg r* ([figure 65](#)). Cette observation laisse à penser que *PG RAM* pourrait compenser la mutation de *pg r* (mutation observée en PCR en point final ; [figure 64](#)), mais uniquement au niveau des feuilles.

L'expression de *PG RAM* est drastiquement diminuée chez le mutant *pg ram1*, par rapport au sauvage, au niveau des feuilles comme des racines ([figure 65](#)). Cela confirme donc les résultats de la [figure 64](#), qui indiquaient que *pg ram1* est un mutant KO. Le niveau de l'expression de *PG RAM* montre également une diminution très importante au niveau des racines de *pg ram3* par rapport au sauvage, mais cette diminution est moins importante au niveau des feuilles de *pg ram3* ([figure 65](#)). Ceci est cohérent avec les résultats de la [figure 64](#), qui signifiaient que *pg ram3* est vraisemblablement un mutant KD. Pour les mutants *pg ram1* et *pg ram3* les amorces utilisées en RT-qPCR sont fiables, puisqu'elles s'hybrident en aval de l'ADN-T de *pg ram3*, et *pg ram1* est situé dans l'intron encadré par le site d'hybridation des amorces. Lorsqu'un ADN-T est situé dans un intron, il arrive qu'ils soient éliminés par l'épissage, et donc que la protéine soit traduite, mais puisque les niveaux de transcrits du gène *PG RAM* détectés sont très faibles chez le mutant *pg ram1*, ce problème ne semble pas être présent.

Enfin, l'expression de *PG R* au niveau des feuilles de *pg ram1* est comparable à son niveau d'expression dans le sauvage, en revanche, l'expression de *PG R* au niveau des feuilles de *pg ram3* est supérieure à son expression dans le sauvage ([figure 65](#)). Au niveau des racines des



**Figure 67 : Expression relative des gènes PG R et PG RAM chez le sauvage et les sur-expressseurs 35S::PG R. F : feuilles. R : racines. Sondes Taqman (Thermo Fisher scientific). Gène de référence : APT1.**



**Figure 66 : Croissance de la racine primaire des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 ainsi que des sur-expressseurs 35S::PG R. Culture pendant 10 jours sur milieu Arabidopsis Duchefa, en jours longs et à 21 °C constants. A) Moyennes de 4 répétitions. B) Moyennes de 2 répétitions. Les valeurs de chaque mutant et sur-expressseurs ont été comparées à celles du sauvage Col-0 à l'aide d'un test de multi-comparaison (post-test de Dunn ou de Dunnett,  $\alpha = 5\%$ ). Aucune valeur aberrante n'a été détecté (test de Rout,  $Q = 5\%$ ). ns :  $P_v > 0,05$  ; \* :  $P_v \leq 0,05$  ; \*\*\*\* :  $P_v \leq 0,0001$ .**

mutants *pg ram1* et *pg ram3*, l'expression de *PG R* est relativement stable, mais semble présenter une légère augmentation.

Les résultats de RT-qPCR confirment donc la diminution de l'expression de *PG RAM* chez les mutants *pg ram1* et *pg ram3*. En revanche, en ce qui concerne l'expression de *PG R* chez le mutant *pg r*, les résultats de RT-qPCR ne sont pas les meilleurs indicateurs, à cause du site d'hybridation des amorces. Il vaut donc mieux se baser sur les résultats de PCR semi-quantitative, qui indiquent que *pg r* est un mutant KD. Enfin, des compensations de l'expression des gènes codant des PG semblent se mettre parfois en place chez les mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3*, puisque l'expression de *PG RAM* est plus importante dans les feuilles du mutant *pg r*, et celle de *PG R* est augmentée dans les feuilles de *pg ram3*, ainsi que dans les racines des mutants *pg ram1* et *pg ram3*.

### IV.1.3. Vérification de l'augmentation de la transcription chez les sur-expressseurs

Plusieurs sur-expressseurs *35S::PG R*, issus de transformations indépendantes, ont été obtenus. Deux d'entre eux, *35S::PG R 2.2* et *35S::PG R 6.5*, ont été étudiés au cours de ce projet. En revanche, aucun sur-expressseur *35S::PG RAM* n'a pu être obtenu, malgré l'utilisation de deux méthodes de clonages différentes, et après plusieurs tentatives de transformations. Ceci pourrait indiquer une létalité engendrée par la sur-expression de cette PG.

En ce qui concerne les deux sur-expressseurs *35S::PG R*, le niveau d'expression de *PG R* est très nettement augmenté, au niveau des feuilles comme des racines ([figure 66](#)).

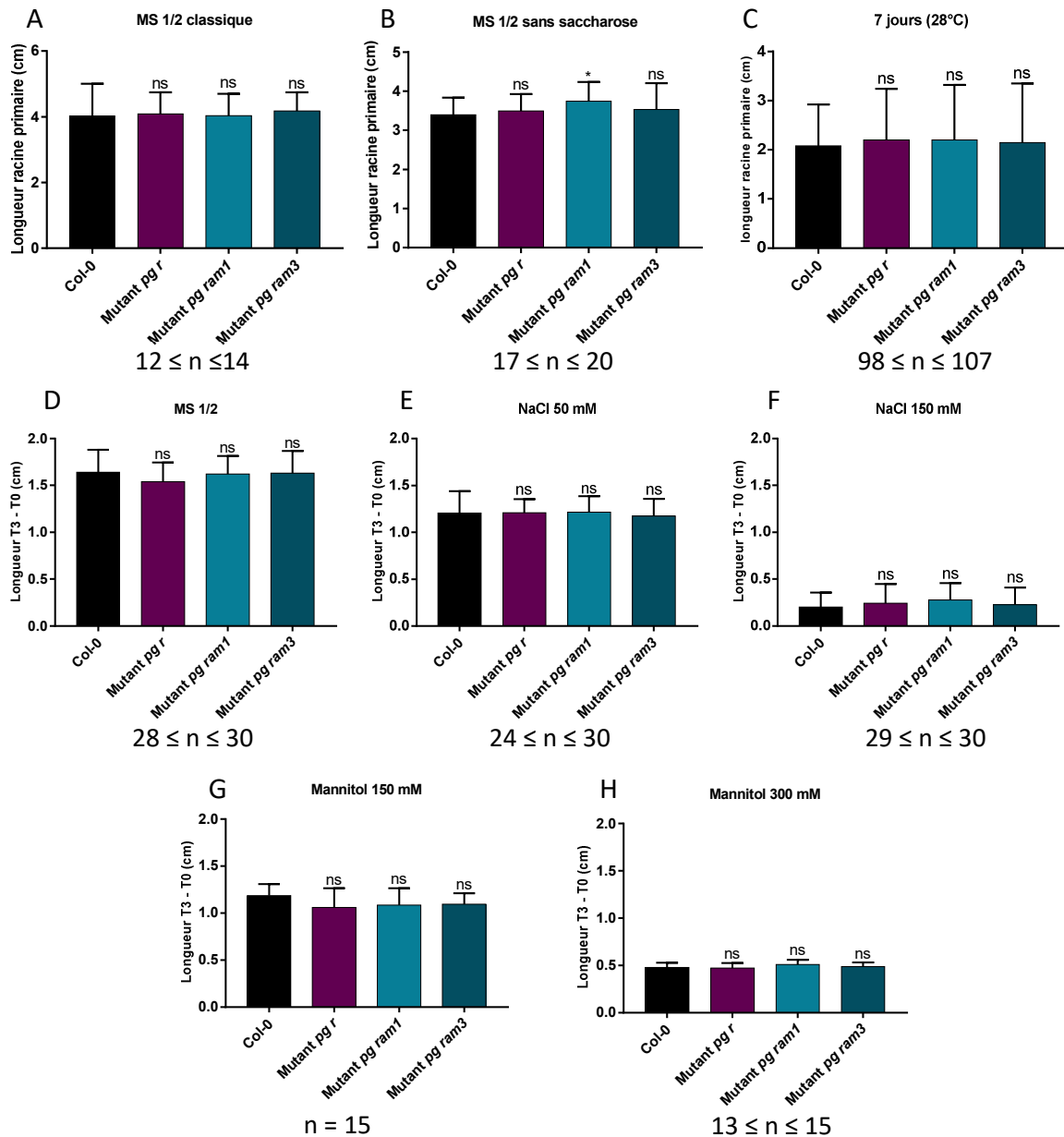
Au niveau racinaire, le niveau d'expression de *PG RAM* est constant chez le sauvage et chez les sur-expressseurs *35S::PG R*. En revanche au niveau des feuilles, *PG RAM* présente une légère sur-expression chez le sur-expressseur *35S::PG R 2.2*. Toutefois, *PG RAM* n'étant par sur-exprimé au niveau des feuilles du sur-expressseur *35S::PG R 6.5*, cette observation semble négligeable.

## IV.2. Rôles des PG dans la croissance et l'élongation cellulaire

### IV.2.1. Etude de l'allongement racinaire

En conditions de culture classiques, les racines primaires des mutants ne présentent pas de phénotype de croissance de la racine primaire différent du sauvage (type Col-0), hormis le mutant *pg ram3* qui possède des racines légèrement plus petites, mais la différence est peu significative ([figure 67 A](#)). En revanche, les plantules de la lignée sur-expressive *35S::PG R 2.2* possèdent des racines primaires significativement plus longues que le Col-0, mais pas les plantules de la deuxième lignée sur-expressive *35S::PG R 6.5*, dont les racines ne sont pas significativement différentes du sauvage ([figure 67 B](#)).

L'absence de phénotype chez les mutants (hormis *pg ram3*, mais qui ne concerne donc qu'une seule lignée) peut soit témoigner de l'absence de rôles de *PG R* et de *PG RAM* dans le



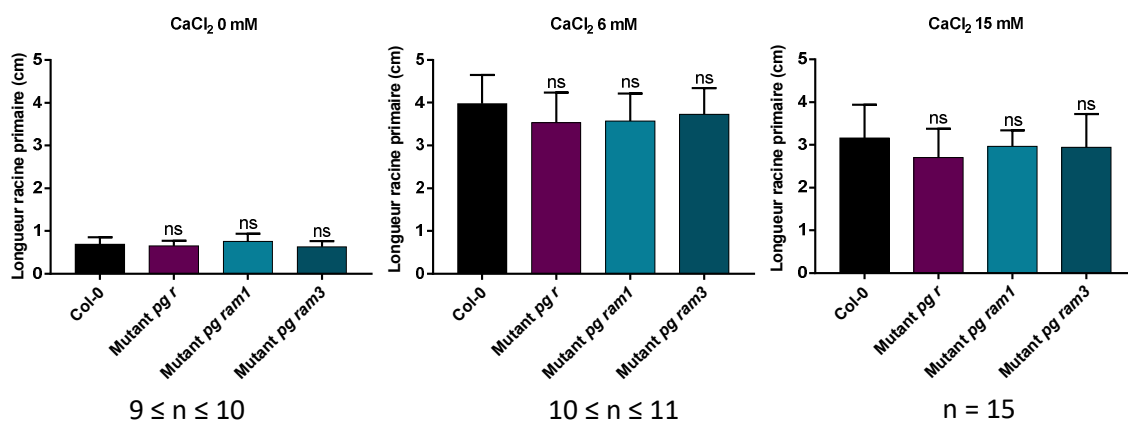
**Figure 68 : Croissance de la racine primaire des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 suivant différentes conditions de culture. A, B) Culture 9 jours sur milieux MS ½ classique (avec 10 g/L de saccharose) ou sans saccharose. Moyennes d'une répétition. C) Moyennes d'une répétition à 28 °C constants et d'une répétition 2 jours à 21 °C puis 5 jours à 28 °C. Milieu MS ½, en jours longs. Moyennes d'une répétition. D-H) Culture 4 jours sur MS ½, puis transfert sur milieu NaCl, mannitol ou MS ½ (contrôle). Les mesures représentent la différence de longueur des racines entre T3 (3 jours de culture sur les nouveaux milieux) et T0 (après transfert de boîte). D-F) Moyennes de deux répétitions. G-H) Moyenne d'une répétition. Pour chaque expérience, les valeurs des mutants ont été comparées à celles du sauvage Col-0 à l'aide d'un test de multi-comparaison (post-test de Dunnett ou de Dunn,  $\alpha = 5\%$ ). Les valeurs aberrantes ont été éliminées à l'aide du test de Rout ( $Q = 5\%$ ). ns :  $P_v > 0,05$  ; \* :  $P_v \leq 0,05$ .**

développement et la croissance racinaire, soit indiquer une compensation fonctionnelle chez les mutants par d'autres PG, due à la redondance génétique. Le phénotype présenté par la lignée sur-expressive 35S::PG R 2.2 pourrait confirmer la deuxième hypothèse, car l'augmentation de la longueur des racines primaires de cette lignée suggère que PG R est impliquée dans la croissance racinaire. En revanche, comme la lignée 35S::PG R 6.5 ne possède pas ce même phénotype, ce rôle est incertain, car l'augmentation de la taille des racines primaires des plantes 35S::PG R 2.2 pourrait être due au lieu d'insertion de l'ADN-T dans le génome, et non à la sur-expression de *PG R*. Enfin, l'hypothèse de la compensation fonctionnelle chez les mutants est appuyée par les résultats de RT-qPCR, où des compensations de l'expression des gènes PG chez les différents mutants est parfois visible.

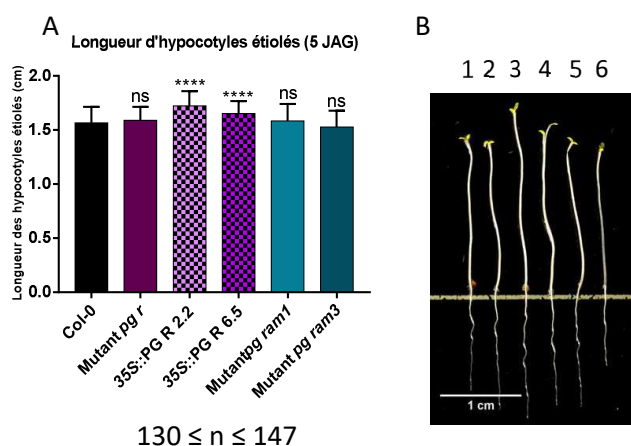
Nous avons ensuite mesuré les racines primaires des mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3*, ainsi que du sauvage Col-0, de plantules mises en culture dans différentes conditions (MS ½ sans saccharose, culture à 28°C, stress salin et stress osmotique). L'objectif était de voir si la croissance racinaire serait différente entre les mutants et le sauvage dans des conditions différentes ou plus stressantes. En effet, un changement de condition de culture peut parfois permettre l'apparition d'un phénotype absent en conditions de culture optimales. Les résultats de la [figure 68 A et B](#) montrent que les mutants ne présentent pas un phénotype différent du sauvage, que ce soit sur milieu MS ½ classique (avec 10 g.L<sup>-1</sup> de saccharose) ou sans saccharose. Seul le mutant *pg ram1* montre une légère augmentation de la taille de ses racines par rapport au sauvage sur milieu sans saccharose, mais cette différence est peu significative, et est absente chez le mutant *pg ram3*. De même, si l'on regroupe les données d'une expérience à 28°C constants pendant 7 jours, et d'une autre expérience 2 jours à 21°C puis 5 jours à 28°C ([figure 68 C](#)), on constate qu'il n'y a pas non plus de différence entre la croissance des racines des mutants et du sauvage.

Pour obtenir les résultats de la [figure 68 D-H](#), nous avons cultivé des plantes pendant 4 jours sur un milieu MS ½ classique, puis nous avons transféré les plantules sur des milieux MS ½ enrichis en sel (NaCl 50 et 150 mM) et en mannitol (150 et 300 mM), ainsi que sur MS ½ classique comme condition témoin. Un transfert après quelques jours de culture sur un milieu classique est en effet nécessaire pour permettre la germination des graines, et obtenir des racines mesurables. Le transfert correspond au T0. Après 3 jours de culture sur les différents milieux (T3), la différence de longueur des racines primaires entre T3 et T0 a été calculée. Les résultats obtenus n'indiquent aucune différence de croissance racinaire entre les plantes de génotype mutant et sauvage, quel que soit le milieu de culture.

L'ensemble de ces résultats démontre que, suivant les différentes conditions testées, la croissance de la racine primaire des mutants n'est pas différente de celle du sauvage. Comme expliqué précédemment, cela n'indique pas forcément que PG R et PG RAM n'ont aucune fonction dans le développement racinaire, mais plus vraisemblablement que la plante compense l'absence de ces PG par la sur-expression d'autres PG, afin de compenser la mutation.



**Figure 69 : Croissance de la racine primaire des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 suivant différentes concentrations en calcium (CaCl<sub>2</sub>).** Moyennes d'une répétition. Pour chaque condition, les valeurs des mutants ont été comparées à celles du sauvage Col-0 à l'aide d'un test de multi-comparaison One way ANOVA (post-test de Dunnett,  $\alpha = 5\%$ ). Aucune valeur aberrante n'a été détectée (test de Rout,  $Q = 5\%$ ). ns :  $P_v > 0,05$ .



**Figure 70 : Croissance d'hypocotyles étiolés des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 ainsi que des sur-expressesurs 35S::PG R. A et B) Culture pendant 6 jours à l'obscurité après un flash lumière de 6 h.** A) Les valeurs correspondent aux moyennes de la longueur des hypocotyles 5 jours après germination (JAG), de deux répétitions. Les valeurs des mutants et des sur-expressesurs 35S::PG R ont été comparées à celles du sauvage Col-0 à l'aide d'un test de multi-comparaison (post-test de Dunn,  $\alpha = 5\%$ ). Les valeurs aberrantes ont été éliminées à l'aide d'un test de Rout ( $Q = 5\%$ ). ns :  $P_v > 0,05$ ; \*\*\*\* :  $P_v \leq 0,0001$ . B) 1 : Col-0 ; 2 : mutant pg r ; 3 : 35S::PG R 2.2 ; 4 : 35S::PG R 6.5 ; 5 : mutant pg ram1 ; 6 : mutant pg ram3.



### IV.2.3. Influence du calcium sur l'allongement racinaire

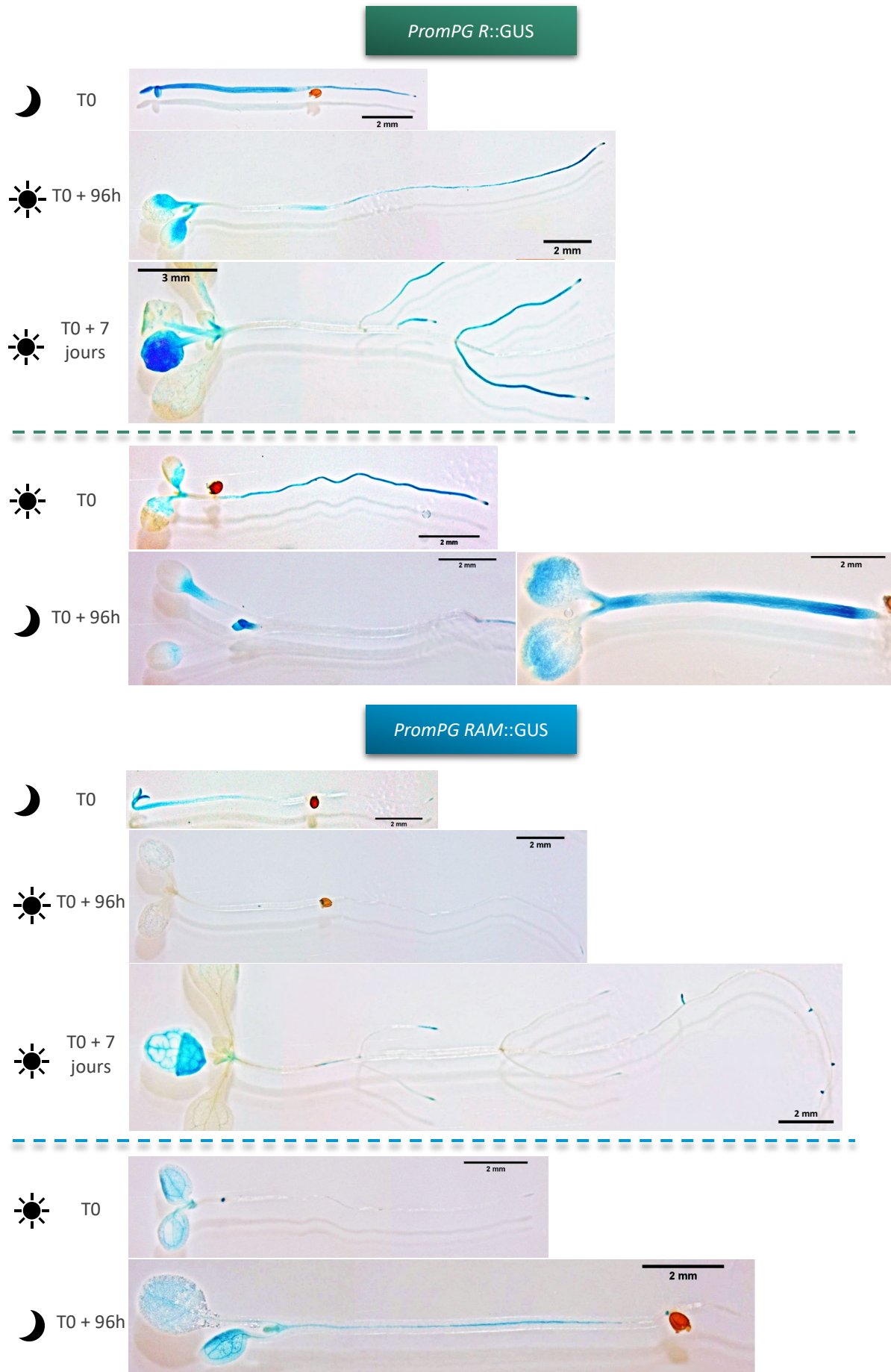
Le calcium ayant une place importante dans la configuration des pectines, la croissance racinaire des mutants et du sauvage a été étudiée en faisant croître des plantules sur des milieux de culture supplémentés en différentes concentrations de calcium. En effet, partant du fait que les HG déméthylestérifiés sont soit clivés par des PG et autres enzymes de dégradation des pectines, soit complexés *via* du calcium, nous avons supposé qu'une différence de concentration de calcium disponible dans le milieu pourrait influencer le devenir des HG, de manière différente suivant le niveau d'expression des gènes *PG R* et *PG RAM*. Ainsi, la croissance racinaire serait impactée de manière différente chez le sauvage et les mutants. En effet, en cas d'une concentration importante de calcium, on pourrait imaginer que le nombre de boîtes à œuf formées entre les HG et le calcium augmente. Chez le génotype sauvage Col-0, les HG seraient davantage clivés, pour éviter que les tissus ne soient rigidifiés. En revanche, chez les mutants *pg r* et *pg ram*, le clivage des HG devrait être réduit, les parois seraient alors rigidifiées à cause des boîtes à œufs, menant à des racines plus courtes. A l'inverse, en cas d'une réduction de la teneur en calcium, les racines du sauvage Col-0 devraient présenter une bonne croissance, puisqu'un nombre inférieur de boîte à œuf seraient formés, et que les HG seraient alors plus « disponibles » à la dégradation par les PG. En revanche, chez les mutants *pg r* et *pg ram*, on pourrait s'attendre à ce que les racines soient plus petites que le Col-0, à cause d'un manque de PG pour dégrader la paroi.

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des plantules, appelé MS ½, comportant 1,5 mM de calcium, les concentrations 6 et 15 mM de calcium ont été choisies, ainsi qu'un milieu témoin dépourvu de calcium (0 mM). Les résultats, présents dans la [figure 69](#), montrent qu'encore une fois, aucune différence de croissance racinaire significative n'est observée entre les mutants *pg r*, *pg ram1* ainsi que *pg ram3* et le sauvage. Etant donné l'importance du calcium pour une multitude de processus physiologiques, notamment le développement de la plante (comme en témoigne les plantes ayant poussé en absence de calcium), il est possible qu'une variation de sa concentration impacte trop de signaux et de processus pour que la différence de pourcentage d'HG complexé par le calcium, entre le sauvage et les mutants, soit visible. Il est également probable que cette différence de pourcentage entre le sauvage et les mutants soit négligeable, ou que, comme pour les autres expériences, des compensations entre PG aient été mises en place.

### IV.2.4. Etude de l'allongement d'hypocotyles étiolés

#### IV.2.4.a. Allongement d'hypocotyles sauvages et mutants

Les gènes *PG R* et *PG RAM* sont exprimés dans l'hypocotyle. Or, les hypocotyles étiolés sont de bons modèles d'étude de l'élongation cellulaire, leur croissance étant uniquement due à l'allongement des cellules, les cellules de l'épiderme et les cellules corticales ne présentant pas de divisions significatives (Gendreau et al., 1997). De la même manière que pour la croissance racinaire, les hypocotyles étiolés des mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3* ne montrent pas de différence de longueur significative par rapport au sauvage ([figure 70 A](#)). En revanche, les deux lignées sur-exprimant *PG R* possèdent des hypocotyles significativement



**Figure 71 : Motifs d'expressions GUS des gènes PG R et PG RAM après passage de plantules de 5 jours à l'obscurité (symbolisée par une lune) ou après passage d'hypocotyles étiolés de 3 jours à la lumière (symbolisée par un soleil).**

plus longs que ceux du sauvage ([figure 70 A](#)). Les hypocotyles des sur-expressseurs étant seulement plus longs que ceux du sauvage, mais pas plus larges ([figure 70 B](#)), ce qui aurait été le témoignage d'une croissance isotropique, il s'agit donc d'une croissance anisotropique. Ces résultats mettent clairement en évidence l'implication de PG R dans la croissance anisotropique, probablement due à l'assouplissement des parois longitudinales des cellules en extension. Du fait que PG R ne présente pas de système d'adressage connu à des zones particulières, il est vraisemblable que PG R agisse dans les zones où son substrat, les HG déméthylestérifiés, sont présents. En l'occurrence, il s'agit des parois longitudinales des cellules en élongation. Cela signifierait que l'activité PG serait régulée par la déméthylestérification préalable des HG des parois longitudinales des cellules, avant que celles-ci n'entrent en croissance anisotropique. Par conséquent, selon cette hypothèse, l'activité PME serait cruciale à la régulation de l'activité PG, lors de la croissance anisotropique.

Ces résultats impliquent également qu'il y a bien une compensation chez le mutant *pg r*, expliquant l'absence de croissance réduite des hypocotyles de ce mutant par rapport au sauvage. Mais il est également possible que chez le sauvage, l'activité de PG R soit négligeable, et que celle-ci ne soit visible qu'en cas de sur-expression de la protéine.

#### IV.2.4.b. Modification de l'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* dans des hypocotyles en élongation

Pour compléter l'étude sur l'allongement des hypocotyles étiolés, nous avons souhaité mettre en évidence la relation entre l'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* et l'allongement des hypocotyles, à l'aide des transformants *promPG::GUS*. Nous avons pour cela cultivé des plantules *promPG R::GUS* et *promPG RAM::GUS* durant 5 jours en jours longs (16 h de jours et 8 h de nuit), puis nous les avons placées à l'obscurité pendant 96 h, afin de provoquer l'allongement des hypocotyles. En parallèle, des hypocotyles étiolés ayant poussé 3 jours à l'obscurité ont été placés 7 jours en culture à la lumière, en jours longs, afin de stopper la croissance des hypocotyles. Le but de cette expérience est de voir l'évolution du marquage GUS au niveau de l'hypocotyle lorsque celui-ci entre en élongation (lors du passage des plantes de la lumière à l'obscurité), ou lorsque l'élongation s'arrête (lors du passage des plantes de l'obscurité à la lumière).

Comme le montre les photos de la [figure 71](#), le marquage GUS présent au niveau des hypocotyles étiolés des transformants *promPG R::GUS* et *promPG RAM::GUS* à T0 disparaît globalement lors du passage des hypocotyles à la lumière. Pour les hypocotyles *promPG R::GUS*, un marquage subsiste de 24 à 96 h au niveau de la base de l'hypocotyle (voir photos supplémentaires dans l'[annexe 14](#)), mais celui-ci disparaît après 7 jours de culture à la lumière. Pour les hypocotyles *promPG RAM::GUS*, le marquage GUS disparaît totalement au niveau des hypocotyles placés à la lumière. Puis après 72 h de culture à la lumière, un marquage GUS ponctuel apparaît au niveau des hypocotyles, correspondant à des racines adventives en développement ([figure 71](#) et photos supplémentaires dans [annexe 15](#)). Enfin, après 7 jours de culture à la lumière, un marquage est présent au niveau des tissus conducteurs des hypocotyles *promPG RAM::GUS* ([figure 71](#)).



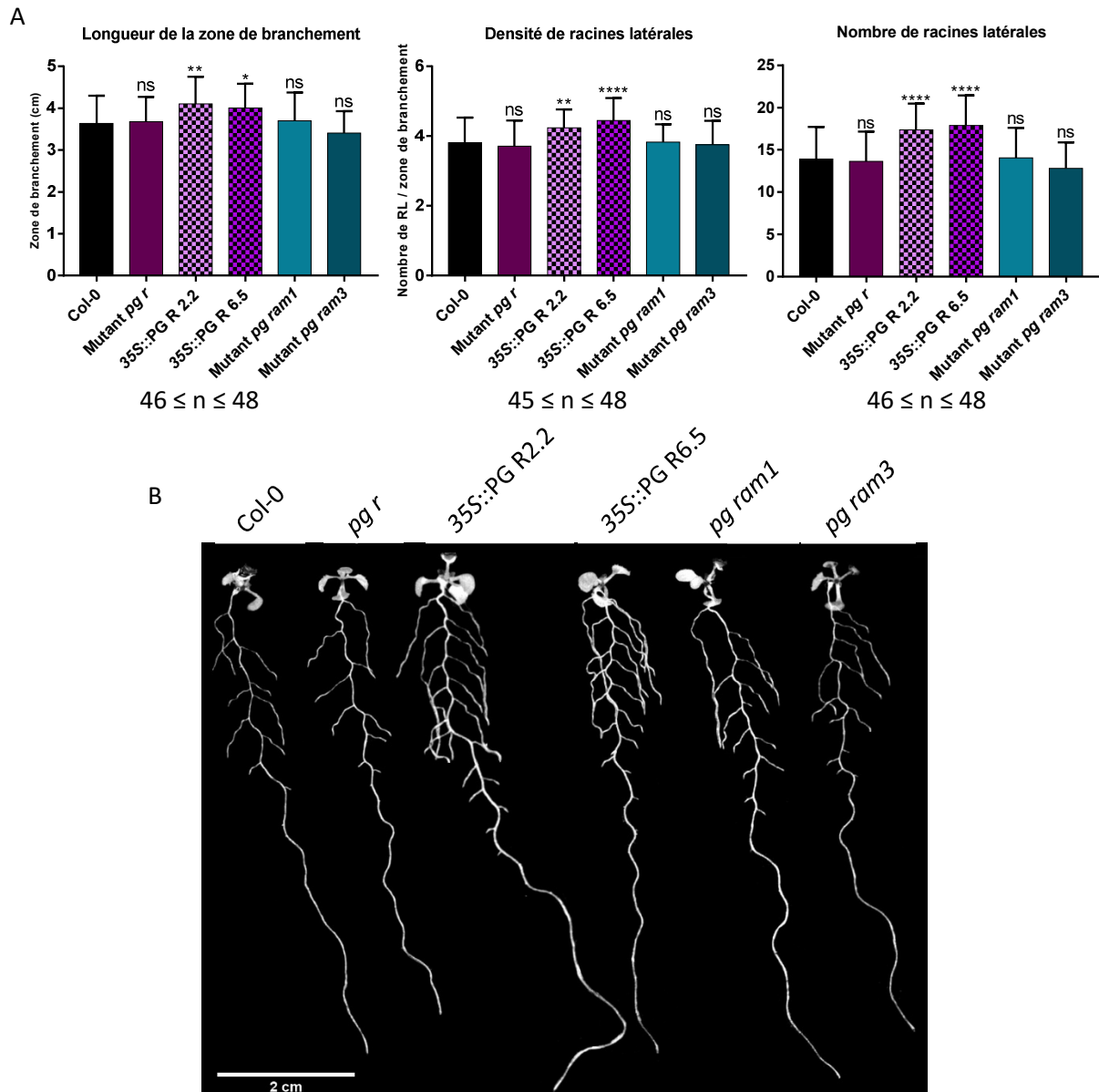
La disparition du marquage GUS lors du passage à la lumière indique que PG R et PG RAM seraient nécessaires aux hypocotyles en élongation à l'obscurité, mais pas en absence d'élongation, lors du passage des hypocotyles à la lumière. Cette observation est en accord avec ce qui est attendu d'une protéine nécessaire à l'élongation cellulaire. Ces résultats sont également cohérents avec l'augmentation de la longueur des hypocotyles étioyés des génotypes sur-exprimant PG R par rapport au sauvage Col-0. L'absence de phénotypes observés chez les mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3* au niveau des hypocotyles étioyés renforcerait l'idée qu'il pourrait exister chez les mutants une compensation génique, masquant l'effet de l'absence d'expression des gènes *PG R* et *PG RAM*. Enfin, le marquage GUS des racines adventives émergentes présentes sur les hypocotyles *promPG RAM::GUS* montrent que l'émergence des racines adventives nécessite, tout comme l'émergence des racines latérales, l'expression de *PG RAM*. Il est également possible que l'apparition du marquage au niveau des vaisseaux conducteurs des hypocotyles *promPG RAM::GUS* soit lié à sa fonction dans l'émergence des racines adventives.

Au niveau des hypocotyles *promPG R::GUS* des plantules mises à l'obscurité, le marquage est différent suivant les plantules observées, pour une seule lignée, pourtant homozygote. Chez certaines plantules, les hypocotyles possèdent un marquage GUS sur toute leur longueur, mais chez une majorité, le marquage est uniquement présent vers le haut des hypocotyles (comme à T0) jusqu'à 48 h, puis à partir de 72 h le marquage est totalement absent ([figure 71](#) et [annexe 14](#)). La différence de marquage d'un hypocotyle à un autre est assez surprenant. L'utilisation d'une lignée différente pourrait permettre de lever cette ambiguïté. La réapparition du marquage est en tout cas cohérente avec les résultats précédemment obtenus, démontrant que *PG R* est exprimée uniquement lorsque les cellules s'allongent.

Concernant les plantules *promPG RAM::GUS* passées à l'obscurité, un marquage GUS apparaît à partir de 72 h au niveau de tissus conducteurs de l'hypocotyle, sur toute la longueur de celui-ci ([figure 71](#) et [annexe 15](#)). Le marquage au niveau des hypocotyles *promPG RAM::GUS* est donc peu généralisé, par rapport à ce qui est observé chez les hypocotyles *promPG R::GUS*. Ces observations montrent qu'il y a peu de chances pour que *PG RAM* intervienne réellement dans l'élongation cellulaire, ou bien uniquement au niveau des tissus conducteurs. Il est également possible que le marquage au niveau des vaisseaux conducteurs observé après 72 et 96 h à l'obscurité soit en lien avec l'émergence de futures racines adventives.

### IV.3. Rôles des PG dans la production de racines latérales

Le développement racinaire inclut également la production de racines latérales. Nous avons donc étudié ce paramètre chez des plantules de 10 jours de *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3*, ainsi que chez les sur-expressesurs *35S::PG R 2.2* et *35S::PG R 6.5*, en comparaison avec des plantules sauvages. Afin d'évaluer le développement de racines latérales, nous avons mesuré la zone de branchement (zone présentant des racines latérales dès leur émergence), compté



**Figure 72 : Production de racines latérales (longueur de la zone de branchement, densité de racines latérales) par les mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3* chez des plantules de 10 jours. A) Moyenne d'une répétition. La densité de racines latérales est calculée en divisant le nombre de racines latérales par la longueur de la zone de branchement (zone où des racines latérales sont observables). Les valeurs des mutants et des sur-expresses ont été comparées à celles du sauvage *Col-0* à l'aide d'un test de multi-comparaison One way ANOVA (post-test de Dunnett,  $\alpha = 5\%$ ). Les valeurs aberrantes ont été éliminées à l'aide d'un test de Rout ( $Q = 5\%$ ). ns :  $P_v > 0,05$  ; \* :  $P_v \leq 0,05$  ; \*\* :  $P_v \leq 0,01$  ; \*\*\*\* :  $P_v \leq 0,0001$ . B) Plantules de 10 jours.**

le nombre de racines latérales de la racine primaire, et calculé la densité de racines latérales de la zone de branchement.

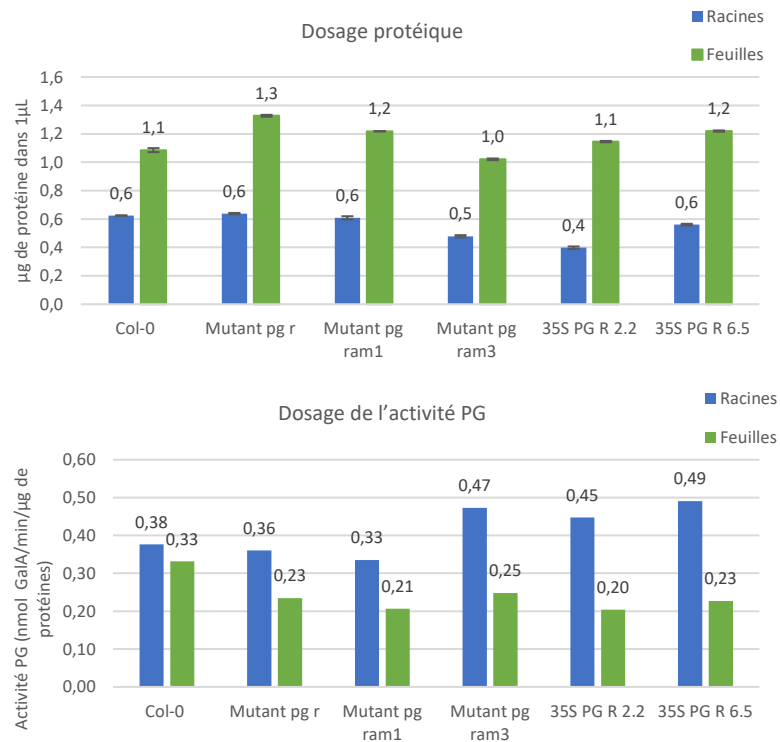
Contrairement à la racine primaire, où seul le sur-expresser 35S::PG R 2.2 présente une augmentation de la longueur racinaire par rapport au sauvage, ce sont ici les deux sur-expresser 35S::PG R qui présentent une augmentation significative de la zone de branchement par rapport au sauvage. Ils possèdent également tous les deux un nombre de racines latérales ainsi qu'une densité de racines latérales plus importante que le sauvage (**figure 72**). En revanche, les mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3* ne présentent aucune différence significative par rapport au sauvage. Encore une fois, les sur-expresser montrent que l'absence de phénotype chez le mutant *pg r* ne signifie pas pour autant que PG R n'a pas de fonction dans le paramètre étudié. On peut donc supposer qu'il en est de même pour les mutants *pg ram1* et *pg ram3*, et que seules des lignées sur-expressives pourraient nous permettre d'appréhender la fonction de PG RAM.

D'après ces résultats, PG R aurait donc une fonction dans le développement de racines latérales, notamment dans leur initiation. Cette activité pourrait être due à plusieurs facteurs, éventuellement combinés : (i) l'action de PG R au niveau de la zone de différenciation, par l'assouplissement des parois des cellules des tissus traversés par les primordia racinaires, ce qui permettrait de créer plus facilement une ouverture sur leur chemin. (ii) l'action de PG R dans cette même zone, afin d'engendrer la dissociation des cellules entre-elles, toujours pour créer une ouverture au primordium (iii) le détachement des cellules de la coiffe latérale à l'apex racinaire grâce à l'action de PG R, puisque le détachement de ces cellules est responsable d'une augmentation ponctuelle de la concentration d'auxine dans la zone de transition (entre la zone de division et la zone d'élongation), et que ce pic d'auxine permet l'initiation d'un nouveau primordium (Möller et al., 2017).

#### IV.4. Activité PG globale *in planta*

Afin de mieux comprendre les modifications qui ont lieu chez les mutants les sur-expresser 35S::PG R, nous avons extrait les protéines totales des feuilles et des racines de plantes sauvages, des mutants et des sur-expresser, puis nous avons quantifié l'activité PG des extraits, après 2 h d'activité à 37°C, à pH 5, en utilisant du PGA comme substrat, à une concentration finale de 0,4 %.

Le dosage des protéines totales extraites indique qu'il y a davantage de protéines extraites en provenance des feuilles que des racines (**figure 73**). Ceci est logique puisque l'extraction protéique extrait des protéines intracellulaires contaminantes, telles que la RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) contenue dans les feuilles, et présente en très forte quantité (Chivasa et al., 2002; Feiz et al., 2006; Watson et al., 2004). Comme l'activité PG est calculée par rapport à la quantité des protéines totales, l'activité PG des racines semble supérieure dans les feuilles par rapport aux racines, alors que ça ne serait pas forcément ce que l'on observerait si l'on calculait l'activité PG à partir de la quantité de PG extraites uniquement.



**Figure 73 : Dosage des protéines extraites de feuilles et de racines de plantes sauvages Col-0, pg r, pg ram1, pg ram3, et des sur-expresseurs 35S::PG R, et dosage de l'activité PG globale. Dosage protéique grâce au réactif de Bradford (B6916 Sigma-Aldrich®, Merck). Activité PG 2 h à 37 °C. Moyenne de la lecture de 3 absorbances. Une répétition.**

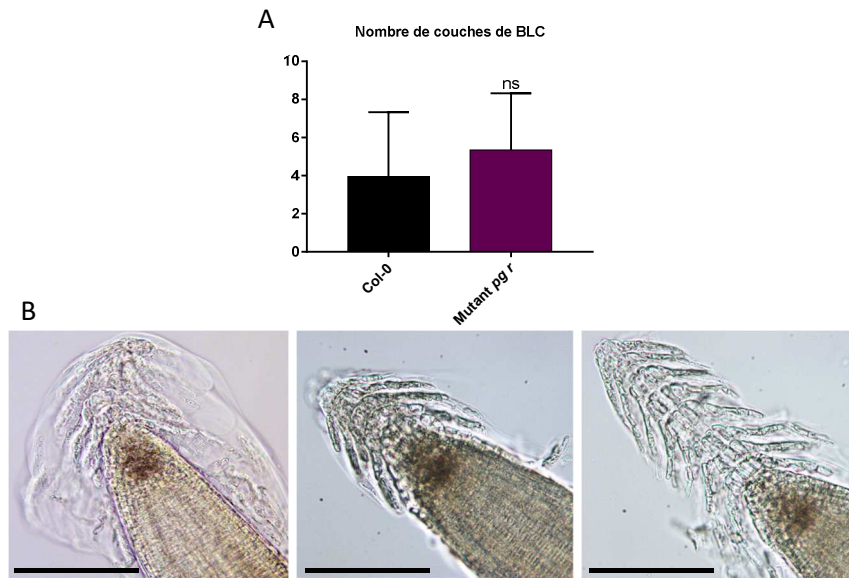


Les résultats ([figure 73](#)) indiquent que l'activité PG est réduite au niveau des feuilles et des racines des mutants *pg r* et *pg ram1*, par rapport au sauvage. Elle est également réduite au niveau des feuilles du mutant *pg ram3*. En revanche, elle est plus importante au niveau de ses racines par rapport au génotype sauvage, ce qui est un résultat inattendu. Étonnamment également, l'activité PG des feuilles des sur-expresses est inférieure à celle du sauvage. Cependant, elle est supérieure au sauvage au niveau des racines, ce qui est cohérent avec les observations faites précédemment.

Les résultats concernant les mutants *pg r* et *pg ram1* sont à première vue logiques, puisqu'une diminution de l'activité PG est cohérente avec les mutations. Cependant, à la vue de l'absence de variation de phénotype entre les mutants et le sauvage, par rapport au développement racinaire, on pourrait s'attendre à ce qu'il n'y ait pas de modifications d'activité PG entre le sauvage et les mutants. Effectivement, cela aurait prouvé que l'activité PG manquante chez les mutants est véritablement compensée par d'autres PG. Cela pourrait signifier pour PG RAM que son activité n'est pas impliquée dans le développement racinaire. En revanche, il serait étonnant que PG R ne soit pas impliquée dans le développement racinaire, dans la mesure où la sur-expression du gène *PG R* modifie clairement le développement racinaire. On peut donc supposer que la diminution de l'activité PG observée chez les mutants *pg r* et *pg ram1* par rapport au sauvage est négligeable. Mais le résultat le plus inattendu est l'augmentation de l'activité PG observée au niveau des racines du mutant *pg ram3*. Elle est en effet plus importante que l'augmentation de l'activité PG observée chez les sur-expresses *35S::PG R*, alors que le mutant *pg ram3* ne présente pas de phénotype dans le développement racinaire, contrairement aux sur-expresses. L'explication la plus vraisemblable est qu'il s'agisse d'une erreur issue de l'expérience en elle-même. Elle serait par conséquent à refaire. Enfin, la diminution de l'activité PG des sur-expresses au niveau des feuilles est également inattendue et inexpliquée. Cela laisserait supposer qu'au niveau des feuilles des sur-expresses, une régulation est éventuellement mise en place pour contrer la sur-expression de *PG R*, par exemple par l'intervention d'ARN interférents. Si cette régulation n'a pas lieu au niveau des racines, c'est peut-être que les bouleversements engendrés dans les feuilles à cause de la sur-expression de *PG R* seraient beaucoup plus importants que ce qui a lieu dans les racines.

#### IV.5. Fonction de PG R dans le détachement des cellules de la coiffe latérale

Pour pouvoir mieux comprendre le rôle de l'expression de *PG R* dans la coiffe latérale, nous avons comparé les couches de cellules bordantes (BC), plus précisément des BLC (border-like cell ; Vicre, 2005), présentes à l'apex racinaire du mutant *pg r* et celles du sauvage. Les BC sont définies comme étant les cellules issues de la coiffe racinaire (columelle et coiffe latérale) qui se détachent de la pointe racinaire, lorsque celle-ci est placée dans de l'eau. En absence d'eau, les BC restent adhérentes à la pointe racinaire. Les BC de la plupart des espèces restent viables même après séparation de l'apex racinaire. Elles ont prouvé leur participation dans la défense des plantes et l'attraction de microorganismes bénéfiques, notamment via la sécrétion d'un mucilage qui contient des polysaccharides, des métabolites secondaires, des protéines antimicrobiennes et de l'ADN extracellulaire. Elles permettent également la



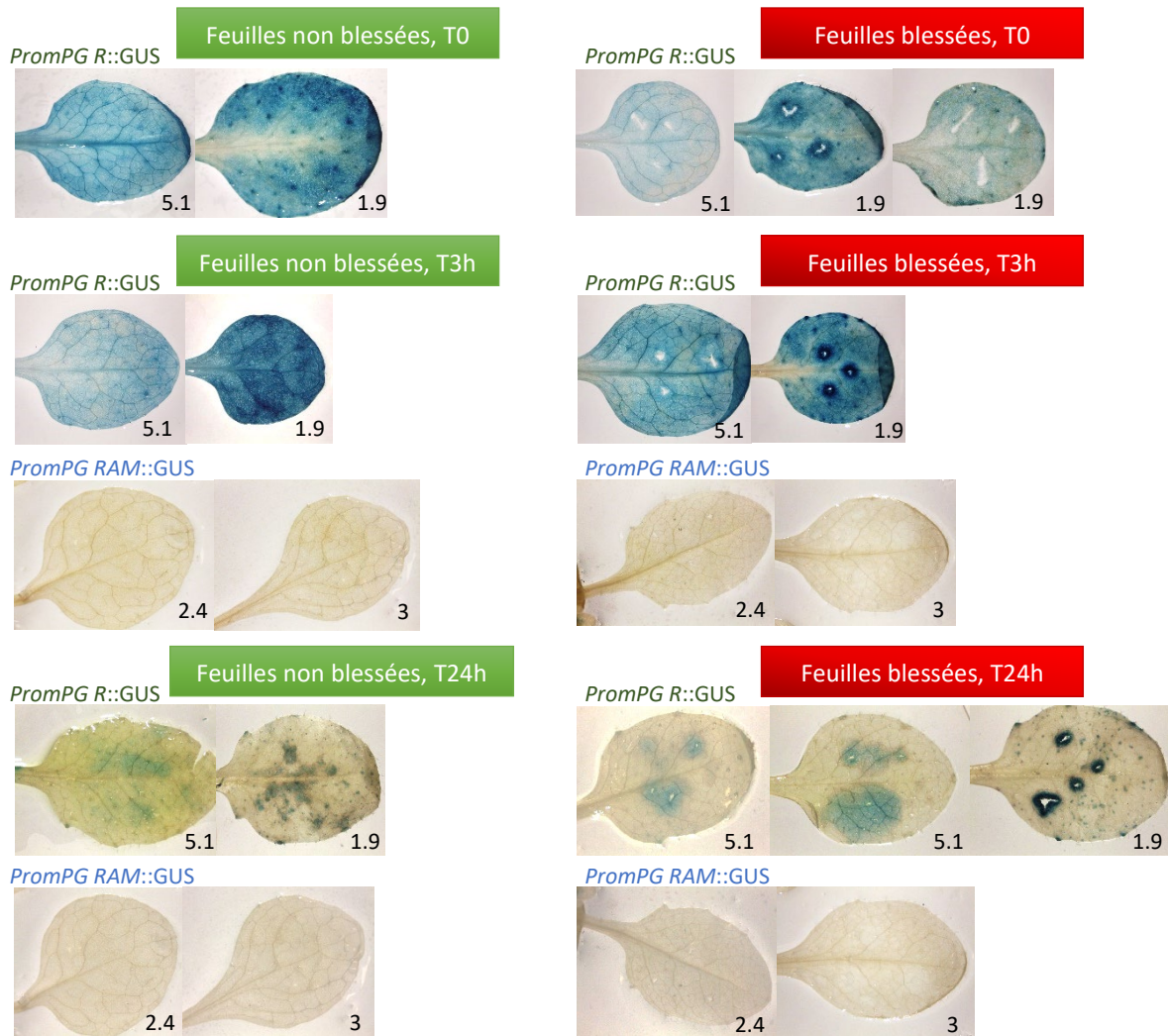
**Figure 74 : Etude des cellules bordantes (BLC) du mutant pg r. A)** Nombre de couches de cellules bordantes observées chez 20 plantes de Col-0 et du mutant pg r. Aucune valeur aberrante n'a été détectée (test de Rout,  $Q = 5\%$ ). Les données ont été comparées entre elles par un test de comparaison de Mann-Whitney ( $\alpha = 5\%$ ,  $n = 20$ ). ns :  $P_v > 0,05$ . **B)** Capuchons présentant un nombre différent de couches de BLC. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ .

protection des racines face aux stress abiotiques (Driouich et al., 2007, 2013; Hawes et al., 2000; Vicre, 2005).

Les BC retrouvées chez *A. thaliana* possèdent la particularité de rester cohésives, au lieu d'être dispersées comme chez les autres espèces. C'est pourquoi elles ont été appelées « border-like cell » (Hawes et al., 2000; Vicre, 2005). Le regroupement de BLC à l'apex racinaire d'*A. thaliana* forme une sorte de « capuchon » composé d'un nombre variable de couches, qui dépend de l'âge de la racine ([figure 74 B](#) ; Driouich et al., 2007). Il a été démontré que l'agrégation typique des BLC d'*A. thaliana* était due à la présence d'HG, grâce aux mutants *quasimodo 1-1* et *2-1*, qui présentent des BLC avec une réduction d'épitopes de JIM5 (spécifique aux HG faiblement méthylestérifiés), ainsi que des BLC non-cohésives (Durand et al., 2009). Par ailleurs, le contrôle de la libération des BC serait en partie due aux phytohormones, notamment l'auxine et l'éthylène. Leur mode d'action n'est pas connu, mais elles contrôlèrent ensemble la différenciation des cellules de la coiffe racinaire et la formation de BC. De plus, le détachement des cellules de la coiffe en BC est due à l'action d'enzymes de dégradation de la paroi, qui solubilisent les parois connectant les cellules entre elles, notamment les HG (Driouich et al., 2007; Hawes and Lin, 1990). Il est donc probable que, si *PG R* est exprimée au niveau de la coiffe latérale, c'est pour permettre la séparation des cellules de la coiffe latérale et la formation de BC. C'est effectivement ce que suggèrent les observations des transformants *promPG R::GUS*, où soit la coiffe latérale est marquée par la coloration GUS, soit ce sont les BLC qui entourent l'apex racinaire ([figure 57](#)). Par ailleurs, l'expression du gène *PG R* est également observée chez certaines BLC chez les transformants *promPG R::GFP-NLS*, mais la plus part des BLC ne présentent pas ce marquage ([figure 58](#)). Cela indiquerait que *PG R* est exprimé afin de permettre le détachement des cellules de la coiffe latérale, et que l'expression du gène cesserait une fois les cellules détachées.

Après l'observation de 20 pointes racinaires du mutant *pg r* et du sauvage, une tendance se dégage. En effet, le mutant *pg r* semble posséder des capuchons composés d'un nombre plus important de couches de BLC par rapport au sauvage. La différence de couches de BLC entre le mutant *pg r* et le sauvage pourrait être le résultat du montage entre lame et lamelle, qui est une opération délicate pour conserver le capuchon de BLC intact. Il est possible que chez le mutant, les BLC soient plus cohésives que chez le sauvage Col-0, expliquant le fait que le capuchon résiste un peu mieux au montage. Cependant, après analyse statistique, cette tendance ne serait pas significativement différente ([figure 74 A](#)).

Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour confirmer la tendance observée. De plus, ces expériences devraient également être réalisées chez les sur-expressesurs *35S::PG R*. Ceux-ci n'étaient pas encore disponibles au moment de l'observation des capuchons de BLC. Par la suite, cette observation n'a pas été réitérée avec les sur-expressesurs, car cette façon de procéder a été jugée peu fiable pour en déduire un phénotype.



**Figure 75 : Activité des promoteurs des gènes PG R et PG RAM après une blessure abiotique.** Les lignées qui ont été utilisées sont indiquées en bas à droite de chaque image. La lignée *promPG RAM::GUS 3* étant une lignée hétérozygote, les plantes ont été sélectionnées sur milieu sélectif. T0 : le test GUS a été réalisé immédiatement après les blessures. T3h et T24h: le test GUS a été réalisé respectivement 3 h et 24 h après les blessures.

## IV.6. Expression des PG en réponse à une blessure abiotique

Afin d'élargir nos pistes dans le rôle potentiel de PG R et de PG RAM au sein de la plante, nous avons voulu savoir si ces PG avaient un rôle dans la défense des plantes, suite à une blessure abiotique. En effet, d'après l'Arabidopsis EFP browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), le gène *PG RAM* semble être sur-exprimé suite à des blessures ([annexe 16](#)). C'est pourquoi nous avons utilisé les transformants *prom natif PG::GUS* sur lesquels nous avons induit des blessures avec la pointe d'une aiguille de seringue, en conditions stériles. Des tests GUS ont été réalisés à T0 (juste après les blessures), à T3h et à T24h, respectivement 3 h et 24 h après blessure. Ces feuilles ont été comparées à des feuilles non blessées.

Les résultats sont présentés dans la [figure 75](#). Les feuilles des transformants de la lignée *promPG R::GUS 1.9* présentent un halo bleu foncé autour de leurs blessures, 3 h et 24 h après la formation de ces dernières. Ces halos bleus ne sont pas présents sur des feuilles non blessées. Les feuilles de la lignée *promPG R::GUS 5.1* présentent également des halos bleus, moins soutenus que l'autre lignée, 24 h après les blessures. Le fait que les feuilles des deux lignées présentent un marquage autour de leurs blessures, 24 h après leur réalisation, est assez intéressant. L'expression de *PG R* autour des blessures pourrait signifier qu'un signal, tel que la présence d'OG, résultant des blessures, induirait l'expression de *PG R*. Il est également possible que *PG R* soit produite afin d'amplifier le signal d'OG, menant à la stimulation des défenses des plantes, pour empêcher l'entrée de pathogènes par les blessures. En effet, il est peu probable que *PG R* soit exprimée afin de repousser elle-même un éventuel pathogène, puisque les pathogènes des plantes ne possèdent pas de paroi contenant des HG.

Cependant, sur certaines feuilles de la lignée 1.9, mais pas toutes, l'activation du promoteur *PG R* est également observable autour des blessures lorsque le test GUS est réalisé immédiatement après les blessures (T0). Le marquage est cependant moins intense que 3 h ou 24 h après les blessures. Il se pourrait donc que l'expression ait lieu de façon tellement précoce après la blessure qu'elle ait le temps de se produire avant que la feuille ne soit plongée dans le tampon GUS. Il est aussi possible que ce marquage ne soit pas spécifique, et que le gène *PG R* ne soit pas vraiment exprimé suite à une blessure abiotique.

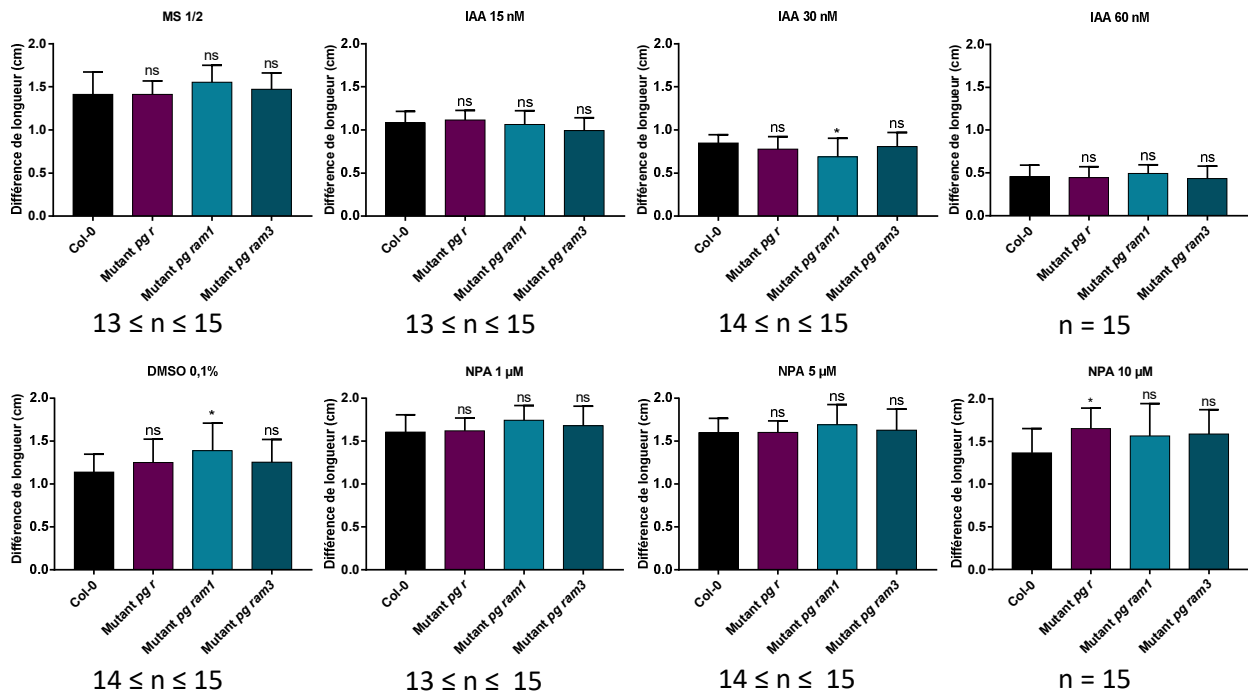
Pour *PG RAM*, aucun marquage n'est observable au niveau des feuilles des deux lignées *promPG RAM::GUS*, que ce soit avec ou sans blessure, et que ce soit à T0, 3 h ou 24 h après la blessure ([figure 75](#)). L'expression du gène *PG RAM* n'est donc pas induite suite à une blessure abiotique.

## IV.7. Contrôle de l'expression des gènes *PG R* et *PG RAM*

### IV.7.1. Contrôle par la voie de l'auxine

#### IV.7.1.a. Transfert des mutants sur auxine ou NPA

Le développement racinaire étant hautement régulé par de l'auxine, nous avons voulu savoir si l'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* était dépendante de cette voie. En effet, le



**Figure 76 : Croissance des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3 sur auxine (IAA) ou NPA.** Les plantules ont été cultivées 4 jours sur MS ½ classique, puis elles ont été transférées (à T0) sur milieux supplémentés en auxine (IAA) ou en NPA à différentes concentrations. Le milieu DMSO 0,1 % (v/v) correspond au témoin du milieu NPA 10 μM. Après 3 jours de croissance sur les milieux spécifiques (T3), la différence de longueur des racines T3-T0 a été calculée. Ces résultats correspondent aux moyennes d'une répétition. Les valeurs des mutants ont été comparées à celles du sauvage Col-0 à l'aide d'un test de multi-comparaison One way ANOVA (post-test de Dunnett,  $\alpha = 5\%$ ). Les valeurs aberrantes ont été éliminées à l'aide d'un test de Rout ( $Q = 5\%$ ). ns :  $P_v > 0,05$  ; \* :  $P_v \leq 0,05$ .

gradient de concentration d'auxine observé à l'apex racinaire est comparable à celui de l'expression de *PG RAM*, et serait plutôt l'inverse de celui de *PG R* ([figure 27](#) de l'introduction, chapitre III). L'auxine pourrait ainsi être responsable de l'activation de l'expression de *PG RAM*, et de la répression de *PG R*. Par conséquent, sur un milieu contenant de l'auxine, la zone d'expression de *PG RAM* pourrait être plus étendue qu'à la normale chez le sauvage, et celle de *PG R* moins étendue. On peut donc supposer que les plantules de mutants *pg ram* cultivées sur un milieu supplémenté en auxine présenteraient des racines plus petites que celles du sauvage Col-0, alors que celles du mutant *pg r* ne seraient pas différentes du sauvage. Sur milieu contenant du NPA (1-N-Naphthylphthalamic acid), un inhibiteur du transport polarisé de l'auxine, les tendances devraient être inversées. Ainsi, le mutant *pg r* présenterait des racines plus petites que le sauvage, tandis que celles des mutants *pg ram* ne seraient pas significativement différentes.

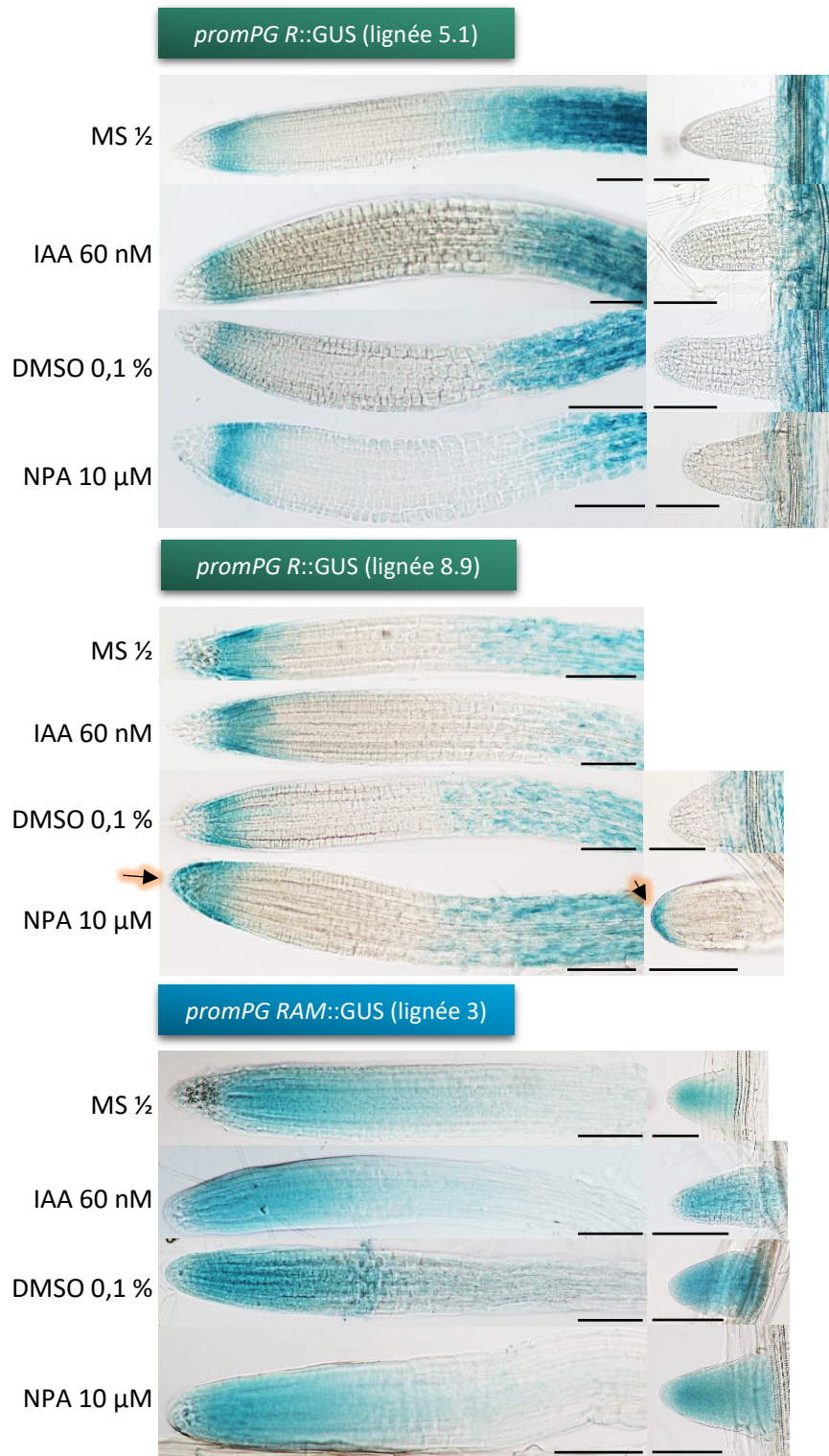
Nous avons donc cultivé des plantules des mutants *pg r*, *pg ram1* et *pg ram3* et de sauvage Col-0 pendant 4 jours sur milieu de culture MS ½ en jours longs. Puis nous les avons transférées sur des milieux supplémentés en auxine (IAA : indole-3-acetic acid) à différentes concentrations, ainsi que sur milieux contenant du NPA, à différentes concentrations également.

Les résultats de la [figure 76](#) montrent cependant que, quelles que soient les concentrations d'IAA et de NPA utilisées, aucune différence significative n'est observée entre la croissance de la racine primaire du sauvage et celles des mutants. Comme l'ont prouvé les derniers résultats, l'absence de variation de phénotype entre les mutants et le sauvage n'indique pas forcément que les gènes *PG R* et *PG RAM* ne sont pas régulés par l'auxine. Il peut encore une fois s'agir d'une compensation génétique.

#### IV.7.1.b. Localisation de l'expression des gènes sur auxine ou NPA

Afin de contourner les compensations génétiques potentiellement observées chez les mutants, nous avons placé des transformants *promR::GUS* et *promRAM::GUS* de 8 jours sur des milieux comprenant de l'auxine et du NPA. Après 3 jours de culture sur ces milieux spécifiques, nous avons révélé la localisation de l'expression des gènes par un test GUS.

Les racines des transformants *promR::GUS* 8.9 transférés sur auxine (IAA 60 nM), MS ½ et sur DMSO 0,1 % (la condition témoin du NPA 10 µM) ne présentent pas de différence d'expression du gène rapporteur *GUS*. Le marquage est présent à la coiffe latérale et au niveau de la zone d'élongation. Il est absent au niveau de la columelle et de la zone de division. En revanche, les pointes racinaires des transformants *promR::GUS* 8.9 transférés sur NPA (10 µM) présentent un marquage au niveau de la columelle, observé dès le développement des jeunes racines latérales ([figure 77](#)). L'apparition d'un tel marquage signifie que la répression du gène *PG R* au niveau de la columelle serait dû au transport de l'auxine. Le fait que ce soit la columelle qui présente une variation de marquage sur NPA n'est pas surprenant. Sabatini et al. (1999) ont effectivement montré grâce à des transformants *DR5::GUS* que l'auxine induisait l'activation de gènes au niveau de la columelle, et que cette activation n'avait pas lieu chez les plantules cultivées sur NPA ([annexe 17](#)). Le promoteur *DR5* est un promoteur synthétique



**Figure 77 : Activité des promoteurs des gènes PG R et PG RAM (gènes rapporteurs GUS) au niveau de l'apex racinaire de plantes cultivées sur auxine (IAA) ou sur NPA.** Les plantes ont été cultivées 8 jours sur milieu MS ½, puis ont été transférées sur des milieux supplémentés en auxine (IAA 60 nM), en NPA (10 μM, DMSO 0,1 %), ou sur milieux témoins (MS ½ pour l'auxine et DMSO 0,1 % pour le NPA). Puis elles ont été cultivées pendant 3 jours avant la coloration GUS. Flèche noir entouré d'orange : expression du gène PG R au niveau de la columelle. Barres d'échelle : 100 μm.



comportant la répétition en tandem de la séquence TGTCTC, retrouvée chez beaucoup de promoteurs de gènes de réponse à l'auxine, car cette séquence est la cible des ARF (auxin response factor). Les ARF sont des facteurs de transcription qui induisent la transcription des gènes de réponse à l'auxine, en présence d'auxine.

En revanche, de façon surprenante, l'apparition d'un marquage GUS au niveau de la columelle sur NPA n'est présent que chez les transformants *promR::GUS* 8.9. Deux autres transformants *promR::GUS* ont été étudiés, et chez eux, aucune différence n'est observée entre les plantes transférées sur auxine, NPA, ou sur les milieux témoins ([figure 77](#)). Ainsi, il est donc peu probable que la régulation négative du gène *PG R* au niveau de la columelle soit bien réalisée par l'auxine.

Pour l'expression du gène *PG RAM*, deux lignées *promRAM::GUS* ont été observées, et chez ces deux lignées, quel que soit le milieu sur lequel les plantules ont été transférées, le marquage GUS ne présente pas de différence ([figure 77](#)).

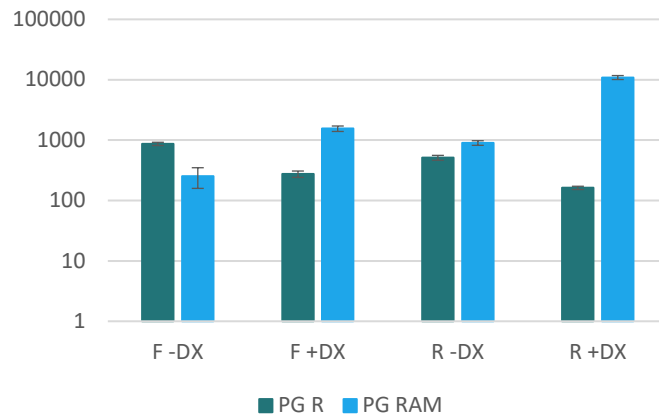
Ces observations nous permettent de conclure que l'expression des gènes *PG RAM* et *PG R* est vraisemblablement indépendante de la voie de l'auxine.

#### IV.7.2. Contrôle de l'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* par les facteurs de transcription PLETHORA

Les facteurs de transcription PLETHORA (PLT) sont des facteurs de transcription clés dans la régulation de la zone méristématique et de l'élongation cellulaire, au cours de la croissance racinaire. Ils interviennent notamment dans le maintien des divisions cellulaires du RAM, et préviennent la différenciation cellulaire de ces mêmes cellules. Cette régulation se fait grâce à l'activation d'un groupe de gènes au niveau du RAM afin de promouvoir la division cellulaire, et grâce à la répression d'autres gènes dans cette même zone. Les gènes réprimés par les facteurs de transcription PLT au niveau du RAM ont un niveau d'expression maximal en dehors du gradient de PLT, dans les zones d'élongation et de différenciation (Santuari et al., 2016).

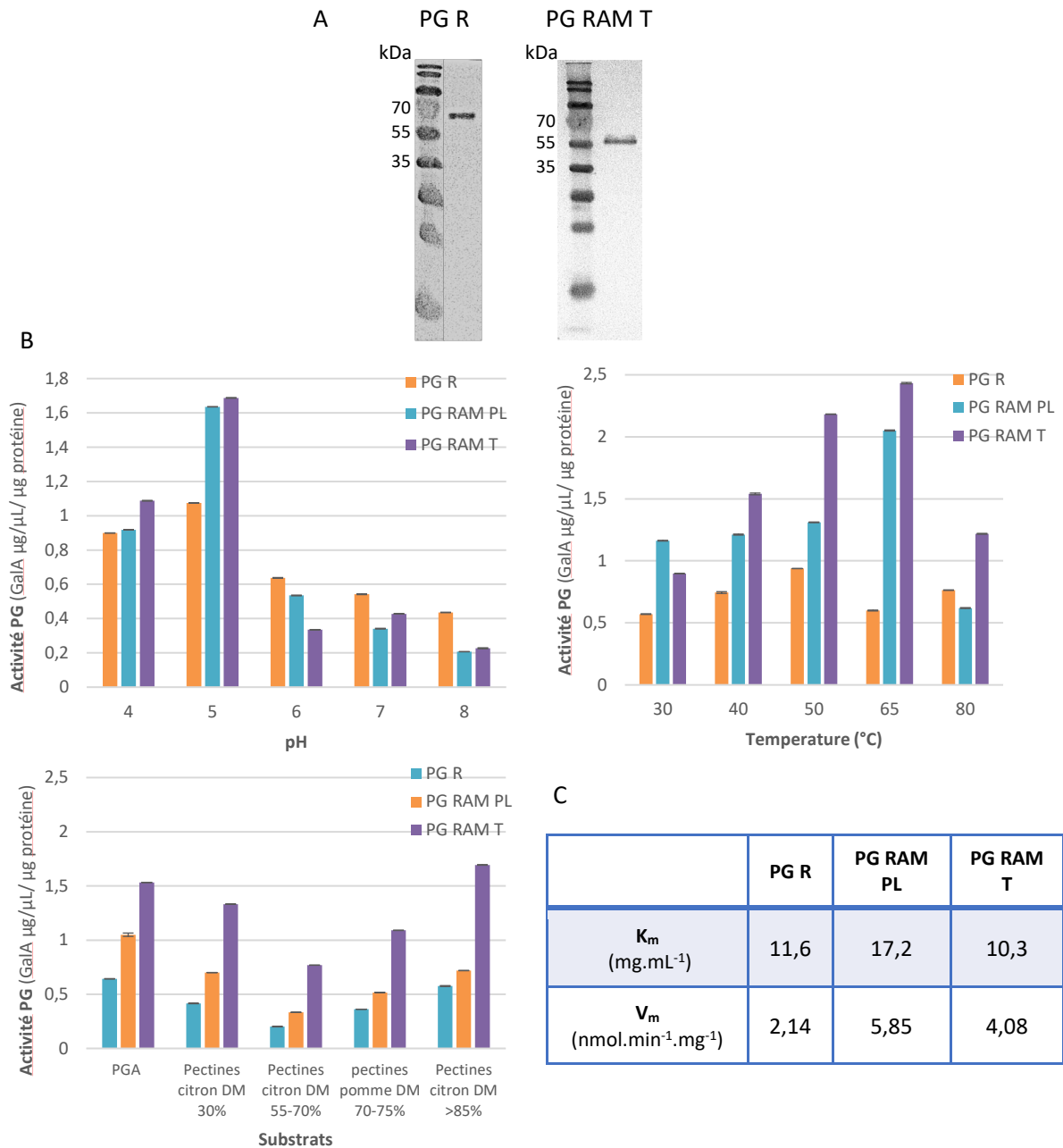
Le gradient que forment les facteurs de transcription PLT, avec un niveau maximal autour du centre quiescent, est similaire au gradient d'expression du gène *PG RAM*, et est l'opposé de celui du gène *PG R*. On peut donc émettre l'hypothèse que le gène *PG RAM* fait partie des gènes dont l'expression est induite par les facteurs PLT, et *PG R* appartient à l'ensemble des gènes réprimés par ces mêmes facteurs. C'est en effet ce qu'observe Santuari et al. (2016 ; données supplémentaires 1), après une analyse transcriptomique globale par microarray.

Pour confirmer les résultats de Santuari et al. (2016), nous nous sommes procuré le double mutant *plt1 plt2* exprimant la construction *35S::PLT2-GR*. La protéine de fusion PLT2-GR est initialement séquestrée dans le cytoplasme. En cas de fixation de la dexaméthasone sur le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), l'ensemble PLT2-GR est relocalisé dans le noyau, ce qui permet d'induire l'expression des gènes cibles de PLT2. Nous avons donc quantifié les niveaux d'expression de *PG RAM* et *PG R* de ce mutant *plt1 plt2* transformé par la construction *35S::PLT2-GR*, avec ou sans induction par la dexaméthasone.



**Figure 78 : Expression des gènes PG R et PG RAM chez le mutant *plt1 plt2*, transformé par la construction 35S::PLT-GR, avec ou sans induction par la dexaméthasone.** Des plantules de 5 jours ont été transférées sur milieu supplémenté en dexaméthasone, pendant 6 h (+DX), et d'autres sur milieu MS ½ sans dexaméthasone (-DX). F : feuilles. R : racines. Sondes TaqMan (Thermo Fisher scientific). Gène de référence : TIP41.

Les résultats de RT-qPCR en temps réel en TaqMan (Thermo Fisher scientific) montrent qu'aussi bien au niveau des feuilles que des racines, la relocalisation du facteur de transcription PLT2 dans le noyau permet l'augmentation de l'expression du gène *PG RAM* par rapport à la condition sans dexaméthasone, et induit la répression du gène *PG R* (**figure 78**). L'expression de ces deux gènes est donc bien contrôlée (tout du moins en partie) par au moins un des facteurs de transcription PLT. Le fait que l'expression du gène *PG RAM* soit augmentée par la voie PLT indiquerait que cette PG possède un rôle dans le fonctionnement du méristème. Quant à l'expression du gène *PG R*, sa répression par PLT2 est cohérent avec le fait que cette PG n'intervient probablement pas dans le fonctionnement du méristème, à la vue de son patron d'expression.



**Figure 79 : Expression des protéines PG R, PG RAM PL et PG RAM T en système hétérologue, et caractérisation in vitro. A) Western blot de protéines purifiées. Ac anti His. Révélation grâce au kit Pierce™ DAB Substrate (Thermo Fisher scientific). B) Activité PG (exprimée en  $\mu g$  de GalA libéré par  $\mu L$  et par  $\mu g$  de protéine) avec différents pH, températures et substrats. Conditions de base : activité 1 h à 37 °C à pH 5, avec comme substrat du PGA 0,4 % final. C)  $K_m$  et  $V_m$  des 3 PG. Activité 1 h à 37 °C, avec 2 à 24  $mg.mL^{-1}$  de PGA comme substrat.**

## Chapitre V : Etude de l'activité enzymatique des PG *in vitro*

### V.1. Production des PG en système hétérologue

Le vecteur pPICZ $\alpha$  et la levure *P. pastoris* ont été choisis pour produire les protéines PG d'intérêt en système hétérologue, car ce système possède une multitude d'avantages. Les levures *P. pastoris* permettent de produire une biomasse plus importante que *S. cerevisiae* (d'après le fournisseur du vecteur pPICZ $\alpha$ , Thermo Fisher scientific), et ainsi, produisent un niveau élevé de protéines recombinantes. Il est possible que plusieurs vecteurs s'implantent dans le génome d'une seule levure, ce qui permet également d'augmenter la production de protéines. Par ailleurs, le milieu de culture utilisé ne nécessite pas de facteurs de croissance ou de suppléments coûteux. En ce qui concerne le vecteur utilisé, pPICZ $\alpha$ , il possède un promoteur AOX1 inductible au méthanol, ce qui permet de contrôler la production des protéines. Il permet également de sécréter les protéines dans le milieu grâce à un peptide signal de sécrétion, ce qui facilite la purification des protéines. De plus, la fusion des protéines à une étiquette histidine permet de les purifier sur une colonne de nickel et de les détecter en western blot *via* des anticorps anti-6xhistidine. Les protéines de fusion peuvent également être détectées grâce à leur épitope c-myc. La transformation des levures par ce vecteur, ainsi que la sélection des clones sur Zéocine™ sont aisées. Enfin, la production en système eucaryote permet d'obtenir des protéines glycosylées (N- et O-glycosylation). Cette dernière caractéristique est importante pour le repliement, la localisation, la stabilité et la fonction de certaines protéines (Helenius and Aebi, 2001; Sanders et al., 1999).

Trois constructions ont ainsi été réalisées afin de produire les protéines PG R, PG RAM pleine longueur (PL), et PG RAM tronquée (T, dépourvue du signal putatif d'accrochage de l'ancre GPI) dans ce système d'expression hétérologue. Des protéines présentant une ancre GPI étant retrouvées chez les levures (Komath et al., 2018), la version pleine longueur devrait pouvoir être produite.

L'immunodétection de ces protéines est présentée en [figure 79 A](#). Pour PG RAM PL, aucune bande n'est visualisée, malgré la détection d'une activité PG des protéines purifiées. Ce n'est pas la première fois au sein du laboratoire qu'une activité enzymatique est détectée sans que la protéine ne soit pas visible par western blot. Nous supposons que les épitopes de détection ont été dégradés au cours de la production de ces protéines. Puisqu'une activité est observée, il est peu probable que l'ancre GPI retienne les PG au niveau de la membrane des levures, et qu'elle soit responsable de l'absence de détection de la protéine par western blot.

Les westerns blots indiquent que la taille de PG R est située entre 55 et 70 KDa, et PG RAM T environ 60 KDa. Ces tailles sont au-dessus de ce qui est indiqué sur le site TAIR (<https://www.arabidopsis.org> ; 48 KDa pour PG R et 49 KDa pour PG RAM). Ceci pourrait s'expliquer par la présence de 4 sites prédits de N-glycosylation sur PG R (NetNGlyc 1.0 Server ; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), et 1 site prédit sur PG RAM (voir les emplacements en [annexe 18](#)). Des sites de O-glycosylation semblent également présents chez les deux PG (NetOGlyc 4.0 Server ; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), mais comme



plusieurs recherches consécutives sur le logiciel NetOGlyc 4.0 Server avec exactement la même séquence génère des prédictions différentes sur le nombre de sites O-glycosylés, cette information ne semble pas fiable. Enfin, en ce qui concerne PG RAM, la protéine détectée correspond à la version sans ancre GPI, ce qui peut également expliquer la différence entre la taille de la protéine prédite par le site TAIR et la taille observée après immunodétection. Par ailleurs, la présence de N- et de O-glycosylations potentielles est une information importante, puisque ces modifications structurales seraient impliquées dans la sécrétion de protéines et dans la stabilisation des protéines membranaires (Helenius and Aebi, 2001; Sanders et al., 1999).

## V.2. Caractérisation de l'activité PG *in vitro*

La production et la purification des PG *in vitro* a permis de réaliser des tests d'activité PG dans différentes conditions, afin de trouver la température, le pH et le substrat préférentiel des PG, et également de calculer leur Vitesse maximale ( $V_m$ ) et leur Constante de Michaelis ( $K_m$ ). L'activité PG est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'acides galacturoniques (GalA) libérés par  $\mu\text{L}$  et par  $\mu\text{g}$  de protéines.

L'ensemble des résultats du paragraphe V.2. ont été obtenus par Ousmane Dia lors de son stage de Master 2, supervisé par Corinne Pau.

### V.2.1. pH optimal

La première constatation que l'on peut faire à la vue des tests d'activités PG est que la forme pleine longueur ainsi que la forme tronquée de PG RAM présentent une activité PG (**figure 79 B**). La forme tronquée semble même faire preuve d'une activité PG supérieure à la forme pleine longueur. Ceci démontre que la séquence absente dans PG RAM T n'est pas nécessaire à son activité. Cela ne prouve pas que ce soit un signal ancre GPI, mais cela montre tout de même qu'elle ne fait pas partie du site actif de l'enzyme, et qu'elle n'est pas nécessaire à la fixation de l'enzyme sur son substrat.

Sans surprise, les PG R, PG RAM PL et PG RAM T présentent une activité maximale à pH 5, et une bonne activité à pH 4. En effet, il est connu que les PG sont plus actives à pH acide (Senechal and Wattier et al., 2014). Les 3 PG présentent une très faible activité à partir de pH 6.

### V.2.2. Température optimale

Les résultats montrent que PG RAM PL et PG RAM T ont une activité maximale à 65°C, et PG R à 50°C (**figure 79 B**). On note cependant que PG R possède globalement une faible activité, qui ne dépasse pas  $1\mu\text{g}$  GalA/ $\mu\text{L}/\mu\text{g}$  de protéine. Il peut être étonnant que des températures aussi élevées soient les températures optimales d'enzymes de plantes, cependant, la littérature répertorie des températures optimales comprises entre 35 et 50°C (Gummadi and Panda, 2003; Niture and Pant, 2004; Yang et al., 2016). La température optimale de PG R est cependant assez élevée par rapport à ce qui est couramment observé.





### V.2.3. Substrat préférentiel

Les résultats des tests d'activités PG avec différents substrats sont assez surprenants (**figure 79 B**). En effet, les PG présentent habituellement une activité maximale avec le polygalacturonate (PGA) comme substrat. De plus, plus les pectines sont méthylestérifiées, moins les PG sont actives. Or les 3 PG étudiées ne répondent pas à ce schéma. PG R et PG RAM PL ont bien une activité maximale avec le PGA, et une activité décroissante avec des pectines de citrons méthylées à 30 % (DM 30), mais la diminution de l'activité entre ces deux substrats est assez faible en comparaison avec ce que l'on observe couramment au sein du laboratoire. L'activité des PG R et PG RAM PL diminue encore avec des pectines de citron avec un DM compris entre 55 et 70 %. En revanche, leur activité augmente à nouveau avec des pectines de pomme dont le DM se situe entre 70 et 75 %, et des pectines de citron avec un DM supérieur à 85 %. PG RAM T présente un profil similaire, à l'exception qu'elle ne présente pas une activité maximale avec le PGA, mais avec des pectines de citron avec un DM supérieur à 85 %.

Les activités PG globales de PG R et de PG RAM PL étant assez faibles, on pourrait supposer que ces résultats peu courants sont dus à un « manque de résolution ». Cependant, l'activité de PG RAM T est relativement importante, donc il est peu probable que ce soit le cas.

### V.2.4. Détermination du $K_m$ et de la $V_m$

La constante de Michaelis ( $K_m$ ) est une caractéristique de chaque enzyme. Elle correspond à la valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale  $V_m$ . Plus le  $K_m$  est élevé, plus la concentration de substrat nécessaire à une activité importante de l'enzyme est élevée. C'est généralement ce que l'on observe chez les enzymes avec une faible affinité pour leur substrat. Les enzymes avec un  $K_m$  élevé possèdent fréquemment une concentration élevée de leur substrat dans leur environnement, ou ont un large spectre de substrats. A l'inverse, des enzymes avec un  $K_m$  faible possèdent une affinité importante pour leur substrat.

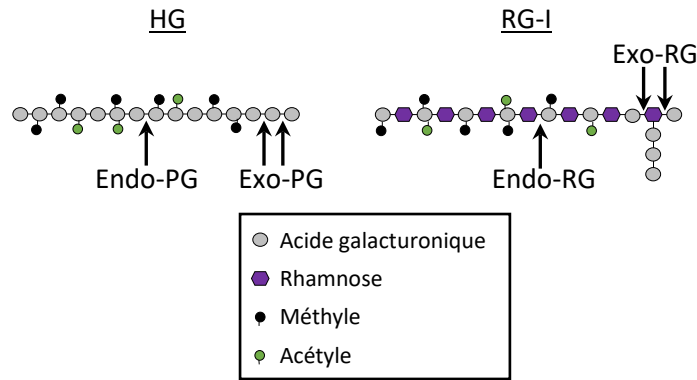
Le  $K_m$  de PG et endo-PG de différents organismes est compris entre 0,110 mg.mL<sup>-1</sup> et 5 mg.mL<sup>-1</sup> (Contreras Esquivel and Voget, 2004; Gummadi and Panda, 2003; Jacob et al., 2008; Niture and Pant, 2004; Yang et al., 2016). Par conséquent, le  $K_m$  de PG R, PG RAM PL et PG RAM T est très élevé, puisqu'elles ont respectivement un  $K_m$  de 11,6 ; 17,2 et 10,3 mg.mL<sup>-1</sup> (**figure 79 C**). Elles auraient donc très peu d'affinité pour le substrat PGA. Si l'on en croit ces résultats, PG RAM T est celle qui possède une meilleure affinité pour le PGA, puis PG R, et en dernier PG RAM PL. On pourrait alors supposer que la séquence absente dans PG RAM T par rapport à PG RAM PL est gênante pour l'activité de la PG. Cependant, le fait que les  $K_m$  observés dépassent autant ceux observés dans la littérature nous fait douter de ces résultats, qui n'ont été réalisés qu'une seule fois.

Les  $V_m$  de PG de différents organismes observées dans la littérature sont comprises entre 0,013 et 2,526 nmol/min/μg de protéines (Contreras Esquivel and Voget, 2004; Niture and Pant, 2004; Yang et al., 2016). Les  $V_m$  des PG R, PG RAM PL et PG RAM T sont respectivement

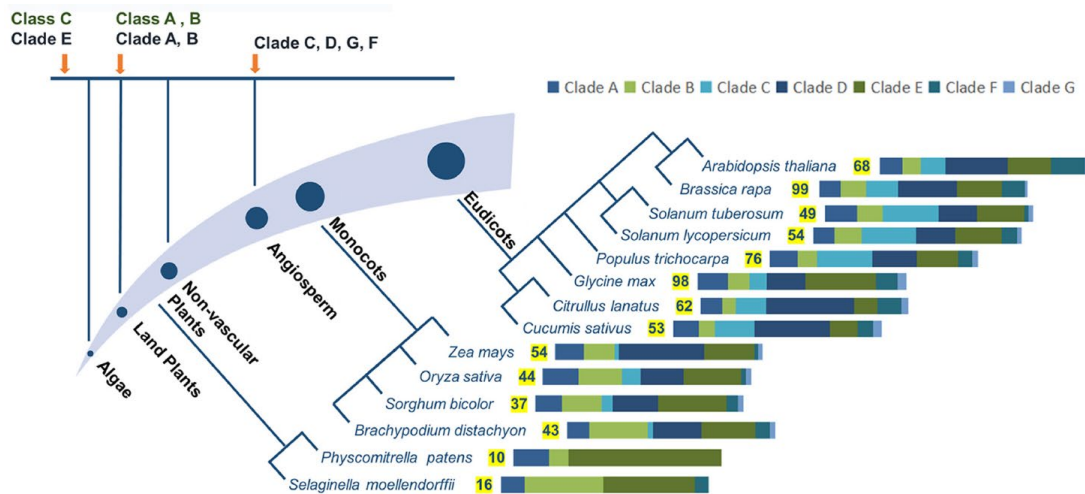


de 2,14 ; 5,85 et 4,08 nmol/min/ $\mu$ g de protéines ([figure 79 C](#)). Les vitesses maximales d'activité de ces PG sont donc assez élevées. PG RAM PL est donc celle qui possède la vitesse maximale la plus élevée, puis vient PG RAM T, et en dernier PG R.

A la vue de l'ensemble de ces résultats, PG R et PG RAM possèdent donc un pH et une température optimale qui correspondent bien à ce que l'on observe chez les PG, en revanche, les spécificités de substrats sont très atypiques. Ces résultats seraient à confirmer. Par ailleurs, le fait que PG RAM T soit active et possède une meilleure affinité pour le PGA que PG RAM PL, suggère que la séquence retirée chez PG RAM T n'est pas nécessaire à l'activité, à l'affinité, et à la fixation de l'enzyme sur son substrat. Ce n'est pas la preuve qu'il s'agisse d'un signal ancre GPI, mais ça ne prouve pas le contraire.



**Figure 80 : Mode d'action des différentes PG : Endo-, Exo- et rhamno-PG (comportant les endo- et les exo-RG). Schéma d'après Yang et al. (2018).**



**Figure 81 : Analyse de l'évolution des gènes PG, nombre de PG chez différentes espèces végétales, et proportion des différents clades pour chaque espèce. Les différents clades auraient émergés à différents moments de l'évolution, représentés par des flèches orange. Les familles de PG sont représentées en proportions différentes suivant les clades. Les barres de couleurs représentent la proportion des clades pour chaque espèce. D'après Yang et al. (2018).**

# Discussion et conclusion

## ➤ *Les PG, vaste famille multigénique*

Les polygalacturonases constituent une large famille multigénique dont la fonction spécifique de chaque membre est encore largement inconnue, y compris chez *A. thaliana*. L'analyse de l'ensemble des PG révèle cependant l'existence de différents types de PG : les exo-, les endo- et les rhamno-PG (spécifiques du RG-I). Les rhamno-PG sont elles-mêmes distinguées en endo- et exo-RG ([figure 80](#) ; Park et al., 2010; Yang et al., 2018). Les endo-PG produisent également des OG avec différents degrés de polymérisation, suivant l'endroit où elles se fixent sur leur substrat. Par ailleurs, les PG seraient réparties en différents clades. Suivant les auteurs qui ont étudié les PG, et les espèces végétales étudiées, le nombre de clades varie de 3 à 7 ([figure 81](#)). Ces clades seraient le reflet de l'évolution des PG à travers le temps. Les différents types de PG ne seraient effectivement pas tous apparus en même temps ([figure 81](#) ; Park et al., 2010; Yang et al., 2018). Ainsi, les rhamno-PG seraient observées chez les algues et les plantes, les endo-PG chez les plantes terrestres, en enfin les exo-PG seraient apparues chez les Angiospermes (Park et al., 2010).

Les patrons d'expression des *PG* seraient conservés au sein d'un même clade, mais ceux-ci seraient diversifiés d'un clade à un autre. Ces clades révèlent ainsi un ensemble de fonctions différentes entre les PG. Les *PG* des clades A et B seraient exprimées dans les fruits ainsi que dans les zones d'abscission et de déhiscence. Celles du clade C seraient exprimées dans les fleurs. Enfin, le patron d'expression des *PG* du clade D serait situé au niveau des inflorescences, et de façon ubiquitaire pour le clade E. Cependant, certains membres des clades C et F seraient également exprimés durant le développement des racines et des graines. L'ensemble de ces patrons d'expression révèle que les PG possèdent des rôles décisifs dans de multiples processus développementaux (Yang et al., 2018). On peut également supposer que chaque enzyme possède ses propres caractéristiques (spécificité de pH, température, vitesse d'activité, substrat et degré d'affinité de substrat).

Par ailleurs, le nombre important de PG pourrait également provenir d'évènements de duplication des gènes, tel que la duplication du génome entier (WDG : whole genome duplication) et de la duplication en tandem (TD : tandem duplication). Les paires de gènes présenteraient une très forte similarité de séquence, mais des patterns d'expression différents (Gu et al., 2016; Mbéguié-A-Mbéguié et al., 2009). Il est également possible que toutes les PG produites ne soient pas actives, mais sous forme de précurseurs enzymatiques, qui nécessitent une modification (comme une phosphorylation) pour être activés. Enfin, il est envisageable que tous les gènes PG ne soient pas exprimés. Les 67 gènes PG d'*A. thaliana* étant issus de l'évolution des PG à travers le temps, l'expression de certains gènes pourrait avoir été remplacée par d'autres. Selon cette hypothèse, les séquences des gènes anciennement utilisées ont été conservées dans le génome de la plante, car leur présence ne porte pas préjudice au développement de la plante.



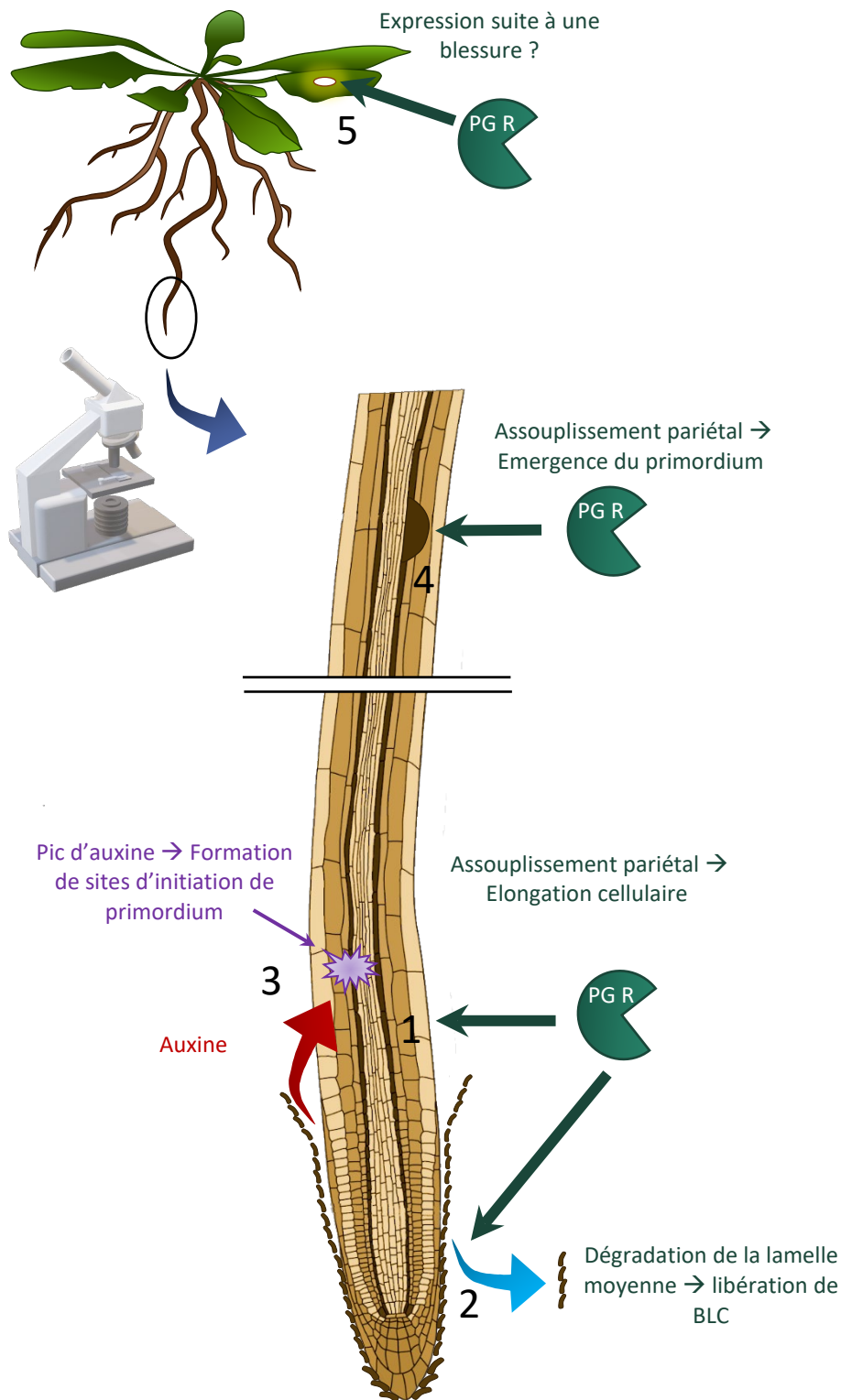
En outre, les différences de patron d'expression des gènes codant des PG impliquent une différence de régulation de l'expression. L'expression des PG serait régulée par des hormones, comme dans le cas de la maturation des fruits et de leur abscission (Hobson, 1965; Morre, 1968), des facteurs de transcription et des facteurs environnementaux, parfois de façon combinée (Yang et al., 2018). L'activité des PG en elle-même est également régulée par des facteurs externes, d'autres protéines, le microenvironnement apoplastique (pH, température, pression, présence de cations), les hormones, les expansines et les polyamines exogènes (Yang et al., 2018).

➤ *Les PG impliquées dans divers processus du développement*

La famille des polygalacturonases est principalement connue pour intervenir lors de processus nécessitant la séparation cellulaire, notamment la maturation des fruits et l'abscission de certains organes tels que les feuilles, suite à une production d'éthylène. Les PG sont en effet responsables de la dégradation des HG de la lamelle moyenne, qui permettent l'adhésion cellulaire (Daher and Braybrook, 2015; Hobson, 1965; Morre, 1968). De récentes découvertes ont mis en évidence un nouveau rôle des PG, à savoir leur implication dans l'expansion cellulaire. En effet, la sur-expression de trois gènes *PGX1-3*, entraîne différents phénotypes d'allongement suivant la PG, comme par exemple celui des cellules végétales des hypocotyles étiolés, des rosettes, ou l'allongement des pores des stomates. En revanche, ils ne présentent pas de phénotypes d'abscission ou de déhiscence prématurées (Rui et al., 2017; Xiao et al., 2014, 2017). Par ailleurs, *PGX2* est la première PG pour laquelle un rôle dans la lignification de la tige a pu être démontré (Xiao et al., 2017). Enfin, les PG seraient également impliquées dans de nombreux processus du développement, tels que la formation des fleurs, le développement du pollen, la dégradation pariétale du style pour permettre la pénétration du tube pollinique, et enfin le développement des siliques (Yang et al., 2018). Les fonctions des PG sont donc très variées, et d'autres fonctions restent sûrement à découvrir. Cette diversité de fonction reflète également le fait que les pectines et leurs modifications sont impliquées dans une multitude de processus.

➤ *PG R et PG RAM : une expression racinaire complémentaire*

L'étude de *PG R* et de *PG RAM* confirme que les PG ne sont pas exprimées aux mêmes endroits. En effet, les gènes *PG R* et *PG RAM* possèdent des patterns d'expression différents mais également complémentaires au niveau racinaire. Par conséquent, elles pourraient avoir des fonctions bien distinctes. Cette discussion a pour objectif de faire le bilan des fonctions observées ou putatives de ces deux PG. Pour l'une comme pour l'autre, il se pourrait que de nouvelles fonctions des PG aient été découvertes, même si des expériences complémentaires seront nécessaires pour les démontrer. La découverte de relations entre les PG et des voies de signalisations impliquées dans des processus de croissance et de défense des plantes est également proposée.



**Figure 82 : Hypothèses des fonctions de PG R.** 1) PG R est exprimée au niveau de la zone d'élongation de la racine. Elle permettrait d'assouplir la paroi pour permettre l'élongation. Elle permettrait également l'allongement des hypocotyles étiolés. 2) PG R est exprimée au niveau de la coiffe latérale, et permettrait la libération de BLC. 3) Le détachement des cellules de la coiffe permettrait la formation d'un pic d'auxine dans la racine, à l'origine de sites d'initiation de primordia racinaire. 4) PG R est exprimée au niveau de la zone de différenciation, afin de favoriser l'émergence des racines latérales. 5) Il semble que PG R soit exprimée suite à une blessure abiotique. Schéma de la racine d'après Overvoorde et al. (2010).



➤ *PG R aurait un rôle dans l'expansion cellulaire*

D'après les résultats obtenus, PG R aurait un rôle similaire à PGX1 et PGX2, puisque les sur-expressseurs de *PG R* présentent, tout comme les sur-expressseurs de *PGX1* et *PGX2*, un allongement des hypocotyles étiolés. Dans la mesure où la sur-expression de *PG R* n'induit pas l'élargissement des hypocotyles, et donc de leurs cellules, PG R serait impliquée dans la croissance anisotropique, probablement par l'assouplissement des parois longitudinales, *via* la dégradation des HG pariétaux. Il est suggéré que ce qui régule la localisation de l'activité de PG R soit la localisation de son substrat. En effet, Peaucelle et al. (2015), ont observé que des cellules en croissance anisotropique semblent posséder un marquage spécifique des HG déméthylestérifiés au niveau des parois longitudinales, et que ces mêmes parois sont plus souples que les parois basales. De plus, les PG sont connues pour dégrader les HG déméthylestérifiés (Brummell and Harpster, 2001; Senechal and Wattier et al., 2014; Verlent et al., 2005). La caractérisation de l'enzyme PG R *in vitro* montre que cette enzyme est effectivement capable de dégrader les HG déméthylestérifiés, même si étrangement, elle serait aussi apte à dégrader les HG hautement méthylestérifiés. Ce dernier résultat serait toutefois à confirmer.

PG R pourrait également être impliquée dans la croissance racinaire, puisque l'une des deux lignées sur-exprimant *PG R* présente une augmentation de la taille de ses racines primaires par rapport au sauvage. De plus, le gène *PG R* est exprimé au niveau des cellules de la zone d'élongation des pointes racinaires, et l'expression est visible en amont du début de l'allongement cellulaire (voir schéma bilan [figure 82-1](#)). Cependant, le deuxième sur-expressseur étudié ne possède pas de racines significativement plus longues que le sauvage. Il est donc possible que le phénotype d'allongement racinaire observé pour le premier sur-expressseur soit dû à l'insertion de l'ADN-T dans un gène impliqué dans le développement racinaire.

Par ailleurs, l'implication de PG R dans la croissance des tubes polliniques dans le pistil a été étudié chez l'une des lignées *promPG R::GUS*, mais aucun marquage n'a été observé au niveau des tubes polliniques en élongation ([annexe 19](#)). Cependant, peu d'observations ont été réalisées. De même, PG R pourrait avoir un rôle dans l'élongation des poils absorbants, dans la mesure où l'expression de *PG R* a été observée au niveau de ces cellules. Cependant, cette hypothèse est très spéculative, dans la mesure où *PG R* serait exprimée dans toutes les cellules de la zone de différenciation. Les poils absorbants de racines de plantes sauvages et du mutant *pg r* ont été examinés, mais aucune différence frappante n'a été observée ([annexe 20](#)). Il serait tout de même intéressant d'étudier les poils absorbants sur-exprimant *PG R* en comparaison avec le sauvage. Il est possible que suite à la sur-expression de *PG R*, un phénotype d'allongement des poils absorbants plus important que ceux des plantes sauvages soit observé, de la même façon que les hypocotyles étiolés.



➤ *La sur-expression de PG R induit une augmentation de la densité de racines latérales*

PG R a démontré son implication dans la formation des racines latérales, puisque les deux lignées sur-exprimant *PG R* présentent une augmentation de la zone de branchement de racines latérales, et une augmentation de la densité de racines latérales de cette zone, par rapport au sauvage. De plus, *PG R* est exprimée dans les tissus racinaires de la zone de différenciation.

Il est important de souligner que l'initiation des primordia et l'émergence de ceux-ci sont deux phénomènes distincts. L'initiation des primordia racinaires serait due à la libération de cellules de la coiffe latérale au niveau de l'apex racinaire, responsable de la formation d'un pic d'auxine dans la racine. C'est ce pic d'auxine qui induirait la formation d'un primordium, lorsque celui-ci atteint la zone de différenciation (Möller et al., 2017). En revanche, l'émergence des racines latérales serait permise grâce à la modification de l'adhésion des cellules recouvrant les primordia, par l'action d'enzymes de remodelage de la paroi, notamment des PG (Kumpf et al., 2013; Péret et al., 2009; Swarup et al., 2008). L'expression des enzymes de dégradation de la paroi serait médiée par le peptide IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION) et sa liaison au récepteur kinase HAE (leucine-rich repeat receptor-like kinase HAESA) et HSL2 (HAESA-LIKE2). En effet, les mutants *ida*, *hae* et *hae hsl2* présentent une réduction de l'expression de certains gènes *PG* (Kumpf et al., 2013), et il a été démontré que le module de signalisation IDA-HAE/HSL2 était nécessaire pour faciliter le passage des primordia racinaire au travers des tissus de la racine source (Kumpf et al., 2013). Il est donc possible que *PG R* intervienne dans l'un ou l'autre de ces processus, voire dans les deux.

Il est en effet possible que *PG R* intervienne dans la formation du pic d'auxine à l'origine de l'initiation des primordia racinaires, car l'expression du gène *PG R* est observée au niveau de la coiffe latérale. *PG R* pourrait donc provoquer la dégradation des HG de la lamelle moyenne retenant les cellules de la coiffe latérale, ce qui pourrait avoir pour conséquence leur libération (**figure 82-2**), et la relocalisation de l'auxine qu'elles contenaient vers l'intérieur de la racine, afin d'initier la formation de primordia racinaires (**figure 82-3**). Chez les sur-expresses, le relargage des cellules de la coiffe latérale est peut-être plus fréquent que chez le sauvage, conduisant à une augmentation de la fréquence des pics d'auxine, et donc à une densité plus importante de racines latérales.

Comme l'expression du gène *PG R* est également observée au niveau de la zone de différenciation, elle pourrait donc éventuellement être impliquée dans la modification de l'adhésion des cellules recouvrant les primordia, et permettre ainsi leur libération (**figure 82-4**). Il est cependant surprenant que l'expression de *PG R* soit visible dans chaque tissu de la zone de différenciation. En effet, les gènes des protéines permettant l'émergence des primordia racinaires sont exprimés uniquement dans les couches tissulaires proximales du primordium (Kumpf et al., 2013; Swarup et al., 2008). Compte tenu de ces informations, deux possibilités sont envisageables : (i) *PG R* est peut être présente sous une forme inactive, en attendant d'être activée, en cas de l'émergence de primordia racinaires. (ii) *PG R* est



présente au niveau de la zone de différenciation afin d'établir un équilibre constant entre rigidification et assouplissement de la paroi sur toute la zone de différenciation. En effet, le substrat des PG, qui sont les HG déméthylestérifiés, subissent soit une dégradation par les enzymes pectinolytiques, soit une rigidification *via* des ponts calciques. Il est donc possible qu'une PG doive agir quasiment en permanence afin d'éviter une rigidification trop importante des tissus, pouvant limiter certains processus développementaux tels que la formation des racines latérales.

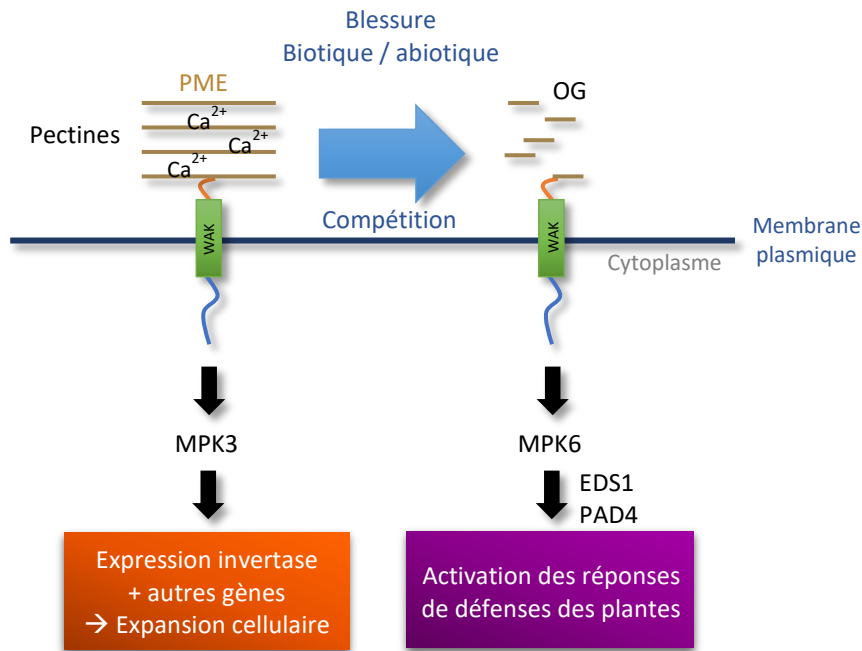
➤ *PG R pourrait avoir un rôle dans la formation de BLC*

L'expression de *PG R* au niveau de la coiffe latérale racinaire peut également indiquer qu'elle est impliquée dans la formation des BLC. En effet, il a été rapporté que la séparation des cellules de la coiffe racinaire (columelle et coiffe latérale) était à l'origine de la formation de ces cellules, et que cette séparation est due à l'activité d'enzymes pectinolytique (Driouich et al., 2007; Hawes and Lin, 1990), notamment la PG « RCPG » (ROOT CAP POLYGALACTURONASE), dont l'expression serait induite par le facteur de transcription BEARSKIN1 (Kamiya et al., 2016). Il est donc possible que la dégradation des HG par *PG R* soit à l'origine de la libération des cellules de la coiffe latérale, et de la formation des BLC. Cependant, *RCPG* est exprimée dans la columelle et les BLC, ce qui n'est pas le cas de *PG R*. L'expression de *PG R* est visible chez seulement une minorité de BLC, et totalement absente dans la columelle. Il reste cependant possible que ces deux PG aient une fonction complémentaire dans la production de BLC. Des preuves expérimentales supplémentaires dans l'implication de *PG R* dans la formation de BLC sont néanmoins nécessaires. Cependant, l'augmentation du nombre de racines latérales chez les sur-expresses de *PG R*, ce qui est potentiellement dû à l'augmentation du relargage des cellules de la coiffe latérale, supporte cette hypothèse. Il est également possible que l'action de *PG R* soit une étape préliminaire dans la formation de BLC.

➤ *PG R : rôle potentiel dans la défense des plantes*

Enfin, il semblerait que *PG R* puisse être exprimée en réponse à une blessure abiotique, en halo autour de celle-ci ([figure 82-5](#)). L'expression d'une PG au niveau d'une blessure peut paraître surprenante, puisque généralement, ce sont plutôt des inhibiteurs de PG qui sont produits, afin d'inhiber les PG que le pathogène utilise pour dégrader la paroi des plantes (Senechal and Wattier et al., 2014). Par ailleurs, il est peu probable que des PG soient émises afin de s'attaquer aux pathogènes, puisque les HG ne sont pas retrouvés chez les organismes pathogènes pour les plantes (champignons (Bartnicki-Garcia, 1968; Feofilova, 2010), oomycètes (Aronson et al., 1967), bactéries (Ghuysen and Hakenbeck, 1994), nématodes ou insectes (Vincent and Wegst, 2004). Enfin, il est peu probable que des PG interviennent dans le renforcement de la paroi pour réparer les blessures, puisqu'au contraire, elles digèrent les HG pariétaux (Senechal and Wattier et al., 2014).

Le gène *PG R* pourrait donc avoir un rôle interne à la plante. Il est connu que l'activité des PG engendre la formation d'OG (Senechal and Wattier et al., 2014). Par ailleurs, des OG produits suite à une blessure ou à l'attaque d'un pathogène sont capables d'éliciter les



**Figure 83 : Suppositions du contrôle de l'expansion cellulaire et de l'activation des défenses des plantes par les WAK.** Les WAK auraient une affinité pour les pectines déméthylestérifiées et liées par le calcium. Cette liaison serait nécessaire à l'activation de MPK3, à l'origine de l'expression d'invertases, qui permettent de maintenir la turgescence vacuolaire, ainsi que l'expression d'autres gènes. Cette signalisation aboutit à la croissance cellulaire. En présence d'OG produits suite à une blessure biotique, les OG se fixeraient sur les WAK à la place des chaînes pectiques. Les OG induiraient ainsi l'activation de MPK6, ainsi que les facteurs de transcription EDS1 et PAD4. Cette signalisation mène à l'activation des défenses des plantes. Schéma d'après Kohorn, 2016.

réponses de défenses des plantes, et permettent d'augmenter la résistance des plantes face à certains pathogènes (Ferrari et al., 2007). En effet, ils sont reconnus par la plante en tant que DAMPS (damage associated molecular patterns), qui sont des marqueurs de dommage de la plante (Brutus et al., 2010; Cervone et al., 2015; Ferrari, 2013). Le déclenchement des défenses des plantes est notamment permis par la fixation des OG sur les récepteurs membranaires « wall-associated kinases » (WAK). Les cinq WAK présents chez *A. thaliana* (WAK1-5) sont dotés d'un domaine sérine-théronine kinase cytoplasmique, d'un domaine trans-membranaire, et d'une partie N-terminale extracellulaire et servirait de « capteur de l'intégrité de la paroi ». La fixation d'OG sur la partie extracellulaire des WAK permet l'activation de la voie de défense des plantes (Brutus et al., 2010; Ferrari, 2013; Kohorn, 2000, 2016; Kohorn and Kohorn, 2012). On pourrait donc émettre l'hypothèse que le gène *PG R* serait exprimé suite à une blessure, et que les OG produits par l'action de *PG R* serviraient à amplifier le signal conduisant à la mise en place des défenses des plantes, *via* la fixation des OG sur les WAK. *PG R* aurait donc à la fois un rôle dans le développement des racines latérales, dans la production de BLC, dans l'allongement cellulaire, et enfin dans la défense de la plante suite à une blessure ([figure 82](#)).

➤ *PG R et les WAK impliqués dans l'expansion cellulaire et la défense des plantes ?*

Curieusement, les protéines WAK et *PG R* possèderaient donc toutes deux à la fois une fonction dans l'allongement cellulaire et dans la défense des plantes suite à une blessure. En effet, les WAK sont capables de lier des OG, mais également des chaînes de pectines pariétales de façon covalente, et cette liaison serait nécessaire à l'expansion cellulaire et à la croissance racinaire ([figure 83](#) ; Kohorn, 2016; Kohorn and Kohorn, 2012; Kohorn et al., 2006; Lally et al., 2001). Ceci a été démontré expérimentalement grâce à l'induction de la production d'ARN anti-sens de *WAK2* et *WAK4*, qui permettent d'aboutir à la disparition des protéines WAK, l'arrêt de l'allongement cellulaire, le blocage du développement racinaire, et la diminution de la taille des feuilles (Lally et al., 2001; Wagner and Kohorn, 2001).

La croissance cellulaire médiée par les WAK serait due au contrôle de la pression de turgescence vacuolaire, grâce à l'expression d'invertases. En effet, sur un milieu pauvre en sucres et en sels, le mutant *wak2-1* présente une croissance racinaire limitée, ainsi qu'une réduction de l'activité invertase vacuolaire. Il présente également une diminution de la quantité des ARN de l'invertase vacuolaire prédominante *AtvacINV1*. C'est la transformation du saccharose en fructose et en glucose par les invertases qui permettrait de maintenir la pression de turgescence, nécessaire à la croissance (Kohorn et al., 2006). Le contrôle de l'expression de cette invertase serait réalisé grâce à l'activation par phosphorylation d'une MAPK3 (mitogen-activated protein kinase) par les WAK, grâce à la fixation de pectines sur les protéines WAK ([figure 83](#) ; Kohorn, 2016; Kohorn et al., 2009).

La liaison entre les protéines WAK et les chaînes pectiques permettrait donc de contrôler l'expansion cellulaire. Cependant, il n'a pas encore été établi si ces chaînes pectiques sont digérées par des enzymes de plantes telles que des PG, ni comment cette voie de signalisation





est activée. De même, l'implication des OG dans le développement doit encore être élucidée (Kohorn, 2016). Il semblerait néanmoins que les WAK aient davantage d'affinité *in vitro* pour les OG de DP (degré de polymérisation)  $\geq 9$  plutôt que pour les longues chaînes pectiques (Decreux and Messiaen, 2005). Il a donc été suggéré qu'en l'absence d'OG, les WAK seraient liés aux pectines pariétales afin de réguler la croissance cellulaire, mais qu'en présence d'OG générés par des blessures ou des pathogènes, la liaison des OG sur les WAK permettrait d'activer les réponses de défenses (Kohorn, 2016; Kohorn et al., 2014). En effet, des évidences montrent qu'il y aurait bien une compétition des OG par rapport aux pectines pour la fixation aux WAK, menant à l'activation de réponses aux stress (Kohorn et al., 2014).

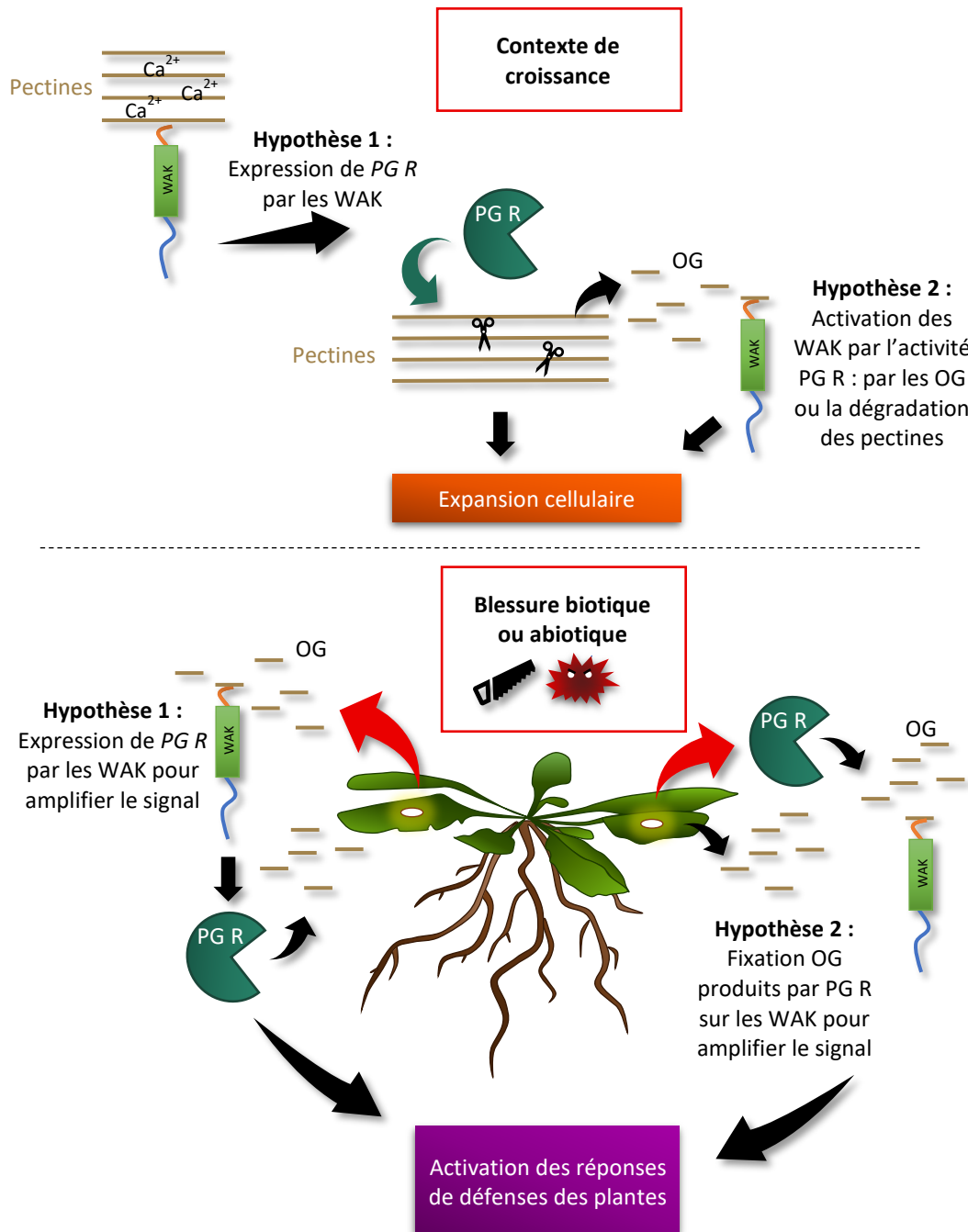
Cependant, on ignore comment les protéines WAK reconnaissent les différents types de pectines. Mais des éléments indiquent comment elles y répondent de façon différentielle. Il a été démontré que MPK6, ainsi que les facteurs de transcription EDS1 (enhanced disease susceptibility 1) et PAD4 (phytoalexin deficient 4) sont impliqués dans la transduction du signal de WAK2 permettant d'induire une réponse aux stress. De plus, la déméthylestérification des pectines par les PME est nécessaire à l'activation des WAK, et à la transduction du signal par EDS1 et PAD4 (**figure 83**). En revanche, MPK3 n'est pas impliqué dans cette transduction de signal. MPK3 et MPK6 ont donc des fonctions distinctes : MPK3 induit la croissance cellulaire, et MPK6 la réponse aux stress, suite à l'activation par les WAK (Kohorn, 2016; Kohorn et al., 2014).

Un autre lien potentiel entre les WAK et PG R est le fait que l'extinction des WAK par des ARN anti-sens entraîne l'inhibition du développement des racines latérales et la réduction des poils absorbants (Lally et al., 2001). Or il est possible que PG R intervienne dans le développement des poils absorbants, puisqu'elle y est exprimée, et par ailleurs, la surexpression de PG R augmente la densité de racines latérales.

Enfin, il est possible que PG R soit en relation avec WAK4, puisque les ARN anti-sens de WAK4 provoquent une croissance limitée des racines, des feuilles, des pédicelles de siliques et des tiges, sans impacter la division cellulaire chez ces 3 derniers éléments. Le contrôle du développement des différents organes par WAK4 serait donc uniquement dû au contrôle de l'élongation cellulaire (Lally et al., 2001). Ceci est à rapprocher de ce que nous avons observé pour le gène PG R : celui-ci n'est pas exprimé dans la zone de division du RAM, et la sur-expression de PG R permet l'allongement des cellules de l'hypocotyles, donc des cellules qui le constituent. Malheureusement, le patron d'expression de WAK4, tout comme celui de WAK5, ne sont pas connus, car les promoteurs de ces gènes ne sont pas suffisamment forts pour engendrer un signal GUS (Cosgrove, 2001b).

- *PG R pourrait permettre l'expansion cellulaire par le remodelage de la paroi et par l'activation des WAK*

De nombreux éléments ont donc été élucidés par rapport à l'induction de la croissance ou des réponses aux stress par la liaison entre les WAK et les pectines, mais certains points restent encore à éclaircir. Par rapport à ce qui est actuellement connu sur le rôle des WAK dans la croissance cellulaire, et les résultats de cette étude sur PG R, on pourrait supposer que



**Figure 84 : Hypothèses des liens entre PG R et les WAK dans les contextes de croissance et de blessures.** Durant la croissance cellulaire il est possible que l'expression de PG R soit induite par les WAK, permettant l'assouplissement cellulaire (hypothèse 1). Dans cette hypothèse, les WAK sont activés par leur fixation aux pectines en boîtes à œufs de la paroi. Il est aussi possible que ce soit l'activité de PG R (la production d'OG, ou la dégradation des pectines auxquelles sont liées les WAK) qui provoque l'activation des WAK, permettant ainsi le maintien de la pression de turgescence (hypothèse 2). Dans le contexte d'une blessure abiotique, et probablement biotique également, il est possible que l'expression du gène PG R soit activée par les WAK, afin d'augmenter le signal menant à l'activation des défenses cellulaires (hypothèse 1). Mais il est également possible que l'expression de PG R soit activée par un autre signal, et que les OG produits par PG R permettent d'augmenter le signal d'activation des WAK, et de la signalisation de défense qui en résulte. Dans ces deux hypothèses, PG R servirait à amplifier le signal d'activation des défenses.

l'activité de PG R permettrait l'élongation cellulaire grâce à deux voies, éventuellement combinées : (i) l'assouplissement pariétal résultant de la digestion des HG. (ii) L'augmentation de la pression de turgescence médiée par les WAK, activés par PG R. Dans ce cas, deux possibilités sont envisageables : soit PG R permet de découper les HG auxquels sont fixés les WAK, et ceci engendrerait le signal permettant la croissance, soit la fixation des OG produits par PG R sur les WAK permettrait d'induire le signal de croissance. Cette dernière hypothèse n'est pas en accord avec ce qui a été supposé jusqu'à présent, puisque les scientifiques qui ont étudié les WAK suggèrent que l'activation des WAK par les OG est uniquement en relation avec la mise en place des défenses, mais pas avec la croissance (Brutus et al., 2010; Denoux et al., 2008; Kohorn, 2016; Kohorn and Kohorn, 2012; Kohorn et al., 2014). Cependant, Kohorn (2016) n'exclut pas non plus cette possibilité.

Les WAK pourraient donc être activés dans la zone d'élongation, grâce à leur fixation aux HG déméthylestérifiés, et *via* l'intervention éventuelle de PG R. En effet, la zone d'élongation et de différenciation posséderait des HG déméthylestérifiés (Dolan et al., 1997), et bien que les WAK ont plus d'affinité *in vitro* pour les HG sous forme de dimères ou de multimères, et que la présence de calcium semble indispensable (Decreux and Messiaen, 2005; Decreux et al., 2006), il a été démontré que les HG méthylés ou déméthylestérifiés, ainsi que le RG-I et le RG-II sont tous capables d'induire l'expression de gènes menant à la croissance cellulaire *via* les WAK (Kohorn et al., 2009).

➤ *Les protéines WAK induisent-elles l'expression de PG R ?*

Ainsi, que ce soit dans le processus d'élongation cellulaire ou dans la défense des plantes, PG R pourrait induire l'activation des WAK, ce qui expliquerait pourquoi ces deux protéines semblent avoir des fonctions communes (**figure 84**). Mais il est également possible que cela soit l'inverse, c'est-à-dire que les WAK permettent de contrôler l'expression du gène *PG R* (**figure 84**). Ce qui pourrait confirmer cette théorie est le fait que chez *A. thaliana*, un gène *PME* et deux gènes *PG* ont été identifiés comme étant exprimés suite à un traitement par des OG (Moscatiello, 2006). Comme pour l'hypothèse où PG R entraîne l'activation des WAK, il est possible que l'expression de *PG R* soit induite par les WAK suite à une blessure afin d'amplifier le signal d'alerte menant à la mise en place de défenses. Par ailleurs, *PG R* serait exprimée dans la zone d'élongation des racines par les WAK afin de promouvoir l'élongation cellulaire.

Un autre élément qui pourrait indiquer que l'expression de *PG R* soit sous le contrôle des WAK est le fait que chez le mutant *pg r*, le gène *PG R* est peut être sur-exprimé. En effet, Il est possible que l'augmentation de la quantité de fragments de transcrits *PG R* observés chez le mutant *pg r* par rapport au sauvage par RT-qPCR soit dû à l'augmentation de l'activation du promoteur *PG R* chez le mutant. Des expériences supplémentaires sont en revanche absolument indispensables pour confirmer cette hypothèse. Par exemple, il serait possible de transformer le mutant *pg r* par la construction *promPG R::GUS*, ce qui nous permettrait de voir si l'activité du promoteur *PG R* est plus important dans le fond génétique mutant que dans le fond sauvage. Si le gène *PG R* est effectivement sur-exprimé chez le mutant *pg r*, cela pourrait être du au fait que l'absence de remodelage pariétal par PG R induit l'augmentation



de la proportion d'HG liés par le calcium, ce qui serait détecté par les protéines WAK liées aux pectines pariétales. C'est pourquoi ils induiraient l'expression de *PG R*, afin de rétablir un équilibre.

Cependant, cette hypothèse n'a pas été confirmée par le phénotypage du mutant *pg r*. En effet, l'augmentation de la proportion d'HG liés par le calcium devrait entraîner une rigidification pariétale, et donc une diminution de la croissance racinaire. Mais il est possible, comme évoqué dans les résultats, que la fonction de *PG R* soit compensée par d'autres PG. Il est également possible que ces PG ne produisent pas les mêmes fragments d'HG que *PG R*, et que les WAK soient capables de les distinguer.

Ces hypothèses sont cependant très spéculatives. La seule piste relativement solide qui soit en accord avec le fait que l'expression du gène *PG R* puisse être régulée par les WAK est le fait que des OG soient capables d'induire la production de PG (Moscatiello, 2006).

➤ *L'expression du gène PG R pourrait être indépendante des WAK*

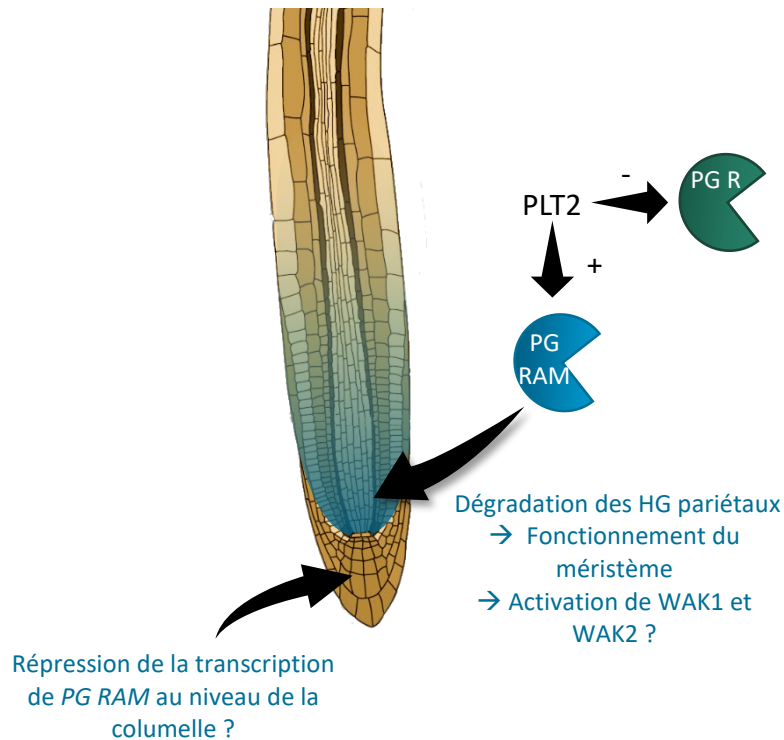
La sur-expression putative du gène *PG R* chez le mutant *pg r* pourrait également avoir une autre origine, indépendante des WAK. Il est possible que chez le sauvage, *PG R* clive les HG pariétaux, relarguant ainsi des OG. Ceux-ci pourraient avoir comme effet d'inhiber l'expression de *PG R*, par une boucle de rétro-contrôle. Ainsi, chez le mutant *pg r*, l'absence d'OG libérés leverait cette inhibition et résulterait en une augmentation de l'expression de *PG R*. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'il a été rapporté que l'expression de certains gènes codant des PG serait régulée par l'auxine, et que les OG accumulés au niveau de l'apoplaste, suite à l'action des PG, agiraient en inhibant les voies de réponses à l'auxine, par une boucle de rétro-contrôle (Ferrari, 2013; Yang et al., 2018).

On peut également supposer que les WAK puissent agir sur la protéine *PG R*, par exemple en l'activant par phosphorylation, plutôt que d'agir sur l'expression du gène. Ceci expliquerait pourquoi *PG R* est exprimée dans chaque tissu de la zone de différenciation de la racine, alors qu'a priori, elle interviendrait au niveau de cette zone uniquement dans le processus d'émergence des racines latérales. Ainsi, les WAK permettraient de réguler l'activation de *PG R* au moment opportun. Cependant, cette hypothèse n'explique pas pourquoi l'expression du gène *PG R* est observée suite à une blessure abiotique. Il est possible que plusieurs des hypothèses énumérées précédemment soient combinées.

Néanmoins, ces postulats nécessitent des expériences supplémentaires afin d'établir si les WAK sont responsables de l'activation de l'expression de *PG R*, ou de l'activation de la protéine, ou si c'est l'activité de *PG R* qui induit la transduction d'un signal *via* les WAK. Si l'une de ces voies est démontrée, ça serait la première fois qu'une PG et les WAK seraient mis en relation.

➤ *PG RAM pourrait être impliquée dans le fonctionnement du RAM*

En ce qui concerne *PG RAM*, et bien que des informations soient manquantes à notre étude, il se pourrait qu'une nouvelle fonction ait été découverte pour les PG. Il semble en que



**Figure 85 : Hypothèse de la fonction de PG RAM.** Il a été montré expérimentalement que *PLT2* entraînait l'expression du gène *PG RAM*, et la répression du gène *PG R*. L'expression du gène *PG RAM* forme un gradient, depuis les cellules initiales du rhizoderme, du cortex, de l'endoderme, du péricycle et de la stèle, ainsi que dans les files de ces cellules, au niveau de la zone de division. L'expression du gène *PG RAM* diminue en s'éloignant, et disparaît au niveau de la zone d'élongation. L'expression de *PG RAM* étant absente du centre quiescent, dont l'activité mitotique est beaucoup plus faible (Petricka et al., 2012), il semble donc que *PG RAM* intervienne dans le fonctionnement du méristème. Par ailleurs, les gènes *WAK1* et *WAK2* étant exprimés dans le RAM également, il est possible que l'activité de *PG RAM* entraîne l'activation des WAK. Enfin, l'expression du gène *PG RAM* semble réprimée au niveau de la columelle, car malgré la présence de *PLT2* dans cette zone, *PG RAM* n'y est donc pas exprimé. Schéma de la racine d'après Overvoorde et al. (2010).

PG RAM soit impliquée dans la régulation de la division cellulaire, ce qui n'a encore jamais été montré. Trois éléments nous permettent de le supposer : (i) la localisation de l'expression de *PG RAM* au niveau de la zone de division du RAM, au niveau des apex racinaires, et dès le début de la formation des primordia des racines latérales. (ii) L'absence d'expression de *PG RAM* au niveau du centre quiescent, dont le taux de division est très faible (Petricka et al., 2012). (iii) L'activation de l'expression *PG RAM* par le facteur de transcription PLT2, qui promeut la division cellulaire, et réprime l'élongation et la différenciation cellulaire ([figure 85](#)).

Il est donc probable que PG RAM favorise la division cellulaire, en dégradant les HG des cellules du RAM. Cette dégradation empêcherait la formation de structures en boîtes à œufs, dont la rigidité pourrait empêcher la division des cellules. Toutefois, il a été révélé par immunomarquage que les HG des cellules en division sont majoritairement méthylestérifiés ([figure 22](#) de l'introduction, chapitre III ; Dolan et al., 1997). Or les PG sont connues pour dégrader les HG faiblement méthylestérifiés. Les observations réalisées à partir d'anticorps peuvent néanmoins être contestables, car le masquage d'épitope entraîne souvent de faux-négatifs, et par ailleurs, l'anticorps JIM7 utilisé pour observer les HG méthylestérifiés reconnaît en réalité des HG avec un DM de 15 à 81 %, sans différence significative, d'après Willats et al. (2000). Il est donc possible que PG RAM ait comme substrat des HG déméthylestérifiés de la zone de division. Par ailleurs, les résultats préliminaires obtenus pour la caractérisation *in vitro* de l'activité enzymatique indiquent que PG RAM, sous forme pleine longueur ou tronquée, est capable de dégrader des HG hautement méthylestérifiées. Bien que ce résultat soit fortement surprenant pour une PG, et mérite d'être vérifié, cela expliquerait comment PG RAM peut dégrader des HG de la zone de division qui apparaissent méthylestérifiés par immunomarquage. Afin d'éclaircir les mécanismes de remodelage de la paroi qui ont lieu dans la zone de division, il serait intéressant d'identifier une PME permettant la déméthylestérification aléatoire des HG présents dans cette région de l'apex racinaire.

Cependant, il est surprenant qu'aucun phénotype de croissance racinaire n'ai été observé chez les mutants *pg ram1* et *pg ram3*. Si l'expression de *PG RAM* est induite par PLT2 pour promouvoir la division cellulaire, les mutants *pg ram1* et *pg ram3* auraient dû présenter des racines plus courtes que celles du sauvage. En revanche, il est normal que les hypocotyles étiolés des mutants *pg ram1* et *pg ram3* ne présentent pas de phénotype d'allongement différent du sauvage, puisqu'*a priori*, *PG RAM* n'est pas exprimée lorsque les hypocotyles sont en élongation. PG RAM n'aurait donc aucun rôle dans l'élongation cellulaire.

➤ *Les facteurs de transcription PLT2 régulent l'expression de PG R et PG RAM de façon différentielle*

Nous avons démontré par RT-qPCR que l'expression de *PG RAM* est induite par PLT2, alors qu'au contraire, l'expression de *PG R* est réprimée par PLT2 ([figure 85](#)). Ceci est en accord avec les résultats de Santuari et al., (2016), d'après une analyse transcriptomique globale. Ils ont d'ailleurs démontré que l'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* était contrôlée par l'ensemble des facteurs de transcription PLT (PLT1,2,3,4,5,7 ; données supplémentaires 1).





Les résultats obtenus sont également en accord avec les patrons d'expression des gènes *PG RAM*, *PG R* et la localisation de la protéine PLT2. En effet, l'expression du gène *PG RAM* et la protéine PLT2 présentent le même gradient au niveau du RAM, avec un maximum d'expression ou de présence au niveau des cellules initiales, et un extinction du signal lorsque les cellules entrent en élongation ([figure 28](#) du chapitre III de l'introduction ; Mähönen et al., (2014). L'induction de l'expression du gène *PG RAM* par le facteur de transcription PLT2 n'est donc pas surprenant. De même, le fait que PLT2 réprime l'expression de *PG R* est cohérent avec le fait que le début de la zone d'expression de *PG R* soit observé au moment où le signal de la protéine PLT2 disparaît.

Il peut paraître surprenant qu'aucune modification du patron d'expression des gènes *PG RAM* et *PG R* n'ait été observé 48 h après transfert des transformants *prom PG RAM::GUS* et *prom PG R::GUS* sur milieux supplémentés en auxine ou NPA. En effet, entre 5 h et 24 h après transfert de plantes sauvages sur auxine, la quantité de transcrits *PLT1* et *PLT2* augmente. La transcription du gène *PLT2* est donc dirigée par l'auxine (Aida et al., 2004). Il est possible que le patron d'expression des gènes *PG R* et *PG RAM* est inchangé en présence d'auxine ou de NPA, mais que le niveau d'expression varie. Ainsi sur NPA, l'expression de *PG R* devrait augmenter et celle de *PG RAM* diminuer, et inversement sur auxine. Cependant, Santuari et al. (2016) ont démontré que bien que certains gènes régulés par les facteurs PLT sont régulés de la même façon par l'auxine, respectivement 70 % et 64 % des gènes activés ou réprimés par les facteurs PLT ne sont pas affectés par un traitement à l'auxine. *PG R* et *PG RAM* font donc visiblement partie de ces gènes.

➤ *Une expression différente de PG RAM et de PLT2 dans la columelle*

Par ailleurs, il est étonnant que l'expression du gène *PG RAM* ne soit pas davantage visible au niveau de la columelle. En effet, le gène *PLT2* est exprimé dans la columelle, et la protéine PLT2 y est présente ([figure 28](#) du chapitre III de l'introduction ; Galinha et al., 2007; Mähönen et al., 2014). Il est donc possible que l'expression du gène *PG RAM* au niveau de la columelle soit régulée par un facteur avec une action antagoniste à PLT2.

Il est ainsi peu probable que l'absence d'expression du gène *PG RAM* au niveau de la columelle soit due à une régulation par l'auxine. En effet, l'auxine permet l'expression du gène *PLT2* (Aida et al., 2004), et l'expression du gène *PLT2* est visible dans la columelle ([figure 28](#) du chapitre III de l'introduction ; Galinha et al., 2007). Par ailleurs, l'expression de la construction artificielle *DR5::GUS* au niveau de la columelle prouve l'activation des réponses à l'auxine dans la columelle ([annexe 17](#) ; Sabatini et al., 1999). Donc malgré le fait que l'auxine puisse agir de façon différentielle suivant sa concentration et la présence ou non de protéines spécifiques impliquées dans la transduction du signal de l'auxine (Overvoorde et al., 2010), le fait que *PLT2* soit exprimé dans la columelle implique que la répression de l'expression du gène *PG RAM* dans cette zone soit indépendante de l'auxine.

En revanche, il est possible que le gène *PG RAM* soit réprimé dans la columelle par SOMBRERO (SMB). Ce facteur de transcription réprime le facteur de transcription FEZ au



niveau des cellules filles de la columelle et de la coiffe latérale. Or FEZ est requis pour les divisions des cellules souches de la columelle et de la coiffe latérale (Bennett and Scheres, 2010). Le fait que FEZ et potentiellement PG RAM participe tous les deux à la division cellulaire, et que FEZ soit réprimé par SMB au niveau de la columelle, fait de SMB un bon candidat pour être le facteur responsable de la répression du gène *PG RAM* dans la columelle.

➤ *Les gènes PG RAM, WAK1 et WAK2 sont exprimés dans le RAM*

Enfin, tout comme PG R, des relations pourraient exister entre PG RAM et les WAK. En effet, *WAK1* et *WAK2* sont exprimés au niveau du RAM, des primordia racinaires, et du méristème apical caulinaire, de la même manière que *PG RAM* (Wagner and Kohorn, 2001). L'expression de *WAK1*, *WAK2* et *PG RAM* au niveau d'une zone où les cellules sont en divisions, et non en élongation, suggère que les protéines codées par ces trois gènes possèdent un rôle dans la division cellulaire. Lally et al. (2001) avaient observé que l'expansion des organes en réponse aux WAK était due à l'augmentation cellulaire, et non à la division cellulaire, mais il s'agissait de *WAK4* uniquement. Il est donc possible que les différents WAK agissent dans différents contextes. Le rôle des WAK dans la division cellulaire n'a cependant jamais été étudié.

Dans la mesure où nous avons démontré expérimentalement dans cette étude que l'expression de *PG RAM* était contrôlée par *PLT2*, il est peu probable que les WAK engendrent l'expression de *PG RAM*. Par conséquent, s'il existe un lien entre PG RAM et les WAK, il est plus vraisemblable que ce soit l'activité de PG RAM qui active les WAK. Tout comme pour PG R, soit PG RAM dégrade des pectines auxquelles les WAK sont fixés, ce qui engendre un signal de division cellulaire, soit ce sont les OG produits par l'activité de PG RAM qui activent les WAK (**figure 85**). En revanche, un signal de division cellulaire induit par les WAK n'a jamais été caractérisé.

➤ *PG RAM, liée à une ancre GPI ?*

L'expression transitoire en feuille de tabac des constructions 35S::eYFP-PG RAM PL et T n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un ancrage à la membrane plasmique de la protéine PG RAM *via* une ancre GPI, puisque la version pleine longueur est observable aussi bien à la membrane qu'à la paroi, et la version tronquée n'a jamais été observée au niveau de la paroi. De même, l'observation de la PG AT3G48950 liée à la eYFP en feuille de tabac n'a pas non plus mis en évidence la présence d'une liaison à une ancre GPI chez cette protéine.

Par ailleurs, la protéine de fusion eYFP-PG RAM PL sur-exprimée dans *A. thaliana* n'est pas non plus localisée de façon spécifique au niveau de la membrane plasmique. Des protoplastes de feuilles de l'un de ces transformants ont également été observés mais, malheureusement, ni les feuilles ni les protoplastes ne présentaient de marquage. Il est surprenant que le marquage n'ait pas été observé dans les feuilles, dans la mesure où le promoteur fort 35S permet en théorie d'exprimer les protéines dans toutes les cellules.



Malgré le fait que la présence de l'ancre GPI n'a pas été mise en évidence, les résultats de la caractérisation *in vitro* des protéines PG RAM PL et T indiquent que le signal ancre GPI putatif, absent dans la forme tronquée, n'est pas nécessaire à la fixation de l'enzyme sur son substrat, ni à l'activité hydrolase de l'enzyme. Il pourrait donc s'agir effectivement d'un signal ancre GPI.

➤ *Caractérisation in vitro de PG RAM et PG R, cohérente avec les autres PG ?*

Concernant la caractérisation *in vitro* de PG R, PG RAM PL et PG RAM T, il semblerait que les préférences de pH et de température des enzymes soient cohérents avec ce qui est connu des PG (Senechal and Wattier et al., 2014). En revanche, par rapport à la caractérisation des substrats préférentiels, cette expérience serait à répéter afin de valider ces résultats. Mais si ceux-ci sont confirmés, ce serait la première fois à notre connaissance que des PG présenteraient une activité à la fois avec des substrats pectiques hautement méthylestérifiés et faiblement méthylestérifiés, et une activité maximale avec des pectines hautement méthylestérifiées. Le fait que ces enzymes soient capables de dégrader des pectines hautement méthylestérifiées les font se rapprocher d'avantage des pectines lyases que des PG.

Si cette préférence de substrat est confirmée, cela remet en cause ce qui a été suggéré par rapport à la fonction de PG R dans la croissance anisotropique. En effet, comme nous avons observé que PG R possède un rôle dans la croissance des cellules de l'hypocotyle étioilé et non dans la croissance isotropique, nous avons émis l'hypothèse que l'activité de PG R est restreinte au niveau des parois longitudinales des cellules en élongation, grâce à la présence de son substrat préférentiel. Or Peaucelle et al. (2015) ont observé que les HG des parois longitudinales des cellules en expansion étaient potentiellement déméthylestérifiés. Les résultats du test de substrat préférentiel de PG R est donc incohérent. Mais ceux-ci sont à prendre en considération avec prudence, dans la mesure où l'activité maximale observée est relativement faible.

➤ *Conclusion de l'étude*

Ce projet a donc permis de mettre en évidence le rôle de PG R dans le développement des racines latérales, même si il reste à définir l'implication exacte de PG R dans ce processus. Elle pourrait effectivement avoir un rôle dans : (i) l'initiation des primordia racinaire, grâce à la formation du pic d'auxine à l'apex racinaire, provoqué par la libération des cellules de la coiffe latérale. (ii) L'émergence des primordia, *via* la modification de l'adhésion des cellules au-dessus des primordia. Selon ces deux hypothèses, PG R agirait en modifiant l'adhésion cellulaire, vraisemblablement en digérant les HG de la lamelle moyenne, à l'origine de l'adhésion. Grâce à cette même fonction, PG R pourrait participer à la libération des BLC à l'apex racinaire.

PG R pourrait également avoir un rôle dans la croissance racinaire, même si des expériences avec d'autres lignées sur-exprimant le gène sont à prévoir pour confirmer ce résultat. Il est possible que PG R favorise l'expansion cellulaire en remodelant les HG de la



paroi, permettant ainsi un assouplissement pariétal. PG R aurait par conséquent deux modes d'action : la modification de l'adhésion cellulaire en digérant les HG de la lamelle moyenne, et l'assouplissement de la paroi *via* la digestion des HG de la paroi primaire.

Enfin, il est possible que PG R intervienne dans la défense des plantes, puisque son expression semble induite entre 3h et 24 h après une blessure abiotique au niveau des feuilles. Les PG n'étant pas de bonne candidates pour attaquer d'éventuels pathogènes ou pour renforcer la paroi, il est possible que PG R intervienne dans la signalisation menant à la mise en place des défenses des plantes, *via* la production d'OG, connus pour être des DAMPS (Brutus et al., 2010; Cervone et al., 2015; Ferrari, 2013).

Le fait que PG R puisse être impliquée dans l'expansion cellulaire ainsi que dans la défense des plantes peut suggérer que son expression et/ou son activité soient liées au fonctionnement des WAK, eux-mêmes impliqués dans ces deux processus. De plus, il a été démontré que le fonctionnement des WAK est directement lié aux pectines ainsi qu'aux OG (Brutus et al., 2010; Ferrari, 2013; Kohorn, 2000, 2016; Kohorn and Kohorn, 2012). Il est donc possible que PG R active les WAK, ou l'inverse.

Ce projet a également permis d'établir un lien entre l'expression de *PG RAM* et la zone de division cellulaire du RAM. Il est donc proposé que *PG RAM* soit impliqué dans le remodelage des HG pariétaux, afin de promouvoir ou faciliter la division cellulaire. Le fait que *PG RAM* ne soit pas exprimée dans le centre quiescent est conforme avec cette hypothèse, puisque le centre quiescent présente une faible activité de division. Enfin, le fait que l'expression du gène *PG RAM* soit positivement régulée par *PLT2*, qui orchestre la division des cellules du RAM (Santuari et al., 2016), est aussi en accord avec cette hypothèse. Il reste cependant à le démontrer expérimentalement.

Par ailleurs, le fait que le gène *PG RAM* ne soit pas exprimé dans la columelle, contrairement à *PLT2*, peut être le témoignage d'une deuxième voie régulant l'expression du gène *PG RAM*. Il pourrait s'agir du facteur de transcription *SBM*, déjà connu pour réprimer la division cellulaire au niveau des cellules filles de la columelle et de la coiffe latérale, *via* la répression de *FEZ* (Bennett and Scheres, 2010).

Enfin, les gènes *PG RAM*, *WAK1* et *WAK2* sont tous les trois exprimés dans les méristèmes caulinaires et racinaires. En particulier, *WAK2* présenterait le même patron d'expression au niveau du RAM que *PG RAM* (Wagner and Kohorn, 2001). Il se pourrait donc que leurs expressions et/ou leurs fonctions soient liées, et que *PG RAM* permettent l'activation des *WAK*, ou l'inverse.

Pour conclure, bien que de nombreuses informations aient été découvertes au cours de ce projet, des éléments sont encore manquants pour apporter des conclusions définitives. L'absence de phénotype chez les mutants peut s'expliquer dans le contexte d'une famille multigénique, cependant, l'impossibilité d'obtenir des transformants *35S::PG RAM* reste inexplicée. Il est en effet peu probable que cette construction soit létale, puisque des transformants *35S::eYFP-PG RAM PL* ont été obtenus. Mais cela reste une possibilité, puisque





la fusion de la PG à la protéine eYFP pourrait empêcher cette protéine de remplir sa fonction, et donc la eYFP inhiberait la létalité de la sur-expression de PG RAM.

L'absence de signal chez les transformants exprimant les différentes constructions PG-eYFP, que ce soit sous le contrôle d'un promoteur natif ou du promoteur 35S, pour PG R comme PG RAM, est aussi énigmatique. En effet, c'est jusqu'à 12 transformants issus d'évènements de transformation indépendants qui ont été observés, et aucun d'entre eux, hormis la construction 35S::eYFP-PG RAM PL, n'a présenté de marquage. Avec la transformation de plantes sauvage, ceci peut s'expliquer par la présence des protéines natives, qui pourrait perturber la production des protéines de fusion, surtout dans le cas des sur-expresses. Mais dans le cas de la transformation des mutants *pg r* et *pg ram* plutôt que des plantes sauvages, cette hypothèse n'ait pas vraisemblable. Néanmoins, un seul transformant a été obtenu lors de la transformation du mutant *pg r* par la construction *promPG R::PG R-eYFP*. Or suivant l'endroit où l'ADN-T est implanté, il se peut que la protéine de fusion ne soit pas ou soit peu exprimée. L'obtention d'autres transformants serait donc nécessaire. Par ailleurs, les protéines de fusion étant observées en transformation transitoire en feuilles de tabac, il semblerait qu'elles soient produites. La présence de marquage chez deux transformants 35S::eYFP-PG RAM PL issus d'évènements de transformation indépendants prouve également que cette construction est produite chez *A. thaliana*. De nouvelles tentatives seraient donc à réaliser afin d'obtenir les transformants désirés.



# Perspectives

Les perspectives de ces travaux de recherche peuvent être envisagées selon deux axes : d'une part poursuivre l'approfondissement des résultats obtenus, et d'autre part développer certaines pistes intéressantes, dans le but d'aller plus loin dans l'étude de PG R et de PG RAM.

## *Approfondissement des résultats obtenus*

### ➤ *Etude approfondie du rôle de PG R dans la croissance cellulaire*

Des résultats intéressants de l'implication de PG R dans le développement des racines et des hypocotyles ont été obtenus grâce à l'étude des sur-expresssieurs *PG R*. Cependant, dans la mesure où un seul de ces sur-expresssieurs présente un allongement des racines primaires plus important que le sauvage, d'autres lignées pourraient être étudiées. Cela confirmerait que PG R possède une fonction dans la croissance racinaire.

Il serait ensuite nécessaire de démontrer que la sur-expression de PG R induit une élongation cellulaire. Pour cela, la longueur des cellules d'hypocotyles étiolés sur-exprimant PG R serait mesurée, et comparée à celle du sauvage. Compte tenu de l'augmentation de la taille des hypocotyles des sur-expresssieurs *PG R*, on s'attend à ce que les cellules de ces hypocotyles soient plus allongées que celles du sauvage.

Afin de compléter ces résultats, l'allongement d'autres parties de la plante sur-exprimant *PG R* sera, une fois encore, comparé à celui du sauvage. Ces parties en question pourraient être celles qui expriment naturellement le gène *PG R*, tels que les feuilles, les poils absorbants, les siliques et les racines latérales. Par ailleurs, pour savoir si PG R pourrait être impliquée dans l'allongement des tubes polliniques, la présence d'un marquage GUS au niveau des tubes polliniques *in planta* des transformants *promPG R::GUS* pourrait être à nouveau étudié, le premier essai ayant été réalisé sur peu d'échantillons, et sur un seul transformant (voir [annexe 19](#)).

### ➤ *Implication de PG R dans le développement des racines latérales*

Nous avons également observé que la sur-expression de *PG R* provoquait une augmentation de la densité des racines latérales. PG R pourrait donc être impliquée dans l'initiation et/ou dans l'émergence des racines latérales. Afin de préciser ces informations, il serait intéressant de transformer les lignées sur-exprimant *PG R* avec la construction *DR5::GUS*, afin de voir si la sur-expression de *PG R* induit l'augmentation du nombre de pic d'auxine à l'intérieur de la racine primaire (Möller et al., 2017). Une telle augmentation pourrait signifier que PG R participe au détachement des cellules de la coiffe latérale, à l'origine des pics d'auxine à l'intérieur de la racine, et qui permettent l'initiation des primordia racinaires (Möller et al., 2017).

Par ailleurs, l'observation au microscope électronique cryogénique de l'émergence de racines latérales des sur-expresssieurs de PG R et du sauvage pourrait être réalisée, de la même



façon que Kumpf et al. (2013). Il est possible que l'ouverture des tissus de la racine primaire lors du passage de la racine émergente soit différente entre les deux fonds génétiques. En effet, la sur-expression de *PG R* pourrait induire une différence d'adhésion cellulaire.

➤ *Investigation du rôle de PG R dans la production de BLC*

Afin d'étudier l'implication de *PG R* dans le détachement des BLC, il serait nécessaire de comparer l'adhésion des BLC des racines des sur-expressesurs *PG R*, du mutant *pg r* et du sauvage. Kamiya et al. (2016) ont réussi à réaliser ce type d'observation au microscope confocal, sans détacher les racines de la gélose, ce qui permet de ne pas endommager le capuchon de BLC.

➤ *Recherche du rôle de PG RAM dans le développement racinaire*

Pour étudier la fonction de *PG RAM* *in vivo*, il serait crucial de posséder le sur-expresseur du gène *PG RAM*. Dans la mesure où les différentes tentatives d'obtention de transformants *35S::PG RAM* (PL) se sont révélées infructueuses, nous pourrions nous résoudre à étudier à la place les transformants *35S::eYFP-PG RAM* (PL) obtenus (deux lignées sont disponibles). La fusion à la protéine eYFP pourrait empêcher l'enzyme d'accomplir sa fonction, mais il est possible que cela ne soit pas le cas. Pour le vérifier, il faudrait comparer l'activité *PG* globale des sur-expressesurs par rapport au sauvage.

A l'aide de ces transformants, nous pourrions étudier le développement de la racine primaire et des racines latérales, en comparaison avec le sauvage. Si une différence de croissance racinaire est observée, il serait nécessaire de mesurer la taille des cellules de la zone de transition ainsi que la taille du RAM, afin d'établir si cette différence est due à l'expansion ou à la division cellulaire.

De même, si les sur-expressesurs de *PG RAM* présentent un phénotype d'allongement racinaire, mais pas les hypocotyles étiolés, cela tendrait à indiquer que *PG RAM* est spécifiquement impliquée dans un contexte méristématique, mais pas dans l'élongation cellulaire.

Par ailleurs, il serait intéressant de comparer l'organisation du RAM entre les sur-expressesurs *PG RAM* et le sauvage, en colorant les parois à l'iodure de propidium. Une expérience de ce type a été réalisée sur les mutants *pg ram* ainsi que sur le mutant *pg r*, mais aucune différence n'a été observée ([annexe 21](#)). Dans la mesure où les mutants *pg r* et *pg ram* ne présentent pas de phénotype d'allongement racinaire, ce résultat n'est pas surprenant. Mais il est possible qu'en revanche la structure du RAM des sur-expressesurs de *PG RAM* soit modifiée.

➤ *Modification de la paroi par PG R et PG RAM*

Afin d'établir un lien entre les phénotypes des sur-expressesurs *PG R* et potentiellement ceux de *PG RAM* avec la modification de la paroi, celle-ci pourrait être étudiée selon différentes approches, en comparaison avec le sauvage.



Ainsi, la rigidité de la paroi des hypocotyles étiolés des sur-expresseurs et du sauvage pourrait être mesurée par AFM ( Peaucelle et al., 2015; Rugar and Hansa, 1990). Il serait également intéressant de comparer la rigidité de la zone d'élongation des racines des sur-expresseurs *PG R* à celle du sauvage.

Par ailleurs, le DM des pectines des hypocotyles étiolés et des racines (dans la zone de division et la zone d'élongation racinaire, pour les lignées sur-exprimant *PG RAM* et *PG R* respectivement) pourrait être analysé par FTIR (Fourier Transform InfraRed ; McCann et al., 1997).

L'étude du DM des HG pourrait être complétée par l'utilisation des sondes COS<sup>488</sup> et OG<sup>488</sup>, mises au point par l'équipe de Willats (Mravec et al., 2014, 2017). La sonde COS<sup>488</sup> a la capacité de se lier aux HG faiblement méthylestérifiés. Ce type de sonde, contrairement aux anticorps, à l'avantage de pénétrer à l'intérieur des tissus et permettent une imagerie en temps réelle. Son utilisation est également simple et rapide (Mravec et al., 2014). Quant à la sonde OG<sup>488</sup>, celle-ci est capable de se lier aux HG *via* le calcium. Elles permettent donc d'identifier les HG aptes à former des structures en boîtes à œuf en présence de calcium. La sonde OG<sup>488</sup> aurait cependant des capacités de pénétration dans les tissus inférieures à la sonde COS<sup>488</sup>, en raison du DP important de la sonde OG<sup>488</sup> (Mravec et al., 2017).

Des essais ont déjà été réalisés avec ces sondes sur racines entières et sur coupes. Comme attendu, la sonde OG<sup>488</sup> n'est pas capable de pénétrer les tissus de la racine, contrairement à la sonde COS<sup>488</sup>. Les résultats préliminaires obtenus avec la sonde COS<sup>488</sup> sur racines fraîches sont cohérents avec ceux de Dolan et al. (1993) : la paroi des cellules de la zone de division ne semble pas posséder d'HG faiblement méthylestérifiés, contrairement à celle de la columelle et à la zone d'élongation. La paroi des cellules du RAM serait donc composé d'HG méthylestérifiés ([annexe 22](#)). Cette image est cependant la seule que nous possédons, ces résultats sont donc à prendre en considération avec prudence. En effet, l'intensité de marquage de la sonde n'était pas toujours aussi importante, et la sonde semblait parfois avoir des difficultés à pénétrer la racine. Le marquage observé au niveau de la zone d'élongation de la racine de la figure en [annexe 22](#) est donc peut être due à une courbure potentielle de la racine, et ne serait qu'un marquage superficiel. Par ailleurs, aucune différence de marquage n'a été observée entre le sauvage et les mutants *pg ram*, lors de cette observation. Quant à l'utilisation de la sonde OG<sup>488</sup> sur coupe, les résultats préliminaires obtenus ne sont pas très évidents. La sonde semble présenter un marquage aspécifique, puisque sur certaines coupes, le cytoplasme des cellules présente un marquage. De plus, la qualité des coupes n'est pas suffisante pour pouvoir observer des résultats fiables. Cette partie est donc toujours à l'étude.

➤ *Analyse de la localisation membranaire de PG RAM grâce à une ancre GPI putative*

Afin de confirmer ou d'infirmer la liaison de PG RAM à la membrane *via* une ancre GPI, il faudrait observer à nouveau les protoplastes de la construction 35S::eYFP-PG RAM. En effet, deux lignées issues d'évènements de transformation indépendants ont été obtenues, et l'une des deux possède un marquage au niveau des feuilles, rendant l'observation d'un marquage





au niveau des protoplastes possible. Il est également possible de réaliser des protoplastes à partir de feuilles tabac transformées de manière transitoire (De Caroli et al., 2011), par les constructions 35S::eYFP-PG RAM PL ou T.

Si PG RAM est observée au niveau de la membrane plasmique des protoplastes, il serait intéressant de compléter cette étude par l'extraction séquentielle et séparation de phase des protéines, avec ou sans traitement préliminaire à la phospholipase C. Les protéines liées à la membrane par une ancre GPI sont retrouvées dans la phase détergent, mais avec un traitement préalable à la phospholipase C, elles sont retrouvées dans la phase aqueuse (De Caroli et al., 2011; Lisanti et al., 1990; Sedbrook, 2002).

### *Poursuite de l'étude de PG R et de PG RAM*

#### *➤ Contrôle de la transcription des gènes PG R et PG RAM par PLT2*

Nous avons observé que le facteur de transcription PLT2 induisait la transcription du gène *PG RAM* et réprimait l'expression de *PG R*, mais nous n'avons pas vu de modification des patrons d'expression GUS de ces gènes au niveau des racines transférées sur auxine ou NPA. Or la transcription de *PLT2* est dirigée par l'auxine (Aida et al., 2004). Il serait par conséquent intéressant de quantifier la transcription des gènes *PG R*, *PG RAM*, et *PLT2* dans des racines de plantules transférées sur milieux supplémentés en auxine, NPA en comparaison au milieu contrôle. Ceci permettrait de confirmer que les gènes *PG RAM* et *PG R* font partie des gènes contrôlés par des facteurs PLT, mais de façon indépendante de l'auxine (Santuari et al., 2016).

#### *➤ Etude du lien entre les WAK, PG R et PG RAM*

Afin d'établir s'il existe véritablement un lien entre *PG R*, *PG RAM* et les WAK, différentes expériences seraient à réaliser.

Pour savoir si *PG R* active la signalisation médiée par les WAK lors de la croissance racinaire, il serait intéressant de quantifier par RT-qPCR le niveau de transcription de l'invertase *AtvacINV1* des racines des sur-expresses de *PG R*, du mutant *pg r* et du sauvage. En effet, cette invertase est transcrite grâce à la signalisation par les WAK, dans le contexte d'élongation cellulaire (Kohorn et al., 2006). Si *PG R* active la signalisation médiée par les WAK afin de promouvoir la croissance cellulaire, l'invertase *AtvacINV1* devrait être sur-exprimée lors de la sur-expression de *PG R*, et sous-exprimée chez *pg r*. Une expérience identique pourrait être réalisée pour *PG RAM*. Cependant, il n'est pas assuré d'obtenir un résultat valable, puisque l'implication de l'invertase *AtvacINV1* dans la division cellulaire n'a encore jamais été décrite. De même, malgré le fait que l'expression de *WAK2* soit visible dans le RAM, son implication dans le fonctionnement du méristème et la voie de signalisation éventuelle qu'il active n'ont pas encore été caractérisées.

Dans le contexte de la défense des plantes, il a été démontré que les protéines WAK permettaient d'induire la transcription du gène *PHYTOALEXIN DEFICIENT3 (PAD3)* via la fixation d'OG (Brutus et al., 2010; Ferrari et al., 2007). Le gène *PAD3* code la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de la camalexine. Ce gène serait nécessaire à la résistance des



plantes à *Botrytis cinerea* induite par les OG. La camalexine est en effet une phytoalexine, permettant la défense des plantes face à certains pathogènes (Ferrari et al., 2007; Glazebrook and Ausubel, 1994; Schuhegger et al., 2006). Pour établir si les OG produits par l'activité de PG R permettent de stimuler les défenses des plantes *via* les WAK, il pourrait donc être intéressant de quantifier les transcrits du gène *PAD3* au niveau de feuilles blessées du mutant *pg r*, des sur-expressesurs *PG R* et du sauvage. Si PG R permet d'augmenter le signal de défense *via* la production d'OG, la transcription de *PAD3* devrait augmenter chez les sur-expressesurs de *PG R* par rapport au sauvage. Le niveau de transcription de *PAD3* devrait en revanche être inférieur chez *pg r* par rapport au sauvage.

Afin d'étudier le lien potentiel entre PG RAM et les WAK, il serait intéressant de comparer le patron d'expression de *PG RAM* suivant différentes conditions. En effet, la zone d'expression GUS de *WAK1* est plus étendue suite à un traitement de jeunes plantules à l'acide salicylique. Celle de *WAK2* est quant à elle plus étendue suite à des blessures sur de jeunes feuilles, par rapport à des blessures sur des feuilles plus âgées (Wagner and Kohorn, 2001). Il serait donc intéressant de réaliser des expériences identiques avec les transformants *promPG RAM::GUS*. Si la zone d'expression de *PG RAM* est plus étendue, de façon similaire à *WAK1* et/ou à *WAK2*, cela pourrait indiquer que PG RAM aurait un lien avec *WAK1* et *WAK2*.

Pour savoir si la transcription des gènes *PG R* et *PG RAM* est activée par les WAK, il serait nécessaire de comparer le niveau de transcription des gènes *PG R* et *PG RAM* entre des plantes sauvage et les plantes exprimant des ARN-anti sens des différents gènes *WAK* (Lally et al., 2001; Wagner and Kohorn, 2001).

Pour compléter ces résultats, il serait nécessaire de transformer les plantes *promPG RAM::GUS* par la construction permettant de produire des ARN-antisens du gène *WAK2* par un système inductible à la dexaméthasone. Il suffirait alors d'observer la zone d'expression de *PG RAM* au niveau du RAM, avec ou sans transfert sur dexaméthasone. Si la transcription du gène *PG RAM* est activée *via* *WAK2*, la coloration GUS devrait être visible sans dexaméthasone, mais pas sur dexaméthasone.

En ce qui concerne PG R, dans la mesure où *WAK1* semble impliqué dans la transduction du signal de défense suite à sa liaison aux OG (Brutus et al., 2010), il pourrait être intéressant de transformer les plantes exprimant la construction *promPG R::GUS* par une construction permettant de produire de façon inductible des ARN-antisens du gène *WAK1*. Ainsi, nous pourrions comparer l'expression de *PG R* suite à une blessure au niveau des feuilles de rosette, avec ou sans transfert des plantules sur dexaméthasone avant blessure. Si l'expression de *PG R* est visible autour des blessures en condition contrôle, mais pas sur dexaméthasone, cela pourrait indiquer que la transcription du gène *PG R* est activée *via* la signalisation médiée par *WAK1*.

Pour finir, si un lien entre les protéines WAK et PG R est démontré en cas de blessure abiotique, il serait intéressant d'étudier ce lien dans un contexte de blessure biotique, notamment en utilisant *Botrytis cinerea*. En effet, il a été démontré que les OG permettaient



d'augmenter la résistance d'*A. thaliana* à *B. cinerea*, notamment par l'expression du gène *PAD3*, et grâce à la signalisation de WAK1 (Brutus et al., 2010). Il est possible que les sur-expresssurs de *PG R* et le mutant *pg r* induisent respectivement une augmentation et une diminution de la résistance à *B. cinerea*, par rapport au sauvage.

➤ *Création de doubles mutants pme2-pg ram et pme2-pg r*

Dans la mesure où les gènes *PG R* et *PG RAM* sont situés à des loci très rapprochés du chromosome 3 d'*A. thaliana*, nous n'avons pas tenté d'obtenir un double mutant pour ces deux gènes.

En revanche, le gène *PG RAM* présente un patron d'expression proche de celui du gène *PME2* (*AT1G53830*) au niveau des primordia, et au niveau des tissus conducteurs des feuilles (Thèse de Ludivine Hocq, 2015). Par ailleurs, les deux gènes étant situés sur des chromosomes différents, l'obtention d'un double mutant est plus aisée. La procédure pour obtenir ce double mutant a donc été initiée. Il nous permettrait d'étudier le rôle de la déméthylestérfication des HG et de leur dégradation lors du développement des primordia racinaire.

Par ailleurs, le double mutant *pme2-pg r* pourrait être réalisé, dans la mesure où ces deux gènes sont exprimés dans la zone d'élongation de la racine, et semblent impliqués dans l'élongation cellulaire (Thèse de Ludivine Hocq, 2015). Le double mutant *pme2-pg r* pourrait nous permettre d'accroître les phénotypes des simples mutants. Si tel est le cas, il est possible que *PME2* et *PG R* interviennent en synergie au niveau de la zone d'élongation.

➤ *Etude du lien entre PG RAM et l'infection par des nématodes*

En collaboration avec l'équipe de Shinichiro Sawa (Université de Kumamoto, Japon), nous souhaitons étudier la relation entre l'activité de *PG RAM* au sein de la paroi et l'infection des racines d'*A. thaliana* par le nématode *Heterodera glycines*. En effet, Shinichiro Sawa et son équipe ont observé que certaines *PG*, dont *PG RAM*, seraient sur-exprimées en réponse à l'infection par le nématode (résultats non publiés).

La modification de la paroi serait à la fois une conséquence de l'infection, mais servirait également au parasitisme du nématode. Des enzymes de dégradation de la paroi seraient effectivement sécrétées par celui-ci, afin qu'il puisse pénétrer les racines. D'autre part, l'effecteur CBP (cellulose binding protein) permettrait d'augmenter l'activité de la protéine *PME3*, menant à la diminution du DM des HG. L'accès des enzymes de dégradation de la paroi aux HG serait alors facilité. Ce processus serait nécessaire au développement du syncytium, dont le nématode se nourrit. Par ailleurs, les lignées transgéniques sur-exprimant *PME3* présentent une augmentation de la sensibilité au nématode *Heterodera schachtii*, alors qu'au contraire le mutant *pme3 y* serait plus résistant (Hewezi et al., 2008).

Des résultats préliminaires obtenus par l'équipe de Shinichiro Sawa indiquent une diminution significative du nombre de galls formées par le nématode *Heterodera glycines* sur les racines des mutants *pg ram1* et *pg ram3* par rapport au sauvage (S. Sawa, communication personnelle). Cela indiquerait que les mutants *pg ram* seraient plus résistants face au



nématode. Ces résultats, ainsi que la sur-expression du gène *PG RAM* suite à l'infection, suggèrent que tout comme *PME3*, *PG RAM* pourrait être sur-exprimé *via* un effecteur du nématode, dans but de développer le syncytium.

Il serait par ailleurs intéressant de comparer la croissance racinaire du sauvage et des mutants *pg ram* infectés. En effet, les racines exprimant le facteur CBP, permettant la sur-expression de *PME3*, sont plus allongées que celles des plantes sauvages. Pourtant, l'augmentation de l'allongement racinaire n'est pas associée à une augmentation de la taille des syncytia, suggérant que le programme développemental de la formation des syncytia est indépendant de celui du développement racinaire (Hewezi et al., 2008). Si le gène *PG RAM* est sur-exprimé suite à une infection, il est possible qu'il entraîne également un allongement des racines, grâce à sa participation présumée dans le fonctionnement du RAM. Il a en effet été démontré que certains effecteurs de nématodes sont capables d'induire une prolifération des cellules (Huang et al., 2006). Par exemple, les effecteurs de *Globodera rostochiensis* induisent la prolifération de protoplastes de feuilles de tabac, ainsi que de cellules mononucléées du sang humain (Goverse et al., 1999). Les mécanismes intervenant dans la division seraient toutefois différents, puisque ces cellules ne possèdent pas de paroi.

Pour finir, si *PG RAM* est vraiment sur-exprimée lors d'une infection par un nématode, afin de permettre la formation des syncytia, il est probable que tout comme *PME3*, son expression soit régulée grâce à un effecteur émis par le nématode, lors de son infection. Il serait alors intéressant de l'identifier.





# Bibliographie

Adler, J. (1973). A Method for Measuring Chemotaxis and Use of the Method to Determine Optimum Conditions for Chemotaxis by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* *74*, 77–91.

Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.-S., Amasino, R., and Scheres, B. (2004). The *PLETHORA* Genes Mediate Patterning of the *Arabidopsis* Root Stem Cell Niche. *Cell* *119*, 109–120.

Ambrose, C., DeBono, A., and Wasteneys, G. (2013). Cell Geometry Guides the Dynamic Targeting of Apoplastic GPI-Linked Lipid Transfer Protein to Cell Wall Elements and Cell Borders in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* *8*, e81215.

Anderson, C.T., Carroll, A., Akhmetova, L., and Somerville, C. (2010). Real-Time Imaging of Cellulose Reorientation during Cell Wall Expansion in *Arabidopsis* Roots. *PLANT Physiol.* *152*, 787–796.

Aronson, J.M., Cooper, B.A., and Fuller, M.S. (1967). Glucans of Oomycete Cell Walls. *Science* *155*, 332–335.

Baldwin, L., Domon, J.-M., Klimek, J.F., Fournet, F., Sellier, H., Gillet, F., Lejeune-Hénaut, I., Carpita, N.C., and Rayon, C. (2014). Structural alteration of cell wall pectins accompanies pea development in response to cold. *Phytochemistry* *104*, 37–47.

Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* *22*, 87–108.

Baskin, T.I. (2005). Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 203–222.

Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., and Mayo, M.A. (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* *321*, 446–449.

Bennett, T., and Scheres, B. (2010). Root Development—Two Meristems for the Price of One? In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 67–102.

Bergmans, H.E.N. (1981). Transformation in *Escherichia coli*: Stages in the Process. *J BACTERIOL* *146*, 7.

Bernard, P., and Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* *226*, 735–745.

Bonghi, C., Rascio, N., Ramina, A., and Casadoro, G. (1992). Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. *Plant Mol. Biol.* *20*, 839–848.

Bonnin, E., Le Goff, A., van Alebeek, G.-J.W.M., Voragen, A.G.J., and Thibault, J.-F. (2003). Mode of action of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase towards acetylated pectin. *Carbohydr. Polym.* *52*, 381–388.

Bootten, T.J. (2004). Solid-state <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan-cellulose interactions in the cell wall. *J. Exp. Bot.* *55*, 571–583.

Bootten, T.J., Harris, P.J., Melton, L.D., and Newman, R.H. (2009). Solid-State <sup>13</sup>C NMR Study of a Composite of Tobacco Xyloglucan and *Gluconacetobacter xylinus* Cellulose: Molecular Interactions between the Component Polysaccharides. *Biomacromolecules* *10*, 2961–2967.

Borner, G.H.H. (2003). Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in *Arabidopsis*. A Proteomic and Genomic Analysis. *PLANT Physiol.* *132*, 568–577.

Bouton, S. (2002). *QUASIMODO1* Encodes a Putative Membrane-Bound Glycosyltransferase Required for Normal Pectin Synthesis and Cell Adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* *14*, 2577–2590.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.

Brady, C., Macalpine, G., McGlasson, W., and Veda, Y. (1982). Polygalacturonase in Tomato Fruits and the Induction of Ripening. *Aust. J. Plant Physiol.* *9*, 171.

Brecht, J.K., and Huber, D.J. (1988). Products Released from Enzymically Active Cell Wall Stimulate Ethylene Production and Ripening in Preclimacteric Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruit. *88*, 5.

Broxterman, S.E., and Schols, H.A. (2018). Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. *Carbohydr. Polym.* *192*, 263–272.

Brummell, D.A., and Harpster, M.H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. In *Plant Cell Walls*, N.C. Carpita, M. Campbell, and M. Tierney, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 311–340.

Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 9452–9457.

Buescher, R.W., Sistrunk, W.A., Tigchelaar, E.C., and Ng, T.J. (1976). Softening, pectolytic activity and storage life of *rin* and *nor* tomato hybrids. *11*, 603–604.

Burton, R.A., Gidley, M.J., and Fincher, G.B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 724–732.

Bush, M.S., Marry, M., Huxham, M.I., Jarvis, M.C., and McCann, M.C. (2001). Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta* *213*, 869–880.

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

Campbell, A.D., and Labavitch, J.M. (1991). Induction and Regulation of Ethylene Biosynthesis and Ripening by Pectic Oligomers in Tomato Pericarp Discs. *PLANT Physiol.* *97*, 706–713.

Cárdenas-Pérez, S., Chanona-Pérez, J.J., Güemes-Vera, N., Cybulska, J., Szymanska-Chargot, M., Chylinska, M., Koziół, A., Gawkowska, D., Pieczywek, P.M., and Zdunek, A. (2018). Structural, mechanical and enzymatic study of pectin and cellulose during mango ripening. *Carbohydr. Polym.* *196*, 313–321.

Carpita, N., and Gibeaut, D. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* *3*, 1–30.

Castillon, G.A., Aguilera-Romero, A., Manzano-Lopez, J., Epstein, S., Kajiwarra, K., Funato, K., Watanabe, R., Riezman, H., and Muñiz, M. (2011). The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2924–2936.

Cervone, F., Ausubel, F.M., and De Lorenzo, G. (2015). Enhancing immunity by engineering DAMPs. *Oncotarget* *6*, 28523–28524.

Chatterjee, S., and Mayor, S. (2001). The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 1969–1987.

Chebli, Y., and Geitmann, A. (2017). Cellular growth in plants requires regulation of cell wall biochemistry. *Curr. Opin. Cell Biol.* *44*, 28–35.

Chivasa, S., Ndimba, B.K., Simon, W.J., Robertson, D., Yu, X.-L., Knox, J.P., Bolwell, P., and Slabas, A.R. (2002). Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* *23*, 1754.

Christensen, T.M.I.E., Nielsen, J.E., and Mikkelsen, J.D. (1996). Isolation, characterization and immuno localization of orange fruit acetyl esterase. In *Progress in Biotechnology*, (Elsevier), pp. 723–730.

Chun, J.-P., and Huber, D.J. (1998). Polygalacturonase-Mediated Solubilization and Depolymerization of Pectic Polymers in Tomato Fruit Cell Walls: Regulation by pH and Ionic Conditions. *Plant Physiol.* *117*, 1293–1299.

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

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *16*, 735–743.

Coenen, G.J., Bakx, E.J., Verhoef, R.P., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2007). Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydr. Polym.* *70*, 224–235.

- Contreras Esquivel, J.C., and Voget, C.E. (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J. Biotechnol.* *110*, 21–28.
- Cosgrove, D.J. (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 171–201.
- Cosgrove, D.J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* *407*, 321.
- Cosgrove, D.J. (2001a). Wall Structure and Wall Loosening. A Look Backwards and Forwards. *Plant Physiol.* *125*, 131–134.
- Cosgrove, D.J. (2001b). Plant cell walls : Wall-associated kinases and cell expansion. *Curr. Biol.* *11*, R558–R559.
- Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 850–861.
- Cosgrove, D.J. (2014). Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr. Opin. Plant Biol.* *22*, 122–131.
- Cosgrove, D.J. (2016). Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000Research* *5*, 1–13.
- Daas, P.J.H., Boxma, B., Hopman, A.M.C.P., Voragen, A.G.J., and Schols, H.A. (2001). Nonesterified Galacturonic Acid Sequence Homology of Pectins. *Biopolymers* *58*, 1–8.
- Daher, F.B., and Braybrook, S.A. (2015). How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Front. Plant Sci.* *6*.
- Darvill, A.G., McNeil, M., and Albersheim, P. (1978). Structure of Plant Cell Walls: VIII. A new pectic polysaccharide. *62*, 5.
- De Caroli, M., Lenucci, M.S., Di Sansebastiano, G.-P., Dalessandro, G., De Lorenzo, G., and Piro, G. (2011). Protein trafficking to the cell wall occurs through mechanisms distinguishable from default sorting in tobacco: Trafficking to the cell wall. *Plant J.* *65*, 295–308.
- Decreux, A., and Messiaen, J. (2005). Wall-associated Kinase WAK1 Interacts with Cell Wall Pectins in a Calcium-induced Conformation. *Plant Cell Physiol.* *46*, 268–278.
- Decreux, A., Thomas, A., Spies, B., Brasseur, R., Cutsem, P., and Messiaen, J. (2006). *In vitro* characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. *Phytochemistry* *67*, 1068–1079.
- Delmas, F., Seveno, M., Northey, J.G.B., Hernould, M., Lerouge, P., McCourt, P., and Chevalier, C. (2008). The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. *J. Exp. Bot.* *59*, 2639–2647.
- Delmer, D.P. (1999). Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Biol.* *50*, 245–276.
- Deng, Y., Wang, W., Li, W.-Q., Xia, C., Liao, H.-Z., Zhang, X.-Q., and Ye, D. (2010). *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 2*, Encoding a Sialyltransferase-like Protein, is Required for Normal Pollen Germination and Pollen Tube Growth in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* *52*, 829–843.

Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. (2008). Activation of Defense Response Pathways by OGs and Flg22 Elicitors in *Arabidopsis* Seedlings. *Mol. Plant* *1*, 423–445.

Derbyshire, P., McCann, M.C., and Roberts, K. (2007). Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol.* *7*, 31.

Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zobotina, O.A., and Hong, M. (2011). Structure and Interactions of Plant Cell-Wall Polysaccharides by Two- and Three-Dimensional Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR. *Biochemistry* *50*, 989–1000.

Dixit, S., upadhyay, S., Singh, H., Pandey, B., Chandrashekar, K., and Verma, P. (2013). Pectin Methylesterase of *Datura* species, purification, and characterization from *Datura stramonium* and its application. *Plant Signal. Behav.* *8*, e25681.

Dolan, L., and Davies, J. (2004). Cell expansion in roots. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 33–39.

Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* *119*, 71–84.

Dolan, L., Linstead, P., and Roberts, K. (1997). Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *48*, 713–720.

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

Driouich, A., Follet-Gueye, M.-L., Vitré-Gibouin, M., and Hawes, M. (2013). Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* *16*, 489–495.

Driscoll, R.C., and Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front. Plant Sci.* *6*.

Du, Y., and Scheres, B. (2017). PLETHORA transcription factors orchestrate de novo organ patterning during *Arabidopsis* lateral root outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 11709–11714.

Dünser, K., and Kleine-Vehn, J. (2015). Differential growth regulation in plants—the acid growth balloon theory. *Curr. Opin. Plant Biol.* *28*, 55–59.

Durand, C., Vitré-Gibouin, M., Follet-Gueye, M.L., Duponchel, L., Moreau, M., Lerouge, P., and Driouich, A. (2009). The Organization Pattern of Root Border-Like Cells of *Arabidopsis* Is Dependent on Cell Wall Homogalacturonan. *PLANT Physiol.* *150*, 1411–1421.

Eichler, J., and Adams, M.W.W. (2005). Posttranslational Protein Modification in Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *69*, 393–425.

Eisenhaber, B., Bork, P., and Eisenhaber, F. (1999). Prediction of Potential GPI-modification Sites in Proprotein Sequences. *J. Mol. Biol.* *292*, 741–758.

Ezaki, N., Kido, N., Takahashi, K., and Katou, K. (2005). The Role of Wall Ca<sup>2+</sup> in the Regulation of Wall Extensibility During the Acid-induced Extension of Soybean Hypocotyl Cell Walls. *Plant Cell Physiol.* *46*, 1831–1838.

Fankhauser, N., and Maser, P. (2005). Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics* *21*, 1846–1852.

Federici, L., Caprari, C., Mattei, B., Savino, C., Di Matteo, A., De Lorenzo, G., Cervone, F., and Tsernoglou, D. (2001). Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 13425–13430.

Feiz, L., Irshad, M., Pont-Lezica, R.F., Canut, H., and Jamet, E. (2006). Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Methods* *13*.

Feofilova, E.P. (2010). The fungal cell wall: Modern concepts of its composition and biological function. *Microbiology* *79*, 711–720.

Ferguson, M.A.J., Hart, G.W., and Kinoshita, T. (2017). Chapter 12 : Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In *Essentials of Glycobiology*, (Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors), pp. 1–13.

Ferrari, S. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* *4*.

Ferrari, S., Galletti, R., Vairo, D., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2006). Antisense Expression of the *Arabidopsis thaliana* *AtPGIP1* Gene Reduces Polygalacturonase-Inhibiting Protein Accumulation and Enhances Susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *19*, 931–936.

Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* Induced in *Arabidopsis* by Elicitors Is Independent of Salicylic Acid, Ethylene, or Jasmonate Signaling But Requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *PLANT Physiol.* *144*, 367–379.

Frankova, L., and Fry, S.C. (2013). Biochemistry and physiological roles of enzymes that “cut and paste” plant cell-wall polysaccharides. *J. Exp. Bot.* *64*, 3519–3550.

Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2007). Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *EMBO J.* *26*, 3879–3887.

Fu, X., and Harberd, N.P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* *421*, 740–743.

Fujita, M., and Kinoshita, T. (2012). GPI-anchor remodeling: Potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1821*, 1050–1058.

Fujita, M., Watanabe, R., Jaensch, N., Romanova-Michaelides, M., Satoh, T., Kato, M., Riezman, H., Yamaguchi, Y., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2011). Sorting of GPI-anchored

proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI. *J. Cell Biol.* **194**, 61–75.

Furt, F., Simon-Plas, F., Mongrand (auth.), S., Murphy, A.S., Schulz, B., and Peer (eds.), W. (2011). Posttranslational Modifications of Plasma Membrane Proteins and Their Implications for Plant Growth and Development. In *The Plant Plasma Membrane*, (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), pp. 109–128.

Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., and Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* **449**, 1053–1057.

Gaspar, Y., Johnson, K.L., McKenna, J.A., Bacic, A., and Schultz, C.J. (2001). The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. In *Plant Cell Walls*, N.C. Carpita, M. Campbell, and M. Tierney, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 161–176.

Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.-R., and Hänsch, R. (2009). New GATEWAY vectors for High Throughput Analyses of Protein–Protein Interactions by Bimolecular Fluorescence Complementation. *Mol. Plant* **2**, 1051–1058.

Geitmann, A., and Ortega, J.K.E. (2009). Mechanics and modeling of plant cell growth. *Trends Plant Sci.* **14**, 467–478.

Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., and Hofte, H. (1997). Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*. *PLANT Physiol.* **114**, 295–305.

Ghuysen, J.-M., and Hakenbeck, R. (1994). *Bacterial Cell Wall* (Amsterdam-London-New York-Tokyo: Elsevier).

Gillmor, C.S., Lukowitz, W., Brininstool, G., Sedbrook, J.C., Hamann, T., Poindexter, P., and Somerville, C. (2005). Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins Are Required for Cell Wall Synthesis and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *PLANT CELL ONLINE* **17**, 1128–1140.

Glazebrook, J., and Ausubel, F.M. (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 8955–8959.

Gou, J.-Y., Miller, L.M., Hou, G., Yu, X.-H., Chen, X.-Y., and Liu, C.-J. (2012). Acetyltransferase-Mediated Deacetylation of Pectin Impairs Cell Elongation, Pollen Germination, and Plant Reproduction. *Plant Cell* **24**, 50–65.

Goverse, A., van der Voort, J.R., van der Voort, C.R., Kavelaars, A., Smant, G., Schots, A., Bakker, J., and Helder, J. (1999). Naturally Induced Secretions of the Potato Cyst Nematode Co-stimulate the Proliferation of Both Tobacco Leaf Protoplasts and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **12**, 872–881.

Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., and Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* **32**, 195–198.

Green III, F., Clausen, C.A., and Highley, T.L. (1989). Adaptation of the Nelson-Somogyi Reducing-Sugar Assay to a Microassay Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.* 3.

Grieneisen, V.A., Xu, J., Marée, A.F.M., Hogeweg, P., and Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449, 1008–1013.

Gu, C., Wang, L., Wang, W., Zhou, H., Ma, B., Zheng, H., Fang, T., Ogutu, C., Vimolmangkang, S., and Han, Y. (2016). Copy number variation of a gene cluster encoding endopolygalacturonase mediates flesh texture and stone adhesion in peach. *J. Exp. Bot.* 67, 1993–2005.

Gummadi, S.N., and Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process Biochem.* 38, 987–996.

Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., and Van Wuytswinkel, O. (2008). Towards a Systematic Validation of References in Real-Time RT-PCR. *Plant Cell Online* 20, 1734–1735.

Gutierrez, R., Lindeboom, J.J., Paredez, A.R., Emons, A.M.C., and Ehrhardt, D.W. (2009). *Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nat. Cell Biol.* 11, 797–806.

Hasunuma, T., Fukusaki, E., and Kobayashi, A. (2004). Expression of fungal pectin methylesterase in transgenic tobacco leads to alteration in cell wall metabolism and a dwarf phenotype. *J. Biotechnol.* 111, 241–251.

Hawes, M.C., and Lin, H.-J. (1990). Correlation of Pectolytic Enzyme Activity with the Programmed Release of Cells from Root Caps of Pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* 94, 1855–1859.

Hawes, M.C., Gunawardena, U., Miyasaka, S., and Zhao, X. (2000). The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci.* 5, 128–133.

Heidstra, R. (2004). Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev.* 18, 1964–1969.

Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Carbohydr. Glycobiol.* 291, 2364–2369.

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. *42*, 819–832.

Helms, J.B., and Zurzolo, C. (2004). Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5, 247–254.

Herron, S.R., Benen, J.A.E., Scavetta, R.D., Visser, J., and Jurnak, F. (2000). Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8762–8769.



Hewezi, T., Howe, P., Maier, T.R., Hussey, R.S., Mitchum, M.G., Davis, E.L., and Baum, T.J. (2008). Cellulose Binding Protein from the Parasitic Nematode *Heterodera schachtii* Interacts with *Arabidopsis* Pectin Methylesterase: Cooperative Cell Wall Modification during Parasitism. *PLANT CELL ONLINE* 20, 3080–3093.

Hobson, G.E. (1965). The Firmness of Tomato Fruit in Relation to Polygalacturonase Activity. *J. Hortic. Sci.* 40, 66–72.

Hocq, L., Pelloux, J., and Lefebvre, V. (2017). Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. *Trends Plant Sci.* 22, 20–29.

Höfte, H., Peaucelle, A., and Braybrook, S. (2012). Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. *Front. Plant Sci.* 3.

Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G., Villarroel, R., et al. (1980). The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* 3, 212–230.

Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., and Hussey, R.S. (2006). A Root-Knot Nematode Secretory Peptide Functions as a Ligand for a Plant Transcription Factor. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 463–470.

Ishii, T. (1997). O-Acetylated Oligosaccharides from Pectins of Potato Tuber Cell Walls. *Plant Physiol.* 113, 1265–1272.

Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M.A., Darvill, A., and Albersheim, P. (1999). The Plant Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II Self-assembles into a Covalently Cross-linked Dimer. *J. Biol. Chem.* 274, 13098–13104.

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

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

Jacob, N., Ashapoorna, C., and Prema, P. (2008). Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresour. Technol.* 99, 6697–6701.

Jarsch, I.K., Konrad, S.S.A., Stratil, T.F., Urbanus, S.L., Szymanski, W., Braun, P., Braun, K.-H., and Ott, T. (2014). Plasma Membranes Are Subcompartmentalized into a Plethora of Coexisting and Diverse Microdomains in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 26, 1698–1711.

Jarvis, M.C. (1992). Control of thickness of collenchyma cell walls by pectins. *Planta* 187.

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

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* *6*, 3901–3907.

Johnson, K.L., Cassin, A.M., Lonsdale, A., Wong, G.K.-S., Soltis, D.E., Miles, N.W., Melkonian, M., Melkonian, B., Deyholos, M.K., Leebens-Mack, J., et al. (2017). Insights into the Evolution of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins from 1000 Plant Transcriptomes. *Plant Physiol.* *174*, 904–921.

Jolie, R.P., Duvetter, T., Van Loey, A.M., and Hendrickx, M.E. (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydr. Res.* *345*, 2583–2595.

Jones, L., Seymour, G.B., and Knox, J.P. (1997). Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1- $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galactan. *Plant Physiol.* *113*, 1405–1412.

Jones, L., Seymour, G.B., and Knox, J.P. (2018). Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1- $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galactan. *8*.

Kalaitzis, P., Solomos, T., and Tucker, M.L. (1997). Three Different Polygalacturonases Are Expressed in Tomato Leaf and Flower Abscission, Each with a Different Temporal Expression Pattern. *Plant Physiol.* *113*, 1303–1308.

Kamiya, M., Higashio, S.-Y., Isomoto, A., Kim, J.-M., Seki, M., Miyashima, S., and Nakajima, K. (2016). Control of root cap maturation and cell detachment by BEARSKIN transcription factors in *Arabidopsis*. *Development* *143*, 4063–4072.

Kanai, M., Nishimura, M., and Hayashi, M. (2010). A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5: Peroxisomal ABC transporter promotes germination. *Plant J.* no-no.

Kästner, J., von Knorre, D., Himanshu, H., Erb, M., Baldwin, I.T., and Meldau, S. (2014). Salicylic Acid, a Plant Defense Hormone, Is Specifically Secreted by a Molluscan Herbivore. *PLoS ONE* *9*, e86500.

Kerstens, S., Decraemer, W.F., and Verbelen, J.-P. (2001). Cell Walls at the Plant Surface Behave Mechanically Like Fiber-Reinforced Composite Materials. *PLANT Physiol.* *127*, 381–385.

Kjellbom, P., Snogerup, L., Stohr, C., Reuzeau, C., McCabe, P.F., and Pennell, R.I. (1997). Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins. *Plant J.* *12*, 1189–1196.

Kleinboelting, N., Huet, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., and Weisshaar, B. (2012). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res.* *40*, D1211–D1215.

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

Knox, J.P. (1997). The use of Antibodies to Study the Architecture and Developmental Regulation of Plant Cell Walls. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 79–120.

Knox, J.P., Linstead, P., King, J., Cooper, C., and Roberts, K. (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* **181**.

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

Kobayashi, M., Kouzu, N., Inami, A., Toyooka, K., Konishi, Y., Matsuoka, K., and Match, T. (2011). Characterization of *Arabidopsis* CTP:3-Deoxy-d-manno-2-Octulosonate Cytidylyltransferase (CMP-KDO synthetase), the Enzyme that Activates KDO During Rhamnogalacturonan II Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1832–1843.

Kohorn, B.D. (2000). Plasma Membrane-Cell Wall Contacts. *Plant Physiol.* **124**, 31–38.

Kohorn, B.D. (2016). Cell wall-associated kinases and pectin perception. *J. Exp. Bot.* **67**, 489–494.

Kohorn, B.D., and Kohorn, S.L. (2012). The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front. Plant Sci.* **3**, 1–5.

Kohorn, B.D., Kobayashi, M., Johansen, S., Riese, J., Huang, L.-F., Koch, K., Fu, S., Dotson, A., and Byers, N. (2006). An *Arabidopsis* cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. *Plant J.* **46**, 307–316.

Kohorn, B.D., Johansen, S., Shishido, A., Todorova, T., Martinez, R., Defeo, E., and Obregon, P. (2009). Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent: Wall associated kinase-dependent pectin activation. *Plant J.* **60**, 974–982.

Kohorn, B.D., Kohorn, S.L., Saba, N.J., and Martinez, V.M. (2014). Requirement for Pectin Methyl Esterase and Preference for Fragmented over Native Pectins for Wall-associated Kinase-activated, EDS1/PAD4-dependent Stress Response in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **289**, 18978–18986.

Komath, S.S., Singh, S.L., Pratyusha, V.A., and Sah, S.K. (2018). Generating anchors only to lose them: The unusual story of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis and remodeling in yeast and fungi: GPI BIOSYNTHESIS IN YEAST AND FUNGI. *IUBMB Life* **70**, 355–383.

Konrad, S.S.A., and Ott, T. (2015). Molecular principles of membrane microdomain targeting in plants. *Trends Plant Sci.* **20**, 351–361.

Krizek, B.A., Bequette, C.J., Xu, K., Blakley, I.C., Fu, Z.Q., Stratmann, J.W., and Loraine, A.E. (2016). RNA-Seq Links the Transcription Factors *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6* to Cell Wall Remodeling and Plant Defense Pathways. *Plant Physiol.* **171**, 2069–2084.

Kumpf, R.P., Shi, C.-L., Larrieu, A., Sto, I.M., Butenko, M.A., Peret, B., Riiser, E.S., Bennett, M.J., and Aalen, R.B. (2013). Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 5235–5240.

Lally, D., Ingmire, P., Tong, H.-Y., and He, Z.-H. (2001). Antisense Expression of a Cell Wall–Associated Protein Kinase, WAK4, Inhibits Cell Elongation and Alters Morphology. *Plant Cell* *13*, 1317–1331.

Lampropoulos, A., Sutikovic, Z., Wenzl, C., Maegele, I., Lohmann, J.U., and Forner, J. (2013). GreenGate - A Novel, Versatile, and Efficient Cloning System for Plant Transgenesis. *PLoS ONE* *8*, e83043.

Lau, J.M., McNeil, M., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr. Res.* *137*, 111–125.

Lerouge, P., O’Neill, M.A., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1993). Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydr. Res.* *243*, 359–371.

Liners, F., Letesson, J.-J., Didembourg, C., and Van Cutsem, P. (1989). Monoclonal Antibodies against Pectin: Recognition of a Conformation Induced by Calcium. *PLANT Physiol.* *91*, 1419–1424.

Lisanti, M.P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A.R., and Rodriguez-Boulan, E. (1988). Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *85*, 9557–9561.

Lisanti, M.P., Caras, I.W., Gilbert, T., Hanzel, D., and Rodriguez-Boulan, E. (1990). Vectorial apical delivery and slow endocytosis of a glycolipid-anchored fusion protein in transfected MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 7419–7423.

Liu, L., Shang-Guan, K., Zhang, B., Liu, X., Yan, M., Zhang, L., Shi, Y., Zhang, M., Qian, Q., Li, J., et al. (2013). Brittle Culm1, a COBRA-Like Protein, Functions in Cellulose Assembly through Binding Cellulose Microfibrils. *PLoS Genet.* *9*, e1003704.

Liu, X.-L., Liu, L., Niu, Q.-K., Xia, C., Yang, K.-Z., Li, R., Chen, L.-Q., Zhang, X.-Q., Zhou, Y., and Ye, D. (2011). *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 4* encodes a rhamnogalacturonan II xylosyltransferase and is important for growth of pollen tubes and roots in *Arabidopsis*: MGP4 is required for pollen tube growth. *Plant J.* *65*, 647–660.

Lockhart, J.A. (1965). An analysis of irreversible plant cell elongation. *J. Theor. Biol.* *8*, 264–275.

Mähönen, A.P., Tusscher, K. ten, Siligato, R., Smetana, O., Díaz-Triviño, S., Salojärvi, J., Wachsman, G., Prasad, K., Heidstra, R., and Scheres, B. (2014). PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature* *515*, 125–129.

Manabe, Y., Verhertbruggen, Y., Gille, S., Harholt, J., Chong, S.-L., Pawar, P.M.-A., Mellerowicz, E.J., Tenkanen, M., Cheng, K., Pauly, M., et al. (2013). Reduced Wall Acetylation Proteins Play Vital and Distinct Roles in Cell Wall O-Acetylation in *Arabidopsis*. *PLANT Physiol.* *163*, 1107–1117.

Marion-Poll, A., Matin, E., and Bonnefoy, N. (1993). Transposition of the maize autonomous element Activator in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *Mol. Gen. Genet.* *238*, 209–217.

Mascarenhas, J.P., and Hamilton, D.A. (1992). Artifacts in the localization of GUS activity in another of petunia transformed with a CaMV 35S-GUS construct. *Plant J.* *2*, 405–408.

Matoh, T., Kawaguchi, S., and Kobayashi, M. (1996). Ubiquity of a Borate-Rhamnogalacturonan II Complex in the Cell Walls of Higher Plants. *Plant Cell Physiol.* *37*, 636–640.

Matoh, T., Takasaki, M., Takabe, K., and Kobayashi, M. (1998). Immunocytochemistry of Rhamnogalacturonan II in Cell Walls of Higher Plants. *Plant Cell Physiol.* *39*, 483–491.

Matsushashi, S., Nishikawa, N., Negishi, T., and Hatanaka, C. (1993). Enzymic-HPLC Determination of the Amount and Distribution of the Galacturonan Region in Pectate Molecules. *J. Liq. Chromatogr.* *16*, 3203–3215.

Matsunaga, T. (2004). Occurrence of the Primary Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the Evolution of Vascular Plants. *PLANT Physiol.* *134*, 339–351.

Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., Pickersgill, R., and Jenkins, J. (1997). Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* *5*, 677–689.

Mbégué-A-Mbégué, D., Hubert, O., Baurens, F.C., Matsumoto, T., Chillet, M., Fils-Lycaon, B., and Sidibé-Bocs, S. (2009). Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. *J. Exp. Bot.* *60*, 2021–2034.

McCann, M.C., Chen, L., Roberts, K., Kemsley, E.K., Sene, C., Carpita, N.C., Stacey, N.J., and Wilson, R.H. (1997). Infrared microspectroscopy: Sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. *Physiol. Plant.* *100*, 729–738.

McCann, M.C., Bush, M., Milioni, D., Sado, P., Stacey, N.J., Catchpole, G., Defernez, M., Carpita, N.C., Hofte, H., Ulvskov, P., et al. (2001). Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry* *57*, 811–821.

McCullen, C.A., and Binns, A.N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 101–127.

McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., and Cosgrove, D.J. (1992). Two Endogenous Pmteins That Induce Cell Wall Extension in Plants. *Am. Soc. Plant Physiol.* *4*, 1425–1433.

Miedes, E., Suslov, D., Vandenbussche, F., Kenobi, K., Ivakov, A., Van Der Straeten, D., Lorences, E.P., Mellerowicz, E.J., Verbelen, J.-P., and Vissenberg, K. (2013). Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) overexpression affects growth and cell wall mechanics in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *J. Exp. Bot.* *64*, 2481–2497.

- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 266–277.
- Möller, B.K., Xuan, W., and Beeckman, T. (2017). Dynamic control of lateral root positioning. *Curr. Opin. Plant Biol.* *35*, 1–7.
- Mollet, J.-C., Leroux, C., Dardelle, F., and Lehner, A. (2013). Cell Wall Composition, Biosynthesis and Remodeling during Pollen Tube Growth. *Plants* *2*, 107–147.
- Montesinos, J.C., Pastor-Cantizano, N., Robinson, D.G., Marcote, M.J., and Aniento, F. (2014). *Arabidopsis* p24δ5 and p24δ9 facilitate Coat Protein I-dependent transport of the K/HDEL receptor ERD2 from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Plant J.* *80*, 1014–1030.
- Morre, D.J. (1968). Cell Wall Dissolution and Enzyme Secretion During Leaf Abscission. *PLANT Physiol.* *43*, 1545–1559.
- Morris, V.J., Gromer, A., Kirby, A.R., Bongaerts, R.J.M., and Patrick Gunning, A. (2011). Using AFM and force spectroscopy to determine pectin structure and (bio) functionality. *Food Hydrocoll.* *25*, 230–237.
- Moscatiello, R. (2006). Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *J. Exp. Bot.* *57*, 2847–2865.
- Mouille, G., Ralet, M.-C., Cavelier, C., Eland, C., Effroy, D., Hématy, K., McCartney, L., Truong, H.N., Gaudon, V., Thibault, J.-F., et al. (2007). Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain: Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* *50*, 605–614.
- Mravec, J., Kracun, S.K., Rydahl, M.G., Westereng, B., Miart, F., Clausen, M.H., Fangel, J.U., Dugaard, M., Van Cutsem, P., De Fine Licht, H.H., et al. (2014). Tracking developmentally regulated post-synthetic processing of homogalacturonan and chitin using reciprocal oligosaccharide probes. *Development* *141*, 4841–4850.
- Mravec, J., Kračun, S.K., Rydahl, M.G., Westereng, B., Pontiggia, D., De Lorenzo, G., Domozych, D.S., and Willats, W.G.T. (2017). An oligogalacturonide-derived molecular probe demonstrates the dynamics of calcium-mediated pectin complexation in cell walls of tip-growing structures. *Plant J.* *91*, 534–546.
- Murray, J.A.H., Jones, A., Godin, C., and Traas, J. (2012). Systems Analysis of Shoot Apical Meristem Growth and Development: Integrating Hormonal and Mechanical Signaling. *Plant Cell* *24*, 3907–3919.
- Nakamura, A. (2003). Brassinolide Induces IAA5, IAA19, and DR5, a Synthetic Auxin Response Element in *Arabidopsis*, Implying a Cross Talk Point of Brassinosteroid and Auxin Signaling. *PLANT Physiol.* *133*, 1843–1853.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T., and Nagamatsu, Y. (2002). Structural Studies by Stepwise Enzymatic Degradation of the Main Backbone of Soybean Soluble Polysaccharides Consisting of Galacturonan and Rhamnogalacturonan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *66*, 1301–1313.

Nawy, T. (2005). Transcriptional Profile of the *Arabidopsis* Root Quiescent Center. *Plant Cell Online* 17, 1908–1925.

Nebenführ, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., and Staehelin, L.A. (1999). Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* 121, 1127–1141.

Nishiyama, Y., Langan, P., and Chanzy, H.C. (2002). Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose Ib from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J AM CHEM SOC* 9074–9082.

Niture, S.K., and Pant, A. (2004). Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiol. Res.* 159, 305–314.

Nogata, Y., Ohta, H., and Voragen, A.G.J. (1993). Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry* 34, 617–620.

Øbro, J., Harholt, J., Scheller, H.V., and Orfila, C. (2004). Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry* 65, 1429–1438.

Okamoto-Nakazato, A., Takahashi, K., Kido, N., Owaribe, K., and Katou, K. (2000). Molecular cloning of yieldins regulating the yield threshold of cowpea cell walls: cDNA cloning and characterization of recombinant yieldin. *Plant Cell Environ.* 23, 155–164.

O'Neill, M.A. (2001). Requirement of Borate Cross-Linking of Cell Wall Rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* Growth. *Science* 294, 846–849.

O'Neill, M., and York, W.S. (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. In *The Plant Cell Wall*, (J.K.C. Rose), pp. 1–54.

O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1996). Rhamnogalacturonan-II, a Pectic Polysaccharide in the Walls of Growing Plant Cell, Forms a Dimer That Is Covalently Cross-linked by a Borate Ester: *IN VITRO* CONDITIONS FOR THE FORMATION AND HYDROLYSIS OF THE DIMER. *J. Biol. Chem.* 271, 22923–22930.

O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (2004). RHAMNOGALACTURONAN II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 109–139.

Oomen, R.J.F.J., Doeswijk-Voragen, C.H.L., Bush, M.S., Vincken, J.-P., Borkhardt, B., Broek, L.A.M.V.D., Corsar, J., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., McCann, M.C., et al. (2002). In muro fragmentation of the rhamnogalacturonan I backbone in potato (*Solanum tuberosum* L.) results in a reduction and altered location of the galactan and arabinan side-chains and abnormal periderm development. *Plant J.* 30, 403–413.

Opat, A.S., Houghton, F., and Gleeson, P.A. (2001). Steady-state localization of a medial-Golgi glycosyltransferase involves transit through the *trans*-Golgi network. *Biochem. J.* 358, 33–40.

Orlean, P., and Menon, A.K. (2007). Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycospholipids. *J. Lipid Res.* *48*, 993–1011.

Overvoorde, P., Fukaki, H., and Beeckman, T. (2010). Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001537–a001537.

Palin, R. (2011). A comparison of cell wall properties of *Arabidopsis thaliana*. University of Birmingham.

Palin, R., and Geitmann, A. (2012). The role of pectin in plant morphogenesis. *Biosystems* *109*, 397–402.

Park, Y.B., and Cosgrove, D.J. (2012a). A Revised Architecture of Primary Cell Walls Based on Biomechanical Changes Induced by Substrate-Specific Endoglucanases. *PLANT Physiol.* *158*, 1933–1943.

Park, Y.B., and Cosgrove, D.J. (2012b). Changes in Cell Wall Biomechanical Properties in the Xyloglucan-Deficient *xxt1/xxt2* Mutant of *Arabidopsis*. *PLANT Physiol.* *158*, 465–475.

Park, K.-C., Kwon, S.-J., and Kim, N.-S. (2010). Intron loss mediated structural dynamics and functional differentiation of the polygalacturonase gene family in land plants. *Genes Genomics* *32*, 570–577.

Payasi, A., and Sanwal, G.. (2003). Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry* *63*, 243–248.

Peaucelle, A., Braybrook, S.A., Le Guillou, L., Bron, E., Kuhlemeier, C., and Höfte, H. (2011). Pectin-Induced Changes in Cell Wall Mechanics Underlie Organ Initiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* *21*, 1720–1726.

Peaucelle, A., Wightman, R., and Höfte, H. (2015). The Control of Growth Symmetry Breaking in the *Arabidopsis* Hypocotyl. *Curr. Biol.* *25*, 1746–1752.

Pelletier, S., Van Orden, J., Wolf, S., Vissenberg, K., Delacourt, J., Ndong, Y.A., Pelloux, J., Bischoff, V., Urbain, A., Mouille, G., et al. (2010). A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *New Phytol.* *188*, 726–739.

Pelloux, J., Rusterucci, C., and Mellerowicz, E. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* *12*, 267–277.

Pena, M.J. (2004). Loss of Highly Branched Arabinans and Debranching of Rhamnogalacturonan I Accompany Loss of Firm Texture and Cell Separation during Prolonged Storage of Apple. *PLANT Physiol.* *135*, 1305–1313.

Penfield, S., Meissner, R.C., Shoue, D.A., Carpita, N.C., and Bevan, M.W. (2001). *MYB61* Is Required for Mucilage Deposition and Extrusion in the *Arabidopsis* Seed Coat. *Plant Cell* *13*, 2777.



Peret, B., Larrieu, A., and Bennett, M.J. (2009). Lateral root emergence: a difficult birth. *J. Exp. Bot.* *60*, 3637–3643.

Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplace, L., Beeckman, T., and Bennett, M.J. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* *14*, 399–408.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* *8*, 785–786.

Petricka, J.J., Winter, C.M., and Benfey, P.N. (2012). Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* *63*, 563–590.

Pierleoni, A., Martelli, P., and Casadio, R. (2008). PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* *9*, 392.

Pilnik, W., and Rombouts, F.M. (1981). Pectic Enzymes. In *Enzymes and Food Processing*, G.G. Birch, N. Blakebrough, and K.J. Parker, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 105–128.

Pittet, M., and Conzelmann, A. (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1771*, 405–420.

Poisson, G., Chauve, C., Chen, X., and Bergeron, A. (2007). FragAnchor: A Large-Scale Predictor of Glycosylphosphatidylinositol Anchors in Eukaryote Protein Sequences by Qualitative Scoring. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *5*, 121–130.

Poovaliah, B.W., and Nukaya, A. (1979). Polygalacturonase and Cellulase Enzymes in the Normal Rutgers and Mutant rin Tomato Fruits and Their Relationship to the Respiratory Climacteric. *64*, 4.

Puhlmann, J., Bucheli, E., Swain, M.J., Dunning, N., Albersheim, P., Darvill, A.G., and Hahn, M.G. (1994). Generation of Monoclonal Antibodies against Plant Cell-Wall Polysaccharides. *Plant Physiol.* *104*, 699–710.

Ralet, M.-C., Crépeau, M.-J., Buchholt, H.-C., and Thibault, J.-F. (2003). Polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties of sugar beet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. *Biochem. Eng. J.* *16*, 191–201.

Ralet, M.-C., Cabrera, J.C., Bonnin, E., Quémener, B., Hellin, P., and Thibault, J.-F. (2005). Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry* *66*, 1832–1843.

Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., and Jackson, R. (2011a). Exploration de la cellule. In *Campbell Biologie*, (Pearson Education), pp. 103–137.

Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., and Jackson, R. (2011b). Anatomie, croissance et développement des Végétaux. In *Campbell Biologie*, (Pearson Education), pp. 859–887.

Reiter, W.-D., Chapple, C.C.S., and Somerville, C.R. (1993). Altered Growth and Cell Walls in a Fucose-Deficient Mutant of *Arabidopsis*. *Science* 261, 1032–1035.

Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929–967.

Roberts, J. (2000). Cell Separation Processes in Plants—Models, Mechanisms and Manipulation. *Ann. Bot.* 86, 223–235.

Rose, J.K., and Bennett, A.B. (1999). Cooperative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 4, 176–183.

Roudier, F. (2005). COBRA, an *Arabidopsis* Extracellular Glycosyl-Phosphatidyl Inositol-Anchored Protein, Specifically Controls Highly Anisotropic Expansion through Its Involvement in Cellulose Microfibril Orientation. *Plant Cell Online* 17, 1749–1763.

Rugar, D., and Hansa, P. (1990). Atomic force microscopy. *Phys. Today* 43, 23–30.

Rui, Y., Xiao, C., Yi, H., Kandemir, B., Wang, J.Z., Puri, V.M., and Anderson, C.T. (2017). POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION3 Functions in Seedling Development, Rosette Growth, and Stomatal Dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell tpc.00568.2017*.

Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska, R., Beeckman, T., Friml, J., and Benkova, E. (2007). Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution. *Plant Cell Online* 19, 2197–2212.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., et al. (1999). An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell* 99, 463–472.

Saez-Aguayo, S., Ralet, M.-C., Berger, A., Botran, L., Ropartz, D., Marion-Poll, A., and North, H.M. (2013). PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 Promotes *Arabidopsis* Mucilage Release by Limiting Methylesterification of Homogalacturonan in Seed Coat Epidermal Cells. *Plant Cell* 25, 308–323.

Sanders, S.L., Gentsch, M., Tanner, W., and Herskowitz, I. (1999). O-Glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p Is Required for Its Stability, Localization, and Function in Daughter Cells. *J. Cell Biol.* 145, 1177–1188.

Santuari, L., Sanchez-Perez, G.F., Luijten, M., Rutjens, B., Terpstra, I., Berke, L., Gorte, M., Prasad, K., Bao, D., Timmermans-Hereijgers, J.L.P.M., et al. (2016). The PLETHORA Gene Regulatory Network Guides Growth and Cell Differentiation in *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell* 28, 2937–2951.

Saqib, A.A.N., and Whitney, P.J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass Bioenergy* 35, 4748–4750.

Sassi, M., Ali, O., Boudon, F., Cloarec, G., Abad, U., Cellier, C., Chen, X., Gilles, B., Milani, P., Friml, J., et al. (2014). An Auxin-Mediated Shift toward Growth Isotropy Promotes Organ Formation at the Shoot Meristem in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 24, 2335–2342.

Sathiyaraj, G., Srinivasan, S., Subramaniam, S., Kim, Y.-J., Kim, Y.-J., Kwon, W.-S., and Yang, D.-C. (2010). Polygalacturonase inhibiting protein: isolation, developmental regulation and pathogen related expression in *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Mol. Biol. Rep.* *37*, 3445–3454.

Saxena, I.M., and Brown, R.M. (2005). Cellulose Biosynthesis: Current Views and Evolving Concepts. *Ann. Bot.* *96*, 9–21.

Scheible, W.-R., and Pauly, M. (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 285–295.

Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2002). The chemical structure of pectins. In *Pectins and Their Manipulation*, (Oxford: Blackwell Publishing Ltd.), pp. 1–18.

Schöpke, C., Taylor, N.J., Cárcamo, R., Beachy, R.N., and Fauquet, C. (1997). Optimization of parameters for particle bombardment of embryogenic suspension cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using computer image analysis. *Plant Cell Rep.* *16*, 526–530.

Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatos, A., Halkier, B.A., and Glawischnig, E. (2006). CYP71B15 (PAD3) Catalyzes the Final Step in Camalexin Biosynthesis. *PLANT Physiol.* *141*, 1248–1254.

Sedbrook, J.C. (2002). The Arabidopsis SKU5 Gene Encodes an Extracellular Glycosyl Phosphatidylinositol-Anchored Glycoprotein Involved in Directional Root Growth. *PLANT CELL ONLINE* *14*, 1635–1648.

Senechal, F., Wattier, C., Rusterucci, C., and Pelloux, J. (2014). Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *J. Exp. Bot.* *65*, 5125–5160.

Shimokawa, T., Ishii, T., and Matsunaga, T. (1999). Isolation and structural characterization of rhamnogalacturonan II-borate complex from *Pinus densiflora*. *J. Wood Sci.* *45*, 435–439.

Silva, I.R., Jers, C., Meyer, A.S., and Mikkelsen, J.D. (2016). Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New Biotechnol.* *33*, 41–54.

Sinitsyna, O.A., Fedorova, E.A., Semenova, M.V., Gusakov, A.V., Sokolova, L.M., Bubnova, T.M., Okunev, O.N., Chulkin, A.M., Vavilova, E.A., Vinetsky, Y.P., et al. (2007). Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. *Biochem. Mosc.* *72*, 565–571.

Smith, C.J.S., Watson, C.F., Morris, P.C., Bird, C.R., Seymour, G.B., Gray, J.E., Arnold, C., Tucker, G.A., Schuch, W., Harding, S., et al. (1990). Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.* *14*, 369–379.

Somssich, M., Khan, G.A., and Persson, S. (2016). Cell Wall Heterogeneity in Root Development of *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* *07*.

de Souza, A., Hull, P.A., Gille, S., and Pauly, M. (2014). Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. *Planta* *240*, 1123–1138.

Spadoni, S. (2006). Polygalacturonase-Inhibiting Protein Interacts with Pectin through a Binding Site Formed by Four Clustered Residues of Arginine and Lysine. *PLANT Physiol.* *141*, 557–564.

Steffan, W., Kovac, P., Albersheim, P., Darvill, A.G., and Hahn, M.G. (1995). Characterization of a monoclonal antibody that recognizes an arabinosylated (1->6)-beta-D-galactan epitope in plant complex carbohydrates. *Carbohydr. Res.* *275*, 295–307.

Stolle-Smits, T., Beekhuizen, J.G., Kok, M.T.C., Pijnenburg, M., Recourt, K., Derksen, J., and Voragen, A.G.J. (1999). Changes in Cell Wall Polysaccharides of Green Bean Pods during Development. *Plant Physiol.* *121*, 363–372.

Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., et al. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* *10*, 946–954.

Takahashi, K., Hirata, S., Kido, N., and Katou, K. (2006). Wall-Yielding Properties of Cell Walls from Elongating Cucumber Hypocotyls in Relation to the Action of Expansin. *Plant Cell Physiol.* *47*, 1520–1529.

Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushka, J., Yuan, C., Hao, Z., Zhu, X., Avci, U., Miller, J.S., et al. (2013). An *Arabidopsis* Cell Wall Proteoglycan Consists of Pectin and Arabinoxylan Covalently Linked to an Arabinogalactan Protein. *Plant Cell* *25*, 270–287.

Tjellström, H., Hellgren, L.I., Wieslander, Å., and Sandelius, A.S. (2010). Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *FASEB J.* *24*, 1128–1138.

Tucker, G.A., and Grierson, D. (1982). Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening. *Planta* *155*, 64–67.

Udenfriend, S. (1995). How Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins are Made. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 563–591.

Ulvskov, P., Wium, H., Bruce, D., Jørgensen, B., Qvist, K.B., Skjøt, M., Hepworth, D., Borkhardt, B., and Sørensen, S.O. (2005). Biophysical consequences of remodeling the neutral side chains of rhamnogalacturonan I in tubers of transgenic potatoes. *Planta* *220*, 609–620.

Van Alebeek, G.-J.W.M., Van Scherpenzeel, K., Beldman, G., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2003). Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* *372*, 211–218.

Vandesompele, J., Preter, K.D., Roy, N.V., and Paepe, A.D. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* *3*, 1–12.

Verhertbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J.J., and Knox, J.P. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydr. Res.* *344*, 1858–1862.

Verlent, I., Smout, C., Duvetter, T., Hendrickx, M.E., and Van Loey, A. (2005). Effect of temperature and pressure on the activity of purified tomato polygalacturonase in the presence of pectins with different patterns of methyl esterification. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* *6*, 293–303.

Vicre, M. (2005). Root Border-Like Cells of Arabidopsis. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria. *PLANT Physiol.* *138*, 998–1008.

Vincent, J.F., and Wegst, U.G.. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct. Dev.* *33*, 187–199.

Vincken, J.-P. (2003). If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *PLANT Physiol.* *132*, 1781–1789.

Vincken, J.-P., Vincken, J.-P., Borkhardt, B., Bush, M., Doeswijk-Voragen, C., Dopico, B., Labrador, E., Lange, L., McCann, M., Morvan, C., et al. (2000). Remodelling Pectin Structure In Potato. In *Developments in Plant Genetics and Breeding*, (Elsevier), pp. 245–256.

Vissenberg, K., Van Sandt, V., Fry, S.C., and Verbelen, J.-P. (2003). Xyloglucan endotransglucosylase action is high in the root elongation zone and in the trichoblasts of all vascular plants from *Selaginella* to *Zea mays*. *J. Exp. Bot.* *54*, 335–344.

Wagner, T.A., and Kohorn, B.D. (2001). Wall-Associated Kinases Are Expressed throughout Plant Development and Are Required for Cell Expansion. *Plant Cell* *13*, 303–318.

Wang, D., Yeats, T.H., Uluisik, S., Rose, J.K.C., and Seymour, G.B. (2018). Fruit Softening: Revisiting the Role of Pectin. *Trends Plant Sci.*

Wang, T., Park, Y.B., Cosgrove, D.J., and Hong, M. (2015). Cellulose-Pectin Spatial Contacts Are Inherent to Never-Dried Arabidopsis Primary Cell Walls: Evidence from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol.* *168*, 871–884.

Watson, B.S., Lei, Z., Dixon, R.A., and Sumner, L.W. (2004). Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* *65*, 1709–1720.

Western, T.L. (2004). *MUCILAGE-MODIFIED4* Encodes a Putative Pectin Biosynthetic Enzyme Developmentally Regulated by *APETALA2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*, and *GLABRA2* in the Arabidopsis Seed Coat. *PLANT Physiol.* *134*, 296–306.

Western, T.L. (2012). The sticky tale of seed coat mucilages: production, genetics, and role in seed germination and dispersal. *Seed Sci. Res.* *22*, 1–25.

Willats, W.G.T., Marcus, S.E., and Knox, J.P. (1998). Generation of a monoclonal antibody specific to (1->5)- $\alpha$ -L-arabinan. *Carbohydr. Res.* *4*.

Willats, W.G.T., Gilmartin, P.M., Mikkelsen, J.D., and Knox, J.P. (1999). Cell wall antibodies without immunization: generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naive phage display library. *Plant J.* *18*, 57–65.

Willats, W.G.T., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.-J., Benen, J., Christensen, T.M.I.E., Visser, J., Voragen, A., Mikkelsen, J.D., and Knox, J.P. (2000). Analysis of pectic

epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* 327, 309–320.

Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W., and Knox, J.P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47, 9–27.

Williams, M.N.V., Freshour, G., Darvill, A.G., Albersheim, P., and Hahn, M.G. (1996). An Antibody Fab Selected from a Recombinant Phage Display Library Detects Deesterified Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Plant Cells. *Plant Cell* 8, 673–685.

Williamson, G. (1991). Purification and characterization of pectin acetyltransferase from orange peel. *Phytochemistry* 30, 445–449.

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, 1–12.

Wolf, S., Mouille, G., and Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Mol. Plant* 2, 851–860.

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

Xiao, C., Barnes, W.J., Zamil, M.S., Yi, H., Puri, V.M., and Anderson, C.T. (2017). Activation tagging of *Arabidopsis* POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION2 promotes hypocotyl elongation, leaf expansion, stem lignification, mechanical stiffening, and lodging. *Plant J.* 89, 1159–1173.

Yang, X., Dong, G., Palaniappan, K., Mi, G., and Baskin, T.I. (2016). Temperature-compensated cell production rate and elongation zone length in the root of *Arabidopsis thaliana*: Temperature compensation in root growth. *Plant Cell Environ.*

Yang, Y., Yu, Y., Liang, Y., Anderson, C.T., and Cao, J. (2018). A Profusion of Molecular Scissors for Pectins: Classification, Expression, and Functions of Plant Polygalacturonases. *Front. Plant Sci.* 9.

Yeats, T.H., Bacic, A., and Johnson, K.L. (2018). Plant glycosylphosphatidylinositol anchored proteins at the plasma membrane-cell wall nexus: Plant GPI-anchored proteins. *J. Integr. Plant Biol.*

Yuan, S., Wu, Y., and Cosgrove, D.J. (2001). A Fungal Endoglucanase with Plant Cell Wall Extension Activity. *PLANT Physiol.* 127, 324–333.

Zablackis, E., Huang, J., Muller, B., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1995). Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol.* 107, 1129–1138.

Zhang, G.F., and Staehelin, L.A. (1992). Functional Compartmentation of the Golgi Apparatus of Plant Cells : Immunocytochemical Analysis of High-Pressure Frozen- and Freeze-Substituted Sycamore Maple Suspension Culture Cells. *PLANT Physiol.* 99, 1070–1083.

Zhao, Q., Yuan, S., Wang, X., Zhang, Y., Zhu, H., and Lu, C. (2008). Restoration of Mature Etiolated Cucumber Hypocotyl Cell Wall Susceptibility to Expansin by Pretreatment with Fungal Pectinases and EGTA *in Vitro*. *PLANT Physiol.* *147*, 1874–1885.

Zurzolo, C., and Simons, K. (2016). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: Membrane organization and transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1858*, 632–639.

Zykwinska, A.W. (2005). Evidence for In Vitro Binding of Pectin Side Chains to Cellulose. *PLANT Physiol.* *139*, 397–407.





# Liens internet

- <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e.html>
- <http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi>
- <http://gpi.unibe.ch/>
- [http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant_server.html)
- <http://psbweb03.psb.ugent.be/~manka/pK2GW7map.html>
- <http://signal.salk.edu/>
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>
- <http://www.GABI-Kat.de>
- <http://www.mwg-biotech.com/>
- <http://www.pacificlab.com.au/shop/agilent-genomics-2/5067-1511-rna-6000-nano-kit>
- <http://www.plantprobes.net/index.php>
- [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets.L-1SG/manuals/MAN0012036\\_DreamTaqDNAPolymerase\\_500U\\_UG.pdf](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets.L-1SG/manuals/MAN0012036_DreamTaqDNAPolymerase_500U_UG.pdf)
- [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets.L-1SG/manuals/pentr\\_dtopo\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets.L-1SG/manuals/pentr_dtopo_man.pdf)
- <https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>
- <https://genorm.cmgg.be/>
- <https://imagej.net/NeuronJ>
- <https://international.neb.com/protocols/2012/09/13/protocol-for-taq-5x-master-mix-m0285>
- <https://serial-cloner.en.softonic.com/>
- <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/sequencing-primers/>
- [https://www.agilent.com/cs.L-1library/usermanuals/Public/G2938-90034\\_RNA6000Nano\\_KG.pdf](https://www.agilent.com/cs.L-1library/usermanuals/Public/G2938-90034_RNA6000Nano_KG.pdf)
- <https://www.arabidopsis.org>
- <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=vector&id=300034>
- <https://www.biocompare.com/Product-Reviews/40310-Bioanalyzer-2100-RNA-6000-Nano-Kit-From-Agilent-Technologies/>
- <https://www.britannica.com/science/fibrous-root-system>
- <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>
- <https://www.ilephysique.net/sujet-dosages-288153.html>
- <https://www.lifescience-market.com/p/pkgwfs71-p-108572.html>
- <https://www.printablediagram.com/diagrams-of-a-plant-cell-to-print/cell-diagram-2/>
- <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F549L>
- <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V19520>
- <https://www.uniprot.org/help/carbohydr>

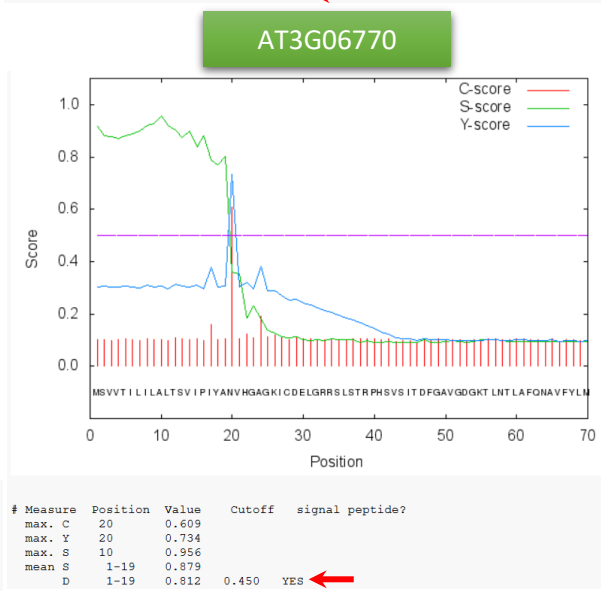
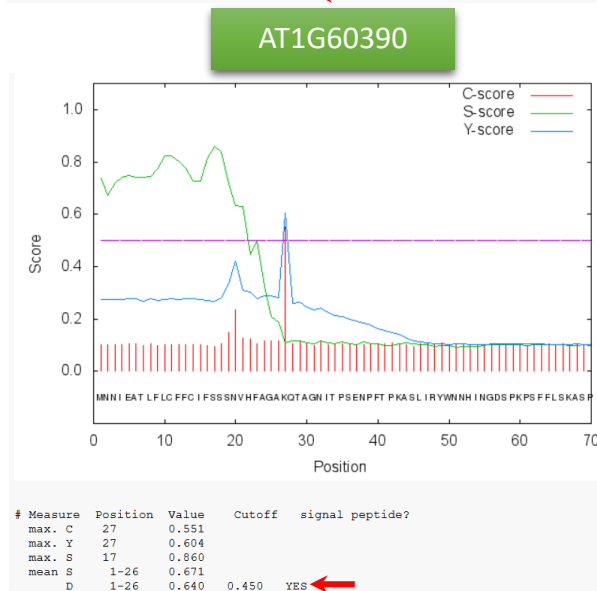
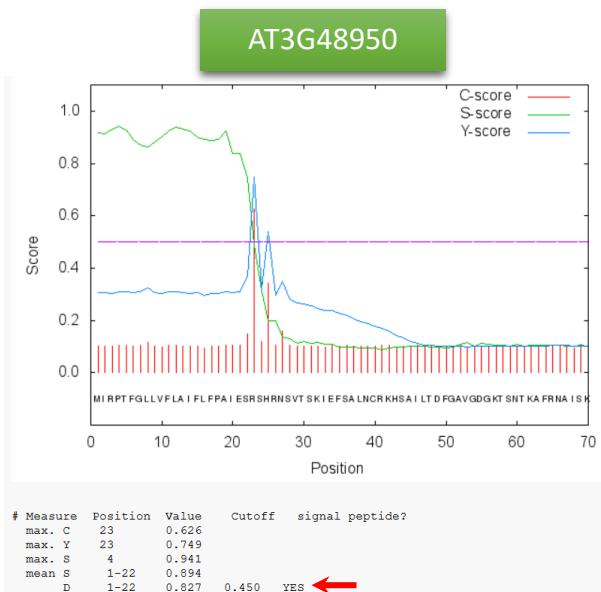
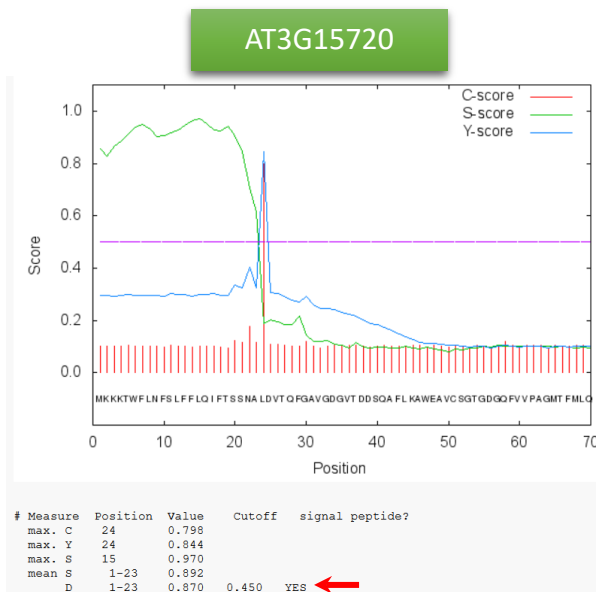


# Annexe

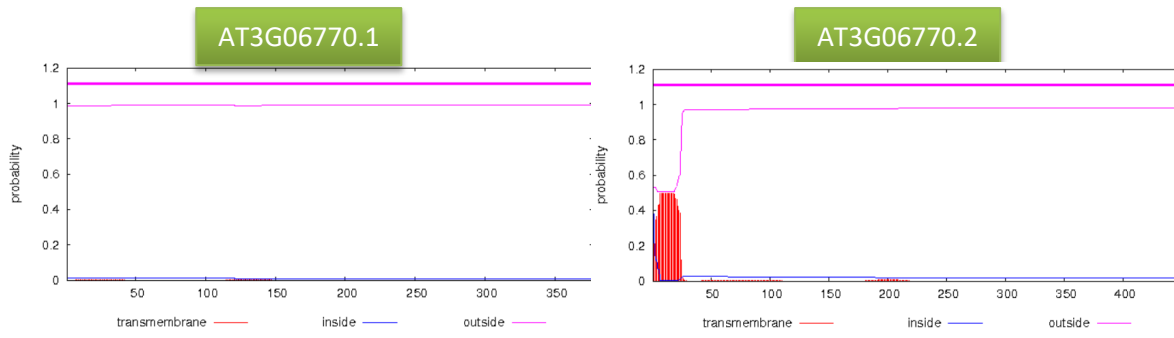
<i>Annexe 1 : Amorces pour le génotypage des mutants PG KO</i> .....	176
<i>Annexe 2 : Prédiction des positions des peptides de sécrétion des protéines AT3G15720, AT3G48950, AT1G60390 et AT3G06770</i> .....	177
<i>Annexe 3 : Domaines transmembranaires putatifs de la protéine AT3G06770</i> .....	177
<i>Annexe 4 : Localisation de l'expression du gène AT3G48950 dans différents organes de plantules d'A. thaliana (gènes rapporteurs GUS)</i> .....	177
<i>Annexe 5 : Pattern d'expression de différentes lignées des constructions promPG R::GUS et promPG RAM::GUS</i> .....	177
<i>Annexe 6 : Apparition du marquage GFP au niveau des racines promPG R::GFP-NLS par rapport à la position et à la taille des cellules de chaque file cellulaire</i> .....	177
<i>Annexe 7 : Constructions 35S::PG-eYFP utilisées pour la transformation transitoire en feuilles de tabac</i> .....	177
<i>Annexe 8 : Marquage 35S::PG-eYFP (PG R et PG RAM pleine longueur) au niveau cellulaire et à l'apoplaste (en feuilles de tabac)</i> .....	177
<i>Annexe 9 : Expression hétérologue et transitoire de la construction 35S::eYFP-PG AT3G48950 en feuilles de tabac</i> .....	177
<i>Annexe 10 : Sites d'hybridation des amorces pour la réalisation des PCR en point final, par rapport au lieu d'insertion des ADN-T des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3</i> .....	177
<i>Annexe 11 : Sites d'hybridation des amorces pour la réalisation des RT-qPCR (PowerUp SYBR® Green Master Mix, ThermoFisher), par rapport au lieu d'insertion des ADN-T des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3</i> .....	177
<i>Annexe 12 : Courbes de fusion des RT-qPCR réalisées sur de l'ADNc de Col-0 afin de quantifier les niveau d'expression des gène PG R et PG RAM</i> .....	177
<i>Annexe 13 : Sites d'hybridation des amorces pour la réalisation des RT-qPCR (TaqMan, ThermoFisher), par rapport au lieu d'insertion des ADN-T des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3</i> .....	177
<i>Annexe 14 : Motif d'expression GUS du gène PG R après passage de plantules de 5 jours à l'obscurité (symbolisée par une lune) ou après passage d'hypocotyles étiolés de 3 jours à la lumière (symbolisée par un soleil)</i> .....	177
<i>Annexe 15 : Motif d'expression GUS du gène PG RAM après passage de plantules de 5 jours à l'obscurité (symbolisée par une lune) ou après passage d'hypocotyles étiolés de 3 jours à la lumière (symbolisée par un soleil)</i> .....	177
<i>Annexe 16 : Expression des gènes PG R et PG RAM suite à des blessures</i> .....	177
<i>Annexe 17 : Expression de l'élément de réponse à l'auxine DR5::GUS. Expression du gène rapporteur DR5::GUS au niveau de la columelle de racines de plantules 4 jours après germination</i> .....	177
<i>Annexe 18 : Prédiction de sites de N-glycosylations chez PG R et PG RAM</i> .....	177
<i>Annexe 19 : Pistil d'un transformant promPG R::GUS, lignée 1.9</i> .....	177
<i>Annexe 20 : Racines de sauvage (Col-0) et du mutant pg r observées à la loupe binoculaire</i> .....	177
<i>Annexe 21 : Apex racinaires du sauvage (Col-0), du mutant pg r et des mutants pg ram colorés à l'iodure de propidium</i> .....	177
<i>Annexe 22 : Résultat préliminaire du marquage de l'apex racinaire par la sonde COS488 (racine fraîche de sauvage)</i> .....	177

**Annexe 1 : Amorces pour le génotypage des mutants PG KO.** Amorces spécifiques encadrant l'insertion théorique de l'ADN-T de chaque lignée mutante, et amorces spécifiques aux ADN-T GABI-KAT (pour le mutant PG R) et SALK (pour PG RAM). Sens : 5' → 3', anti-sens : 3' → 5'.

	Gène muté / ADN-T	Lignée mutante	Sens de l'amorce amorce	Séquence (5'→3')	Tm (°C)
<b>Amorce spécifique aux gènes</b>	AT3G06770 (PG R)	GK061E08	Sens	GGGACACGGTTCAGGAATGACTG	67
			Anti-sens	ACGTGGGGTATGACGCGATTTCC	67
	AT3G15720 (PG RAM)	SALK062374	sens	TATCGGAATCGCCACCGTTATAGAAC	66
			Anti-sens	GGACCAGGCCATGGGATAAGGTT	67
		SALK008496	sens	ATCGGTGTTAGGACTTGATTGAGGTG	66
			Anti-sens	AAGGACTTGTGATTGAAGGTGACGGT	66
		SALK009840	sens	ACCGTCACCTTCAATCACAAGTCCTT	66
			Anti-sens	GAGATGGAGTTACAGACGATTCACAG	66
<b>Amorces spécifiques aux ADN-T</b>	GABI-KAT	-	sens	CGATTTGGAACCACCATCAAACAGGA	55
		-	Anti-sens	ATATTGACCATCATACTCATTGC	58
	SALK	-	sens	CGATTTGGAACCACCATCAAACAGGA	66
		-	Anti-sens	TAAAACGGCTTGTCCCGCGTCATC	69

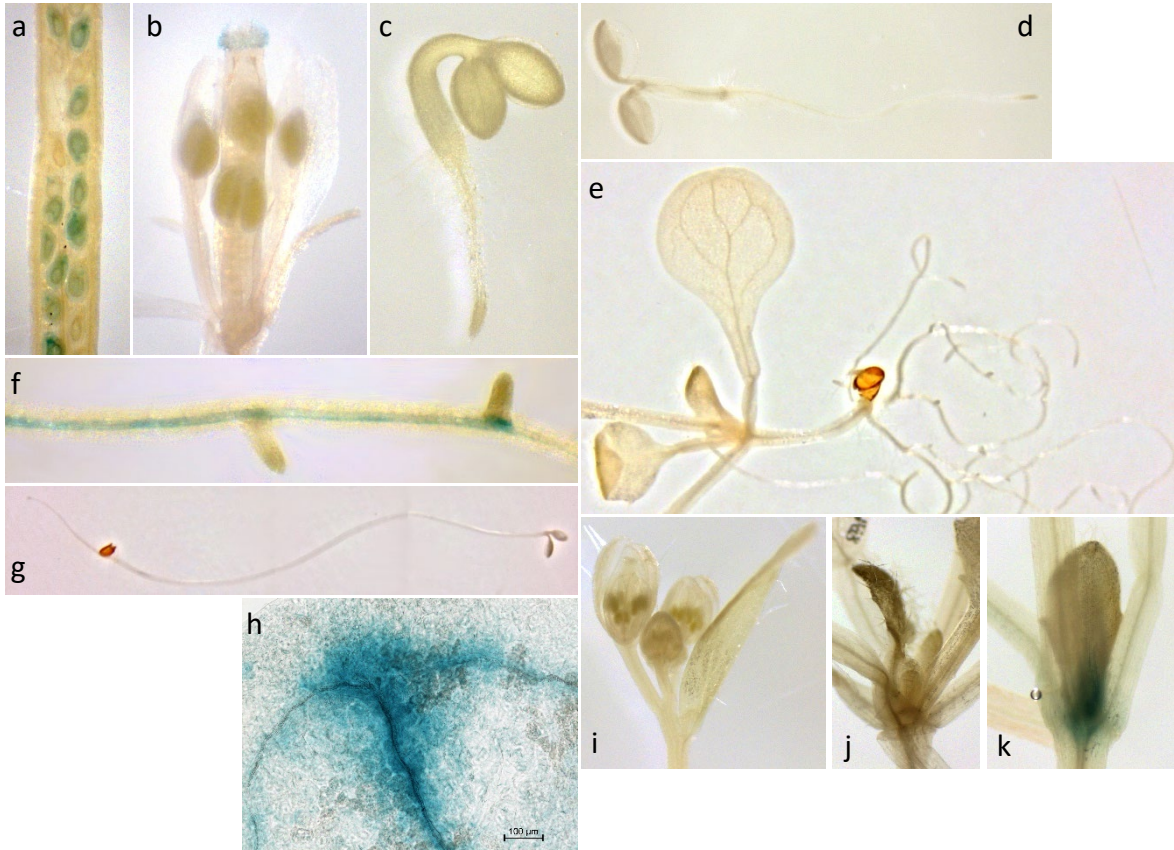


**Annexe 2 : Prédiction des positions des peptides de sécrétion des protéines AT3G15720, AT3G48950, AT1G60390 et AT3G06770. D'après le logiciel SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen et al., 2011).**

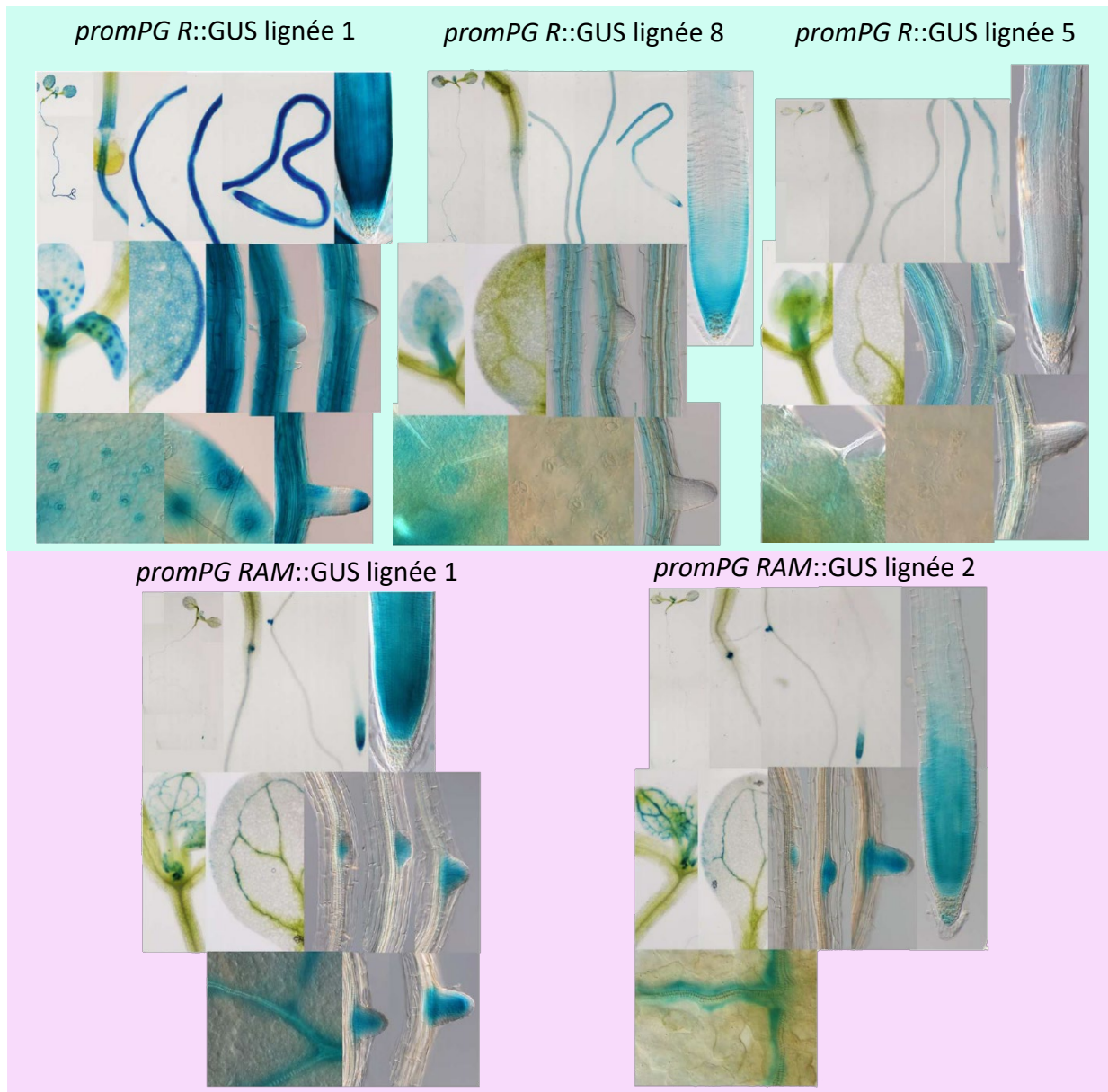


**Annexe 3: Domaines transmembranaires putatifs de la protéine AT3G06770.** Les isoformes AT3G06770.3 et AT3G06770.4 présentent un profil similaire à AT3G06770.1, et AT3G06770.5 un profil similaire à AT3G06770.2.

*promAT3G48950::GUS*

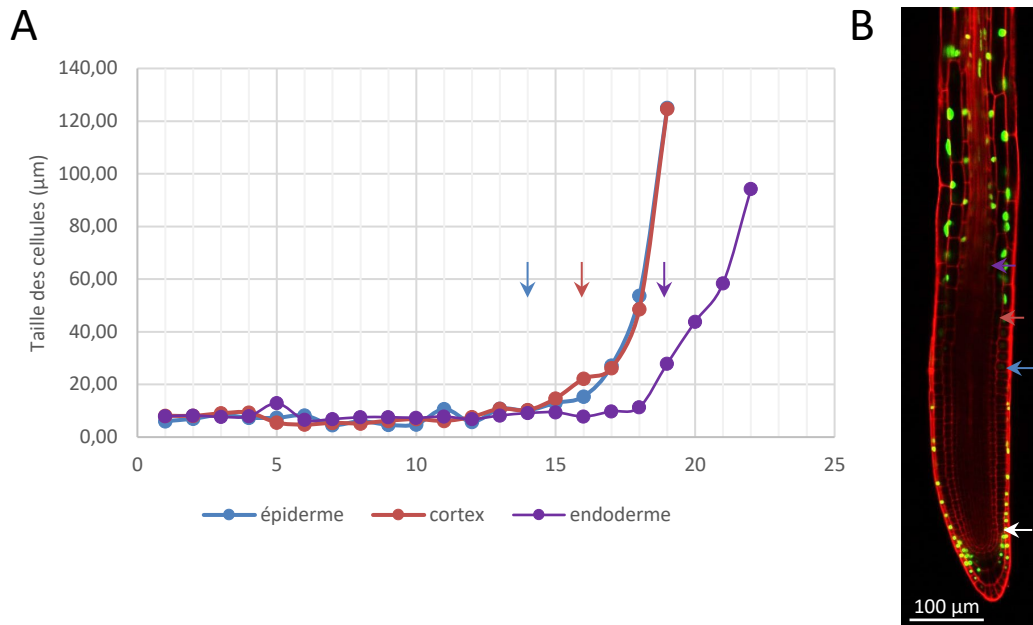


**Annexe 4 : Localisation de l'expression du gène AT3G48950 dans différents organes de plantules d'*A. thaliana* (gènes rapporteurs GUS).** a) silique ; b) fleur ; c) jeune plantule de 2 jours ; d) jeune plantule de 3 jours ; e) plantules de 10 jours ; f) racine principale et racines secondaires ; g) hypocotyle étioilé de 7 jours ; h) nervures de feuilles ; i) bourgeons floraux ; j) et k) apex apical caulinaire. Le marquage GUS observé en b, f, h, et k n'a été observé que sur une lignée sur 5 lignées disponibles. La loupe binoculaire utilisée ne fournit pas d'échelle.

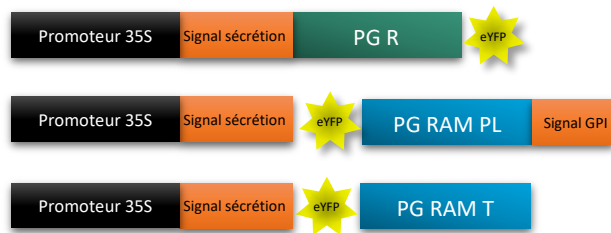


**Annexe 5 : Pattern d'expression de différentes lignées des constructions *promPG R::GUS* et *promPG RAM::GUS*.** Images réalisées par Mélanie Venant et Tom Beeckman, de l'Université de Gand. Incubation dans le tampon GUS pendant 1 h pour les lignées de la construction *promPG R::GUS*, et 4 h pour les lignées de la construction *promPG RAM::GUS*.

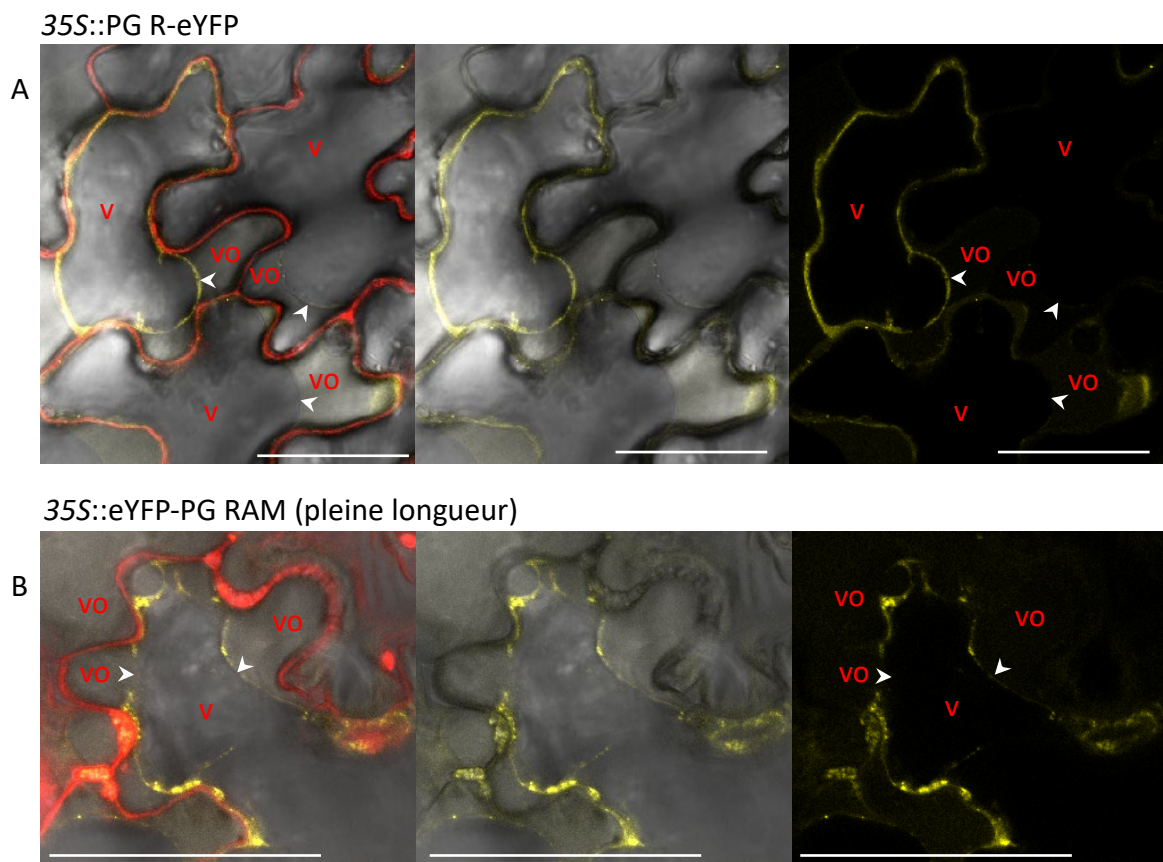




**Annexe 6 : Apparition du marquage GFP au niveau des racines promPG R::GFP-NLS par rapport à la position et à la taille des cellules de chaque file cellulaire.** A) Taille des cellules racinaires en fonction de leur position dans la file de cellules de l'apex racinaire. Ces mesures ont été prises de la figure B), depuis le début des files de chaque tissu (flèche blanche), et correspondent à la moyenne de deux cellules. Les flèches bleues, oranges et violettes correspondent à l'apparition de marquage GFP dans ces cellules. Les cellules des tissus internes (péricycle et stèle) n'ont pas pu être mesurées à cause d'un manque de résolution.

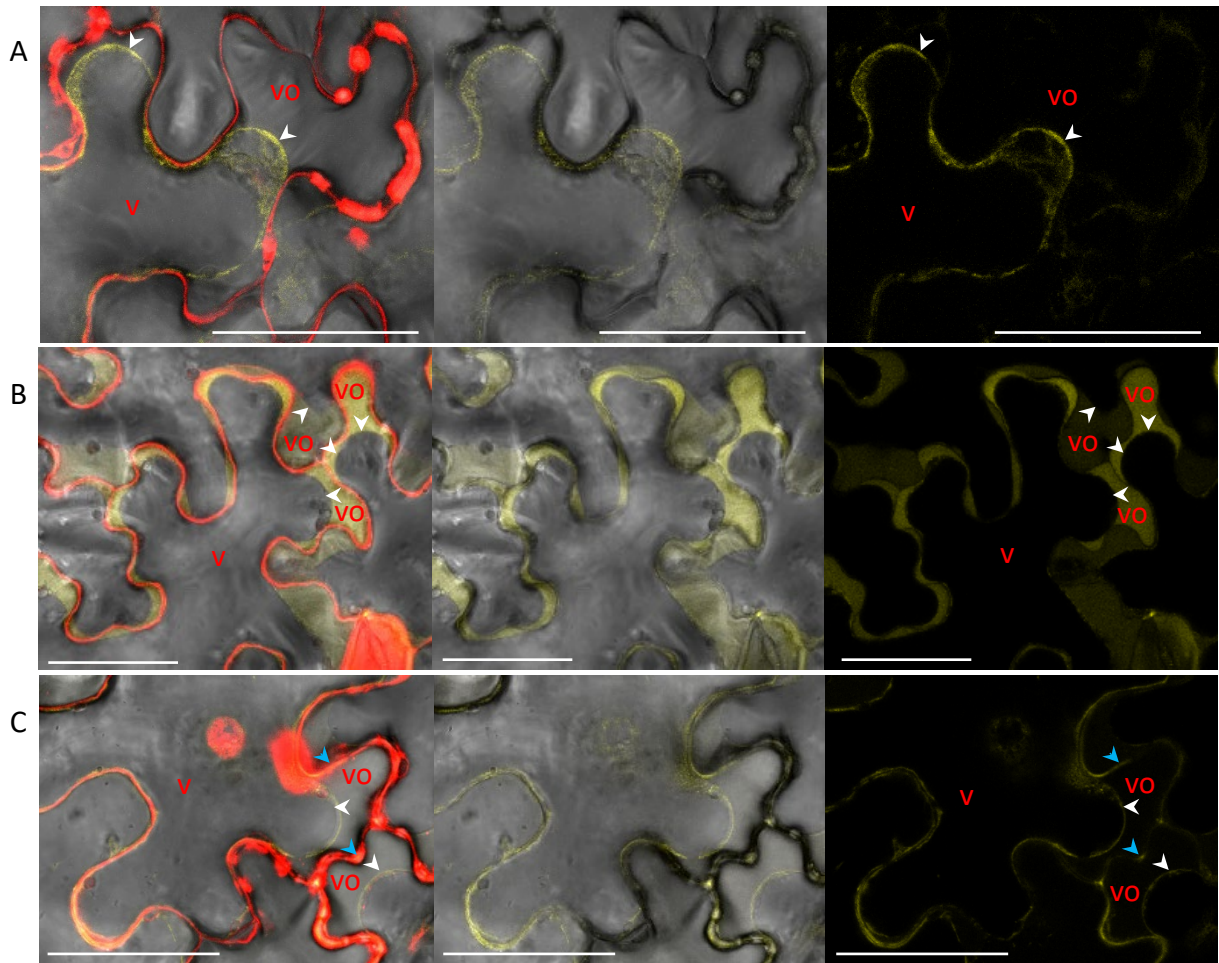


**Annexe 7 : Constructions 35S::PG-eYFP utilisées pour la transformation transitoire en feuilles de tabac.**



**Annexe 8 : Marquage 35S ::PG-eYFP (PG R et PG RAM pleine longueur) au niveau cellulaire et à l'apoplaste (en feuilles de tabac). v : vacuole. vo : vide optique. Tête de flèches blanches : membrane de la cellule plasmolysée. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m.**

35S::eYFP-PG AT3G48950



**Annexe 9 : Expression hétérologue et transitoire de la construction 35S :: eYFP-PG AT3G48950 en feuilles de tabac.** Marquage de la paroi à l'iodure de propidium (en rouge). v : vacuole. vo : vide optique. Tête de flèches blanches : membrane de la cellule plasmolysée. Tête de flèches bleues : marquage eYFP à la paroi. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m.

## Gène *AT3G06770.2*, orientation anti-sens

3' **aaatgaaactatctctcctttttattattaatggcttgtggaactgctgaaacaaaatttctttgtttacacatgaatgaagaatg**  
**aacctgtacagatttcttctcagaatgcaaacacataaaaataggaaccagaataaccgaaaggaacatgtatgctaaagaca**  
**atgtgtttacttggaaaagaactgaccttcttaactccacaaaatgaaatgattgatgaattgaaatcctacaaagaatccaagaa**  
**atgtttcttgcctttttttctttttcttttgcagctctgtttca** **CTA** **GACTGCAGCTCTACCGTAAGCATCAGCATCTCTCTTCAGCTC** **GG**  
**GACACGGTTCAGGAATGACTG** **>** **ACTCCGAGGACCCGTAACGTTAGGAGCATTGCCAAGAACAGAGAACCCTGAGCTCATCGACAAAGAAAC**  
**ATTCCGACAAAGTCACTGAGCTAAATGGAGATTCTTTGATCCCAACAATTTCCCGCAATGCCAATGTTCTCTCCAGAAATGTTGCTTAATC**  
**TGATGTGACTCACAAAGTGGGAGAGCATTACATCATATTTATCATCAGGGTGAGATCCAAAGCTACCATTAGCAACAATGGCAGTACCTATT**  
**CTCAACATATCGATGTTTGAATATCGATCTCTTTGATATAACCACCTCTGCCTTTTGTGGTCTAAAGGCAATGCCGGTTAACGAGTAGTG**  
**TATATGA** **[<GK061E08]** **GCGTTATCAACCACGACATCAGATATCCACCAGACATTTCACTGCCAAAGGAGATAGAGGAACCAGAGCTCC**  
**TCGAAGGTACACATTTCTATATGAACATTTTCAGTGGGACGAGAATAGGCAATTCATATTCATCCCAACCGCTTTTGAC** **<GGAAATCGCG**  
**TCATACCCACGT** **TAATGGTAGATTTTTGGATGCAGACGTAATCAGAAGAA** **ctgagaaacataacaaaacataagacatttcgcttctcta**  
**tgcttagacacacaaaaagggttttagtctagaagaagtagagacaactaacTGGTACAATACCGATTGTATAAGGAGATTTAGGAGAAG**  
**AATGGGCCAATATCTTATGAATATATACATGG** **ctgcacaaggacagtattagagtcacagactttatcattcaaaaaacaaaaaagggttg**  
**aggcctagatagtggtgaactatctcttca** **CTAGAGTAGATTGAATAGATTGAATAAGCAGGAGCATTCAAGACGTAAGATTGGAGACAAT**  
**TACATTTTCAGAAAGAACTCGATGAGGTGAGGACGTTATATCTTTAAGGAATGAGAAAGTAACCCGATCCCAACCAACCAAGCTTGAC**  
**CATCTATAGTTCCATTATCAC** **cctaaccaaggaaaaggatggagtaaccatattataaattgaaggatattgtaacaagtgaatgaaataa**  
**aatgtataaagcatagttgttac** **CTGTACAAACAATCATGTAGCTTGTACCGTTGATCAAACTCTTGTATCGCTTCCAGGCAAAATC**  
**AATTCCTTCCGTATGAAGTAAAGGATCAACCACTTCCCAATGCGATGGATC** **cctttgaaagtaaaaatttggggtttttggataaattta**  
**aaagtttgggataaagtgtgagaatgagaagaagcattgtaataac** **CTGAGAAGCGACTATAACGGCGCGGTTTTTCGAGAAAAGAGATGAG**  
**GTGGCTGGTGGGCTAAAACCTCCCGGTGAGCCAATGTCCCGCGGAACATAGAGCTGGGCCCCACCTTTGTCCGCGAAAGACATAAGATAGA**  
**AAACGGCGTTTTGAAACGCAAGAGTGTGAGCGTTTTGCATCTCCAACAGCTCCAAAACTGTAAATGGAGACACTGTGTGGTCTTGTACTC**  
**AAATGATCGCCGGCAAGTTCGTCGCATATTTCCCGCGCGGTGAACGTTTGGCTAAATGGGAATAACACTGGTTAATGCCAGTATCAAGAT**  
**TGTTACCAC** **ctgtcacaacagaagaactgagttagaattacagatcagagtttagaactgttcaactggttagaattccaaacggaatgtagaa**  
**aaatagagaagtaaatgtaaaagaaacgatgagaagaagcaattccgaaagggacaacctagaagaagaggtatgtaaatgtaagttgta**  
**gtaagagagaagcaaaaagagagaacgcacttac** **TGA** **CAT** **ccttattttgtaacgaagctgtcggataattaagagataaaaaagctataa**  
**agtgaagaacttttcgcccacaaatgtaaccagacactcagagagagagagagagaagaagaagaagaataaagaaggagaaggagaag**  
**agttctttcttctgtaaccacaccacacaaaacagtgaaggtttttttttttt** 5'

## Gène *AT3G15720.1*, orientation anti-sens

3' **CTA** **TCTAGCTAAAATATATGTAACCAAGAGATAAATGAACTAATATGGCAATATTGTAAACTCTAAGTTGTTTCCCTCTGCTTTGAAA**  
**AACCCATATTGGATCTTGCATCGGTTGTGTTGTTCTTGGTGCAGTATTGTGCCGACATGCAAGTTTGTCCAGCAATGGCCCGATG**  
**AAAACATATCTGTGAAAAGTTCTAAACATCTAGACCTGGTACAGCAATTTGATAGACGACCTCTCACGTTTTAAACACTGTCTTGTGCGACT**  
**TGCTCTGATCTGATGATGCGGTTTCTATTTTATGTCCTCAAGAAAATCTCTGTGCATGGAACCTCTCTCGTGCATCGGAAGTCAACACC**  
**GTACTCTGACTTTGACGTCCTCAATGAAATTAATAAACACCA** **CTTTGCTCACTTCCACTGCCGACG** **>** **Actacaaaaccgaacaaaaaactta**  
**aattttggta** **[SALK\_062374>]** **taaaaaacagctcttatgatcaagtaaatgtgagatacgtacCTTACGATCTTTGGCATTATCGGAAT**  
**CGCCACCGTTATAGAAGTGCATCGATTATGATGGATTTTCAACATGTCTAGAGTAATTCCATTGAAAGTAATCATTTCTCGGTAACCCGAT**  
**CCGCTctatgtatataataaccagaacttatttaaaagaacaagaaaagaacacatgtaaggtagactgaaacatgagagtttaataagaaa**  
**attcaaaagtaacctataCTGCCAAGTTTTGATCCGAGCTCCATTATAGTTCTCTTAAAGTTACAGTTTGGACACATACATTCTCCACTGT**  
**AGCTGTCTCTCCATCTTTCCCAAGCTTCTATGcattttacaataacatggtttatctatataatgtaaaacatagataaacatattttgta**  
**gtacatttttaatttggtttaacCTTAT** **<CCCATGGCTGGTCCGCACTA** **TACCGGAAATGTGGATGTTAGAGCTCCCCGAAATTAATCGCA**  
**ATGCAATCATCAC** **ctgtcaatgatgataaatcagtaaatccaaatgacattatttggataggacatttgggtggaccgtctattttgacatgt**  
**aaagattgcaatcacaacaaaccggttccaaaactgttttggttttcaataatgataataaattgagcaactaactgtattttgta**  
**aatttgccaagagctccaaaaatcgagtttattcatacCGGTGCGATGATGCAATCTGGATGACAACGTTGGATGAAGCCCTACGTCG**  
**ATCC** **ATCGGTGTAGGACTTGATTGAGGTG** **>** **CATTATTCTGACTGCTGAGATGGTC** **[SALK\_009840>]** **ACATAGTTGCATCTGATGTTAT**  
**GTGAATGTGAGCCATTGGACTATCTAAATGCGTTAACCCACTCAATCTAAGGTTGTTGACGCTCCTGAACCTCAATGC** **cctaattctcataaat**  
**cataattatctgtttttaaatttagctaaaactgcatacaaaacgaatcaatgttttgggaaaacaaacagctaacgtgataactcacGGTAG**  
**GCTAGAGCCTTTGTGTTCCACCAGCTCGAACCTGGCCGTTAATTT** **<ACCGTCACCTTCAATCACAAGTCCTT** **CAATGTCTGTAAAAAG**  
**AATCCATTGATCTTTTGCCTTTCCCAATTTCCCTTTTACTCGGTGCAACAGCTTGCCTAACAT** **ccttcaattaaattcaaaactgtaattac**  
**ttacttcaaaatattcgtcattaatccaaggaaaaaaacaggggaaaaacagagtagctGAACAAAAACAGGGGTGGATTGCAAGA**  
**CCCTTGAAACTTCAGGGGCTGTAACATAAATGTCATCCCTGCCGGAACGACAACTGCCATCTCTGTTCCGCTACACACAGCTTCCCAAG**  
**CTTTCAAGAACGCTttttgttttttaattccaggaaaaaaacttggatatttttaggaactttttcggattataatggacaaatgacaactac**  
**agaacttagtttttacCTGTGAATCGTCTGTAATCCATCTCAACCCGCTCCGAATGAGTAACATCCAATGCATTGCAAGATGTGAAGATT**  
**TGAAGAAAGAACAGTGAGAAATTCAGAACAAGTCTTCTTCT** **CAT** 5'

atcg : UTR

atcg : Intron

ATCG : Exon

[xxx] : ADN-T sens

[<xxx] : ADN-T antisens

[xxx] : insertion observé de l'ADN-T

SALK\_062374 : pg ram1

SALK\_009840 : pg ram3

ATCG : amorce anti-sens

<ATCG : amorce sens

**Annexe 10 : Sites d'hybridation des amorces pour la réalisation des PCR en point final, par rapport au lieu d'insertion des ADN-T des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3.**

## Gène *AT3G06770.2*, orientation anti-sens

3' **aaatgaaactatctctcctttttattattaatggcttgtggaactgctgaaacaaaatttctttgtttacacatgaatgaagaatg**  
**aacctgtacagatttcttctcagaatgcaacaacataaaatagggaaa** **<cagaataaccgaaaggaaca>** **tgatgatctaagaca**  
**atctgggttacttgagaaagaaatctgaccttctcactcccaaaatgaaatgattgatgaattgaaatcctatcaagaatcccaaga**  
**aatgtttcttgcctttttttctttttcttttgcagctgtttca** **CTA** **GACTGCAGCTCTACCCTAAGCATCAGCATCTCTTTCAGCTCG**  
**<GGACACGGTTCAGGAATGAC** **TGACTCCGAGGACCCGTAACCTAGGAGCATTGCCAAGAAACAGAAGAACTGAGCTCATCGACAAGAA**  
**CATTTCGACAAAGTCACTGAGCTAAATGGAGATTCCTTGTATCCCAACAATTTCCCGCAATGCCAATGTCTCTCCAGAAATGTTGCTTAAT**  
**CTGATGTGACTCACAAGTGGGAGAGCATTACATCATATTTATCATCAGGGTGAATGCCAAGCTACCATAGCAACAATGGCAGTACCTAT**  
**TCTCAACATATCGATGTTTGAATATCGATCTCTTTGATATAACCACCTCTGCCTTTTGTGGTCTAAAGGCAATGCCGGTTAACGAGTAGT**  
**GTATATGA** **<GK061E08** **GC** **TTTATCAACCACGACATCAGATATTCACCAGACATTTACTGCCAAGGAGATAGAGGAACCAGAAGCTC**  
**CTCGAAGGTACACATTTCTTATATGAACATTTTCAGTGGGACGAGAATAGGCAATTCATATTCACCAACCGCTTTTGGAGGAAATCGCG**  
**TCAATCCCAACGTTAATGGTAGAGTTTTGGATGCAGACGTAATCAGAAGAA** **Tctgagaaacatacaaaaacataaagacatttcgcttctcta**  
**tgcttagacacacaaaaagggttttagtctagaagaagtagagacaactaac** **CTGGTACAATACCGATTGTATAAGGAGATTTAGGAGAAG**  
**AATGGGCCAATATCTTATGAATATATACATGG** **ctgcacaaggacagatttagagtc** **caagactttatcattcaaaaaaacaaaaaagggttg**  
**aggcctagatagtggtgaactatctctta** **CTAGAGTAGATTGAATAGATTGAATAAGCAGGAGCATTCAAGACGTAAGATTGGAGACAAT**  
**TACATTTTCAGAAGAAAGAACTCGATGAGGTGAGGACGGTTATATCTTTAAGGAATGAGAAATGAGAACTCCCAACCAACCAAGCTTGAC**  
**CATCTATAGTTCCATTATCAC** **cctaaccaaggaaaaggatggagtaaccatattataaattgaaggatattgtaacaagtgaatgaaataa**  
**aatgtataaagcatagtttggta** **CTGT** **TACAACAACATCATGTAGCTTGTACCGTTGATCAAACTCTTGTATCGCTTCCAGGCAAAATC**  
**AATTCCTTCCGATGAAGGTAAGGATCAACCACTTCCCAATGCGATGGATC** **cctttgaaagtaaaatttggggtttttggataaattta**  
**aaagtttgggataaagtggagaatgagaagaagcattgtaataac** **CTGAGAAGCGACTATAACGGCGCCGTTTTTCGAGAAAGAGAGTGAG**  
**GTGGCTGGTGGGCTAAAACCTCCCGGTGAGCCAATGTCCCGGCGGAACATAGAGCTGGGCCCCACCTTTGTCCGCGAAAGACATAAGATAGA**  
**AAACGGCGTTTTGAAACGCAAGAGTGTGAGCGTTTTGCATCTCCAACAGCTCCAAAACTGTAAATGGAGACACTGTGTGGTCTTGTACTC**  
**AAATGATCGCCGGCAAGTTCGTCGCATATTTCCCGGCGCGTGAACGTTTGGCTAAATGGGAATAACACTGGTTAATGCCAGTATCAAGAT**  
**TGTTACC** **ctgctcaacagagaatctgagttagaattacagatcaaggtttgcaactggttagaattccagatcccaacggaaatgtagaa**  
**aaatagagaagtaaatgtaaaagaaacgatgagaagaagcaattccgaaagggacaacctagaagaagaggtatgtaaatgtaagtgta**  
**gtaagagagaagcaaaaagagagaacgcacttac** **TGA** **CAT** **ccttattttgtaacgaagctgtcggataattaaagagataaaaaagctataa**  
**agtgaagaacttttcgccc** **aatgtaaccagacactcagagagagagagagagaagaagaagaataaagaaggagaaggagaag**  
**agttctttcttctgtaaccacaccacacaaaacagtgaaggttttttttttt** 5'

## Gène *AT3G15720.1*, orientation anti-sens

3' **CTA** **TCTAGCTAAAATATATGTAACCAAGAGATAAATGAACTAATATGGCAATATTGTAACCTAAGTTGTTTCCCTCTGCTTTGAAA**  
**AACCCATATTGGA** **<CTTGCATCGGTTGTGTGT>** **TGTTCTTGGTTGCAGTATTGTGCCGACATGCAAGTTTGTCCAGCAATGCGCCGAT**  
**GAAAACATATCTGTGGAAAGTCTAAACATCTAGACCTGGTCCGCAATTTGATAGCAGCACCTCTCACGTTTAAACACT** **<GTCTCTGTGCGA**  
**CTTGTCTCT** **GATCCTGATGATGCCGTTTCTATTTTTCATGTCTCTCAAGAAAATCTCTGTGCATGGAACCTCTCTCGTGCATCGGAAGTCAACA**  
**CCGTACTCTGACTTTGACGTCCCAATGAAATTAATAACACCACCTTTGCTCACTTCCACTGCCGACG** **actcaaaaacccaacaaaaaactt**  
**aaattttgtta** **[SALK\_062374>** **ctaaaaacagtccttatgatcaagtaaaatttgagatacgtac** **CTTACGATCTTTGGCATTATCGGAA**  
**TCGCCACCGTTATAGAAGTATCGATTATGATTGGATTTTCAACATGTCTAGAGTAATTCATTGAAAGTAATCTCTCGCGTAACCCGA**  
**TCCGCC** **ctatgtatataataaccagaacttattttaaagaacaagaaaaagaacacatgtaaggtgactgaaacatgagagtttaataagaa**  
**aattcaaaagttacatactgccaagTTTTGATCCGAGCTCCATTATAGTTTCCCTTAAAGTTACAGTTTTGGACACATACATTTCTCCACTG**  
**TAGTGTCTCTCCATCTTTTCCCAAGCTTCCATG** **cattttcaatatacatagtttatctatataatgtaaaacatagataaacattttgt**  
**agtaacttttaattttgtaacttATCCCATGGCTGGTCCGCAATTTACCGGAAATGTGGATGTTAGACGCTCCCGAATTAATCGCA**  
**ATGCAATCATCAC** **ctgctcaatgatgataatcagtaaatccaaatgacattatttggataggacatttgggtggaccgtctattttgacatgt**  
**aaagattgcatcacaacacacaccggttccaaaactgttttggttttcaataatgataataaattgagccaactaactgtattttgta**  
**aatttgccaagagtcctcaaaaatcgagtttattcataacCGGTTGCGATGATGCAATCTGGATGACAACGTTGGATGAAGCCCCTACGTCG**  
**ATTTCCATCCGTTTAGGACTGATTCAGGTGCATTTATTCGATAGGCTTGAGATGGTC** **[SALK\_009840>** **ACATAGTTGCCTCGCTTATG**  
**TGAATGTGAGCCATTGGACTATCTAAATGCGTTAACCCACTCAATCTAAGGTTGTTGTCAGCTCCTGAACCTCAATGC** **ctaattctcataaattc**  
**ataattatcttgttttttaatttagctaaaactgcatacaaaacgaatcaatgttttgggaaaaacacagctaacgtgatactcac** **GGTAGG**  
**TCTAGAGCCTTTGTGTTCCCAACGCTCGAACCCCTGGCCGTTAATTTACCGTCACTTCAATCACAAGTCCCTCAATGTCTGTAAAAAGAA**  
**TCCATTGATCTTTGTCCTTCCCAATTTCCCTTTACTCGGTGCAACCAGCTTCCCTAACAT** **cttcaattaaattacaactagtaattactt**  
**acttcaaaaatattcgctcattaatataccaaggaaaaaaacaggggaaaaacagagtac** **CTGAACAAAAACAGGGGTGGATTGCAAGACC**  
**CTTGAAACTTCAGGGGCTGTAACATAAATGTCATCCCTGCCGGAACGACAACTGCCATCTCTGTTCCGCTACACACAGCTTCCCAAGCT**  
**TTCAAGAACGC** **cctttgttttttaattccaggaaaaaactttgatatttttaggaacttttccgattataatggcaaatgacaactacag**  
**aacttagttttac** **CTGTGAATCGTCTGTAACCTCCATCTCAACCGCTCCGAATTGAGTAACATCCAATGCATTGCAAGATGTGAAGATTTG**  
**AAGAAAGAACAGTGAAGAAATCAAGAACCAAGTCTTCTTCT** **CAT** 5'

atcg : UTR

atcg : Intron

ATCG : Exon

[xxx] : ADN-T sens

<xxx] : ADN-T antisens

[xxx] : insertion observé de l'ADN-T

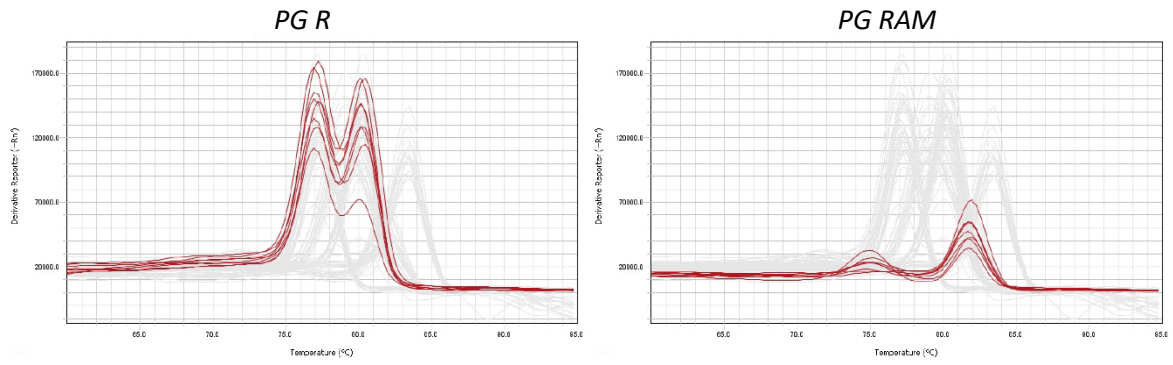
SALK\_062374 : pg ram1

SALK\_009840 : pg ram3

ATCG] : amorce anti-sens

<ATCG : amorce sens

**Annexe 11 : Sites d'hybridation des amorces pour la réalisation des RT-qPCR (PowerUp SYBR® Green Master Mix, ThermoFisher), par rapport au lieu d'insertion des ADN-T des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3.**



**Annexe 12 : Courbes de fusion des RT-qPCR réalisées sur de l'ADNc de Col-0 afin de quantifier les niveau d'expression des gène PG R et PG RAM. Les différentes courbes correspondent à l'amplification de l'ADNc de racines, hypocotyles, tiges, feuilles de tige, feuilles de rosettes, fleurs, bourgeons et siliques.**

### Gène *AT3G06770.2*, orientation anti-sens

3' **aaaatgaaactatctctctctttttattattaatggcttgtggaactgctgaaacaaaatttcttctgtttacacatgaatgaagaatg**  
**aacctgtacagatttcttctcagaatatgcaacaacataaaaaataggaaccagaataaccgaaaggaacatgtatgatctaaagaaa**  
**atgtgtttacttggagaaagactgaccttcttaactccacaacaaatggaatgattgatgaattgaaatccaaagaaatcccaagaa**  
**atgtttcttgcctttttttctttttctttttgagctctgtttca** **CTA** **GACTGCAGCTCTACCGTAAGCATCAGCATCTCTCTTCAGCTCGG**  
**GACACGGTTCAGGAATGACTGACTCCGAGGACCCGTAAACGTAGGAGCATTGCCAAGAAAACAGAAGAACCTGAGCTCATCGACAAAAGAAAACA**  
**TTCGACAAAGTCACTGAGCTAAATGGAGATTCTTTGATCCCAACAATTTCCCGCAATGCCAATGTTCTCCAGAAATGTTGCTTAATCT**  
**GATGTGACTCACAAAGTGGAGAGCATTACATCATATTTATCATCAGGGTGAGATCCAAAGCTACCATTAGCAACAATGGCAGTACCTATTCT**  
**TCAACATATCGATGTTTGAATATCGATCTCTTTGATATAACCACCTCTGCCTTTTGTGGTCTAAAGGCAATGCCGGTTAACGAGTAGTGT**  
**ATATGA** **[<GK061E08]** **GCGTTATCAACCACGACATCAGATATTTCCACCAGACATTTCACTGCCAAAGGAGATAGAGGAACCAGAAGCTCCT**  
**CGAAGGTACACATTTCTTATATGAACATTTTCAGTGGGACGAGAATAGGCAATTCATATTTCACTCCCAACCGCTTTTGAGGGAAATCGCGTC**  
**ATACCCCAACGTTAATGGTAGAGTTTGGATGCGACAGCTAATCAGAAATCTgagaacataacaaaacataaagacatttcgcttctctatg**  
**cttagacacaacaaaagggttttagtctagaagaagttagagacaactaacCTGGTACAATACCGATTGTATAAGGAGATTAGGAGAAGAA**  
**TGGCCCAATATCTTATGAATATATACATGGctgcacaaggacagattagagatcaagactttatcattcaaaaaacaaaaaagggttag**  
**gcctagatagtggtgaactatctctcctcCTAGAGTAGATTGAATAGATTGAATAAGCAGGAGCATTCAAGAACGTAAGATTGGAGACAATTA**  
**CATTTTCAGAAGAAAGAACTCGATGAGGTGAGGACCGTTATCTTTAAAGGAATGAGAAGTAAACCGATCCCA** **CCAAACCAAGCTTGACCA**  
**TCT>** **ATAGTTCATTATCAC** **ctaaccaagggaaaaggatggagtaaccatattataaattgaaggatattgtaaccaagtgaatgaatgaatga**  
**aatgtataaagcatagttgtttac** **CTGT** **TACAACAACA** **<TCATGTAGCTTGTACCGTTGATCAA** **ACTCTTGTATCGCTTCCAGGCAAAATC**  
**AATCCCTTCCGATGAAGGTAAGGATCAACCACTTCCCAATGCGATGGATCcttttgaagtaaaaatttgggggttttgggataaattta**  
**aaagtgtgggataaaatgtgagaatgagaagaagcattgtaataacCTGAGAAGCGACTATAACGGCCCGCTTTTCGAGAAAAGAGAGTGAG**  
**GTGGCTGGTGAAGCTAAAACCTCCCGGTGAGCCAAATGTCCCGCGGAACATAGAGCTGGGCCACCTTTGTGCGGAAAGACATAAGATAGA**  
**AAAGCGCTTTTGAACGCAAGAGTGTGAGCGTTTGCATCTCCAACAGCTCCAAAATCTGTATGGAGACACTGTGTGGTCTTGTACTC**  
**AATGATCGCCGGCAAGTTCGTCGCATATTTCCCGCGCGGTGAACGTTTGGCTAAATGGGAATAACACTGGTTAATGCCAGTATCAAGAT**  
**TGTTACCACctgtctacaacagaagaactctgagttagaattcagatcagagtttgaactgttcaactgtttagaattcgaacccaacggaatgtagaa**  
**aaatagagaagtaaatagttaaagaaacgatgaagaagcaattccgaaagggacaacctagaagaagaggtatgtaattgtaattgta**  
**gtaagagagaagcaaaagagagaacgcacttac** **TGACAT** **ctttatttgaacgaagctgtcggataattaaagagataaaaaagctataa**  
**agtgaagaacttttcgcccacaaatgtaaccagacactcagagagagagagagagaagaagaagaagaataagaaggagaaggagaag**  
**agttctttcttctgtaaccacaccacacaaaacagtgaaggtttttttttttt** 5'

### Gène *AT3G15720.1*, orientation anti-sens

3' **CTA** **TCTAGCTAAAATATATGTAACCAAGAGATAAATGAACTAATATGGCAATATTGTAAACTCTAAGTTGTTTCCCTCTGCTTTGAAA**  
**AACCATATTGGATCTTGCATCGGTTGTGTTGTTTCTTGGTGCAGTATTGTGCCGACATGCAAGTTTGTTCAGCAATTGGCCCGATG**  
**AAAACATATCTGTGGAAGTCTAAACATTCTAGACCTGGTAGCAATTTGTAGACGCACCTCTCACGTTTAAACACTGTCCCTGTGCGACT**  
**TGCTCTGATCTGATGATGCCGTTTCTATTTTCATGTCTCTCAAGAAAATCTCTGTGCATGGAACCTCTCTCGTGCATCGGAAGTCAACACC**  
**GTACTCTGACTTTGACGTCCCAATGAAATTAATA** **ACACCCTTTGCTCACTTCCA** **>CTGCCGACGA** **ctacaaaaccgaacaaaaaactta**  
**aattttgtta** **[SALK\_062374>]** **ttaaaaaacgtcttatgatcaagtaaatgtgagatacgtac** **CTTACG** **<ATCTTTGGCATTATCGGAA**  
**TCCG** **CACCGTTATAGAACTGATCGATTATGATTGGATTTTCAACAGCTTGCTFAGAGTAATTCATTGAAAGTAATCATTTCTCGGTAAACCCGA**  
**TCCGCCctatgtatataaccagaacttatataaagaacaagaaaaagaacacatgtaaggtgactgaaacatgagagtttaataagaa**  
**aattcaaaagtaacctataCTGCCAAGTTTGTATCCGAGCTCCATTATAGTTTCCCTTAAAGTTACAGTTTTGGACACATACATTCTCCACTG**  
**TAGTGTCTCTCCATCTTTTCCCAAGCTTCCATG** **catttttcaacatacatagtttatctatataatgtaaaacatagataaacattttgt**  
**agtaacttttaatttggtaacttTATCCCATGGCTGGCTTACCAATCTATACCGGAAATGTGGATGTTAGACCTCCCGAATTAATCCGCA**  
**ATGCAATCATCACctgtcaatgatgataatcagtaaatccaaatgacattatttggataggacatttgggtggaccgtctattttgacatgt**  
**aaagattgcattcacaacaccggtccaaaactgtcttttcaataatgataataaattgagcaactaactgtattttgta**  
**aatttgcgaaggtctcaaaaactcgagtttattcataacCGGTGCGATGATGCAATCTGGATGACAACGTTGGATGAAGCCCCTACGTCG**  
**ATTCATCGGTGTTAGACTTGATTGAGGTGCATTTATTCCAGCTTGATGATGGT** **[SALK\_009840>]** **ACATAGTTGCACCTCGCTTATG**  
**TGAATGTGAGCCATTGGACTATCTAAATGCGTTAACCCACTCAATCTAAGGTTGTTGCAGCTCCTGAACCTCAATGC** **ctaattctcataaatc**  
**ataattatcttgtttttaaatttagctaaaactgcatacaaaacgaatcaatgttttgggaaaaacacagctaacgtgatactcacGGTAGG**  
**TCTAGAGCCCTTGTGTTCCCAACGCTCGAACCCCTGGCCGTTAATTTACCGCTCACCTTCAATCACAAGTCCCTCAATGTCTGTAAAAAGAA**  
**TCCATTGATCTTTGCCCTTCCATTTCCATTTGCTTCCGTTGCTGCAAGCTTGCCTAACATcttcaattaatacaactagtaattctt**  
**acttcaaaaatattcgctcattaatccaaggaaaaaaaacaggggaaaaacagagtacCTGAACAAAACAGGGGTGGATTGCAAGACC**  
**CTTGAAACTTCAGGGGCTGTAAACATAAATGTCATCCCTGCCGAACGACAACTGCCCATCTCCTGTTCCGTTACACACAGCTTCCCAAGCT**  
**TTCAAGAACGCTttttgttttttaattccaggaaaaaactttgatatttttaggaacttttccgattataatggcaaatgacaactacag**  
**aacttagttttacCTGTGAACTGCTGTAACCTCCATCTCAACCCGCTCCGAATTGAGTAACATCCAATGCATTGCAAGATGTGAAGATTTG**  
**AAGAAAGAACAGTGAGAAATCAAGAACCAAGTCTTCTCTT** **CAT** 5'

atcg : UTR

atcg : Intron

ATCG : Exon

[xxx] : ADN-T sens

<xxx> : ADN-T antisens

[xxx] : insertion observé de l'ADN-T

SALK\_062374 : pg ram1

SALK\_009840 : pg ram3

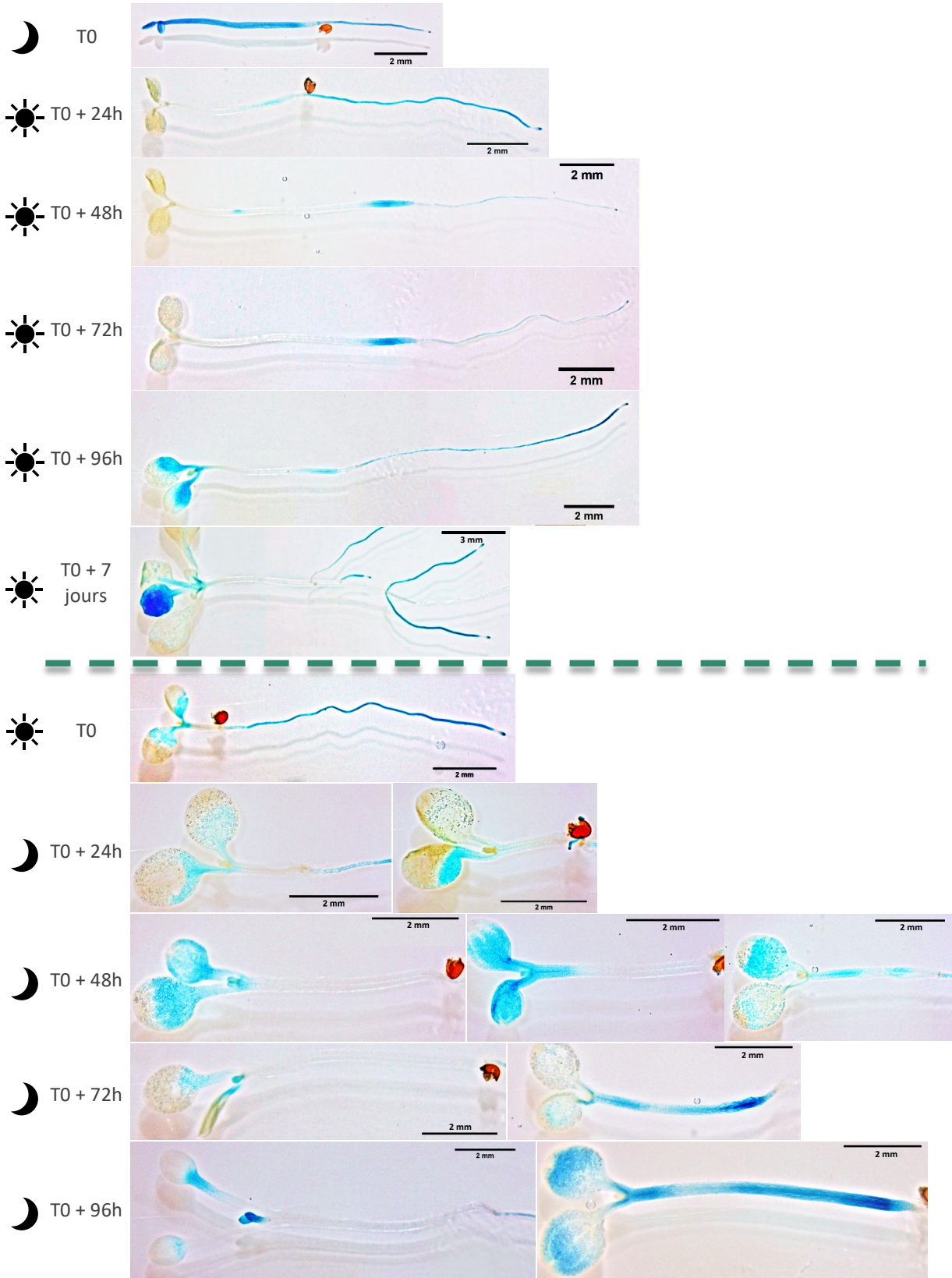
ATCG> : amorce anti-sens

<ATCG : amorce sens

ATCG : sonde TaqMan porteur du fluorophore « FAM » et du quencher

**Annexe 13 : Sites d'hybridation des amorces pour la réalisation des RT-qPCR (TaqMan, ThermoFisher), par rapport au lieu d'insertion des ADN-T des mutants pg r, pg ram1 et pg ram3.**

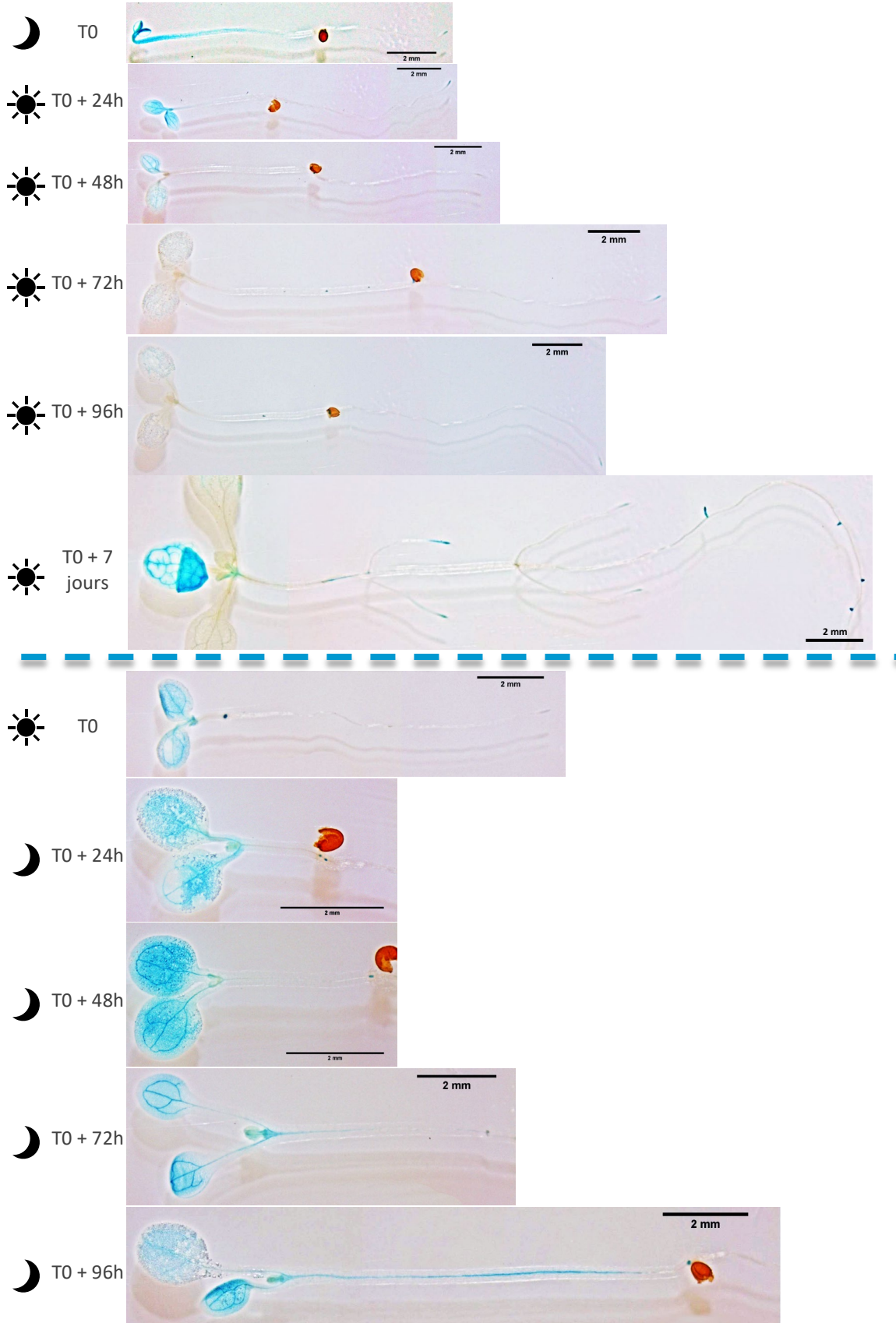
PromPG R::GUS



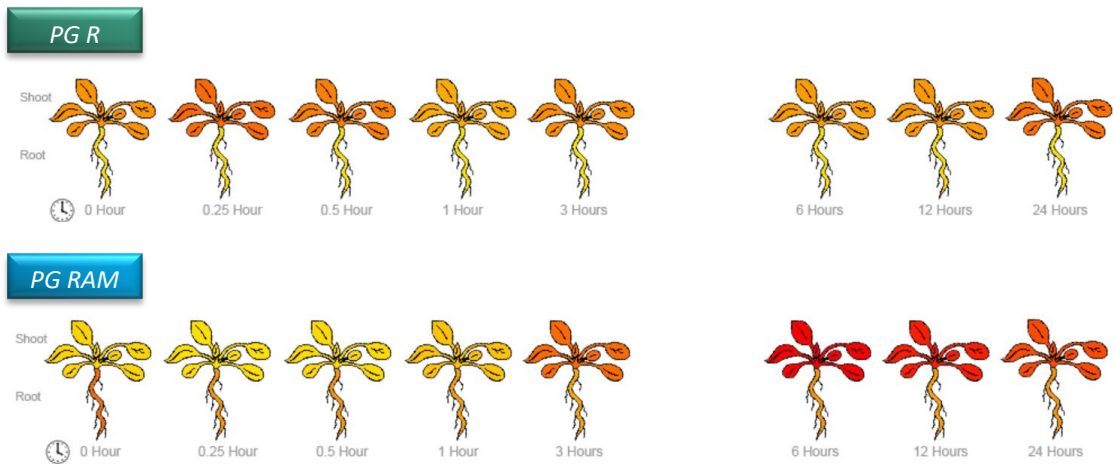
**Annexe 14 : Motif d'expression GUS du gène PG R après passage de plantules de 5 jours à l'obscurité (symbolisée par une lune) ou après passage d'hypocotyles étioilés de 3 jours à la lumière (symbolisée par un soleil).**



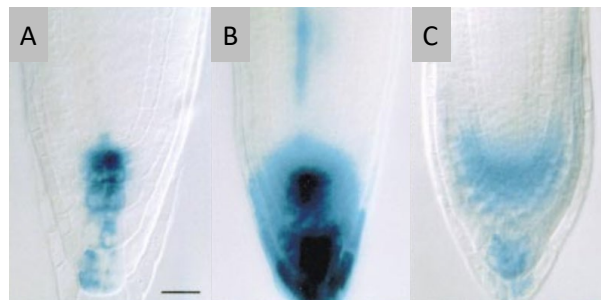
PromPG RAM::GUS



**Annexe 15 : Motif d'expression GUS du gène PG RAM après passage de plantules de 5 jours à l'obscurité (symbolisée par une lune) ou après passage d'hypocotyles étioles de 3 jours à la lumière (symbolisée par un soleil).**



**Annexe 16 : Expression des gènes PG R et PG RAM suite à des blessures.** D'après l'Arabidopsis EFP Browser ; <https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>.



**Annexe 17 : Expression de l'élément de réponse à l'auxine DR5::GUS.** Expression du gène rapporteur DR5::GUS au niveau de la columelle de racines de plantules 4 jours après germination. A) Coloration GUS pendant 30 min. B) Coloration GUS pendant 16 h. C) Culture 4 jours après germination sur un milieu comportant 10 μM de NPA. Barre d'échelle : 25 μm. D'après Sabatini et al. (1999).

**PG R**

Name: Sequence Length: 449  
 PGRMSVVTILILALTSVPIYANVHGAGKICDELGRRSLSTRPHSVSITDFGAVGDGKTLNTLAFQNAV FYLMSFADKGG 80  
 AQLYVPPGHWLTGFSFLTSHLTLFLENGAVIVASQDP SHWEVVDPLPSYGRGIDLPGKRYKSLINGNKLHDVVVTGDNGT 160  
 IDGQGLVWWRPFTSHSLKYNRPHLIEFLSSENVIVSNLTFLNAPAYSISYSSHVYIHKILAHSSPKSPYTI GIVPDSS 240  
 DYVCIQNSTINVGYDAISLKSQWDEYGLAYS RPTENVHIRNVYLRGASGSSISFGSEMGGISD VVVVNAHIHYSLTGIA 320  
 FRPTKGRGGYIKEIDISNIDMLRIGTAIVANGSFGSHPD DKYDVALPLVSHIRLSNISGENIGIAGK LFGIKESPFSSV 400  
 TLSNVSLSMSSGSSVSWQCSYVYGSSSESVIPEPCPELKR DADAYGRAAV  
 ..... 80  
 .....N..... 160  
 .....N..... 240  
 .....N..... 320  
 .....N..... 400  
 .....N..... 480

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	158 NGTI	0.6386	(7/9)	+
Sequence	197 NLTF	0.5024	(5/9)	+
Sequence	247 NSTI	0.4713	(6/9)	-
Sequence	351 NGSF	0.3571	(9/9)	--
Sequence	377 NISG	0.5643	(7/9)	+
Sequence	404 NVSL	0.5200	(4/9)	+

**PG RAM**

Name: Sequence Length: 461  
 PGRAMMKKKTWFLNLSLFFLQIFTSSNALDVTFGAVGDGVTDDSQAFKAWAVCSGTGDGQFVVPAGM TFMQLPKFQ 80  
 GSCKSTPVFVQMLGKLVAPSKGNWKGDQWILFTDIEGLVIEGDGEINGQSSWWEHKSRPTALKFRSCNNLR LSGLT 160  
 HLDSPMAHIHISECNYVTISSLRINAPESPNTDGDIDVGASSNVVIQDCI IATGDDCIAINSGT SNIHISGIDCGPGHGI 240  
 SIGSLGKDGETA TVENVCVQNCNFRGTMNGARIKTWQGGSGYARMITFNGITLDNVENPIIIDQFYNGGSDNAKDRKSS 320  
 AVEVSKVVSFNSPIGTSKSEYGVDFRCSE RVPCTEIFLRDMKIETASSGSGVQVQVQCLNVRGASTIAVPGLECLELSTDM 400  
 FSSAQLLEQTCMSAQSVQPRTTTQPMQDPIWVVFQSRGKQLRVYNIAILVSFISLVTTYILAR  
 .....N..... 80  
 ..... 160  
 ..... 240  
 ..... 320  
 ..... 400  
 ..... 480

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	14 NFSL	0.7501	(9/9)	+++

**Annexe 18 : Prédiction de sites de N-glycosylations chez PG R et PG RAM.** Les séquences Asn-Xaa-Ser/Thr sont représentées en bleu, et les asparagines prédites pour porter des N-glycosylations sont indiquées en rouge. D'après NetNGlyc 1.0 Server ; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.



**Annexe 19 : Pistil d'un transformant promPG R::GUS, lignée 1.9. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.**

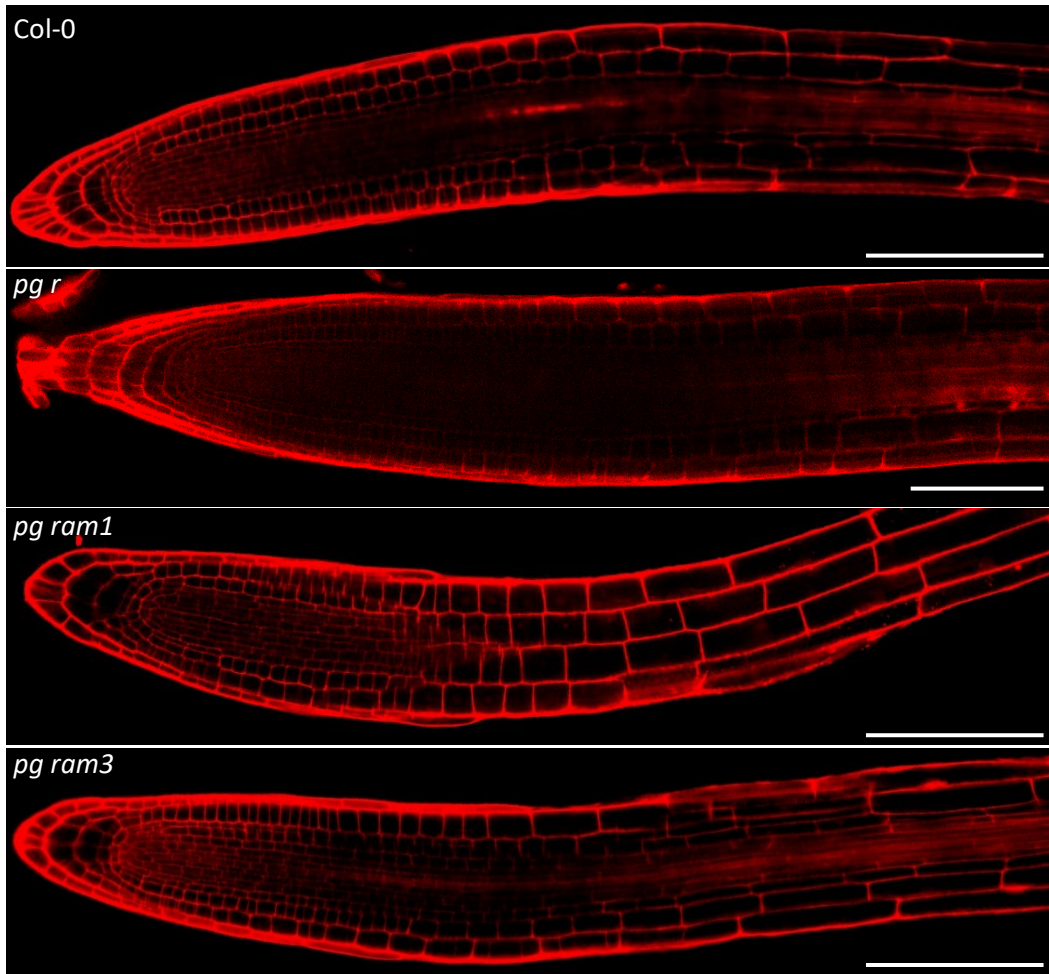
Col-0



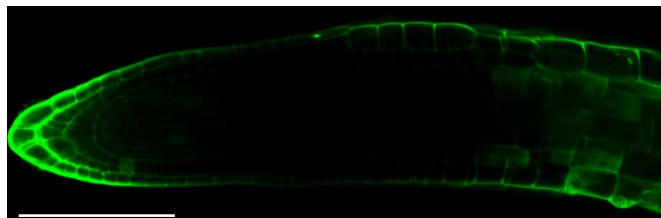
Mutant *pg r*



**Annexe 20 : Racines de sauvage (Col-0) et du mutant *pg r* observées à la loupe binoculaire. Les poils absorbants des racines du sauvage ainsi que du mutant *pg r* semblent identiques. Barres d'échelles : 1,4 mm.**



**Annexe 21 : Apex racinaires du sauvage (Col-0), du mutant *pg r* et des mutants *pg ram* colorés à l'iodure de propidium. Barres d'échelle : 100  $\mu$ m.**



**Annexe 22 : Résultat préliminaire du marquage de l'apex racinaire par la sonde  $COS^{488}$  (racine fraîche de sauvage). Sonde de Mravec et al. (2014). Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.**



## Résumé

La paroi des cellules végétales subit des modifications afin de s'assouplir ou de se rigidifier selon les besoins de la plante. Cette paroi est une structure complexe, composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines. Les modifications subies par les pectines au cours de l'élongation cellulaire sont encore assez peu caractérisées. Dans ce contexte, le but de ce projet est d'étudier le rôle de deux polygalacturonases (PG) dans le développement racinaire de la plante modèle *A. thaliana*. Les PG sont des enzymes de dégradation des homogalacturonanes (HG), le composant pectique majoritaire de la paroi primaire. Notre hypothèse est que les PG dégradent partiellement les HG des parois longitudinales des cellules racinaires en élongation. Cette dégradation engendrerait un assouplissement pariétal localisé, permettant la croissance anisotrope des cellules. Nos résultats indiquent que les gènes des deux PG étudiées, nommés *PG ROOT APICAL MERISTEM (PG RAM)* et *PG ROOT (PG R)* sont exprimés de façon complémentaire dans la racine, l'un dans le méristème racinaire (PG RAM), et l'autre dans la zone d'élongation et de différenciation (PG R). De plus, la sur-expression de la protéine PG R entraîne une augmentation de l'élongation des hypocotyles étiolés, ainsi qu'une augmentation de la densité de racines latérales par rapport au sauvage, démontrant son rôle dans le développement racinaire et dans l'allongement cellulaire. Enfin, nous avons démontré que l'expression des gènes de ces PG était contrôlée de façon différentielle par les facteurs de transcription de la famille PLETHORA (PLT).

**Mots clefs :** polygalacturonase (PG), homogalacturonan (HG), *PG ROOT APICAL MERISTEM (PG RAM)*, *PG ROOT (PG R)*, développement racinaire, croissance anisotrope, PLETHORA (PLT).

### Roles of polygalacturonases (PG) in *Arabidopsis thaliana* root development

Plant cell wall structure is modified to control its stiffness or flexibility according to plant's requirements. The cell wall is a complex structure, composed of cellulose, hemicelluloses and pectins. Pectin modifications during cellular elongation are not very well characterized. In this context, the aim of this project is to study the roles of two polygalacturonases (PG) in the root development on the model plant *A. thaliana*. PG are homogalacturonans (HG) degradation enzymes, HG being the major pectic component of the primary cell wall. This degradation would lead to a local parietal relaxation, allowing anisotropic growth of the cells. Our results show that the two studied PG, named *PG ROOT APICAL MERISTEM (PG RAM)* and *PG ROOT (PG R)*, are expressed in complementary areas of the root, either in the root apical meristem (PG RAM) or in the elongated and differentiated root tissues (PG R). Furthermore, the over-expression of PG R results in longer etiolated hypocotyls and increases root density when compared to wild-type, demonstrating its function in root development and in cell elongation. Finally, we demonstrated that expression of these two PG genes is under the control of PLETHORA (PLT) family transcription factors, by differentially ways.

**Key words :** polygalacturonase (PG), homogalacturonan (HG), *PG ROOT APICAL MERISTEM (PG RAM)*, *PG ROOT (PG R)*, root development, anisotropic growth, PLETHORA (PLT).