



**HAL**  
open science

# Utilisation de petites molécules et d'enzymes afin de perturber la croissance polarisée et l'adhésion des tubes polliniques.

Ferdousse Laggoun

► **To cite this version:**

Ferdousse Laggoun. Utilisation de petites molécules et d'enzymes afin de perturber la croissance polarisée et l'adhésion des tubes polliniques.. Génétique des plantes. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR081 . tel-03899861

**HAL Id: tel-03899861**

**<https://theses.hal.science/tel-03899861v1>**

Submitted on 15 Dec 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.



Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

**Utilisation de petites molécules et d'enzymes afin de perturber la croissance polarisée et l'adhésion des tubes polliniques**

Présentée et soutenue par  
**Ferdousse LAGGOUN**

Thèse soutenue publiquement le 13 décembre 2017  
devant le jury composé de

Mme. Hayat EL MAAROUF- BOUTEAU	Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6	Rapporteur
Mr. Jérôme PELLOUX	Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne, Amiens	Rapporteur
Mr. Denis FALCONET	Chargé de recherche, Université Grenoble Alpes, Grenoble	Examineur
Mme. Valérie LEFEBVRE	Maître de conférences, Université de Picardie Jules Verne, Amiens	Examineur
Mme. Marie - Pascale PRUD'HOMME	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie, Caen	Examineur
Mme. Isabelle BOULOGNE	Maître de conférences, Université de Rouen Normandie, Rouen	Examineur
Mr. Jean-Claude MOLLET	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie, Rouen	Directeur
Mr. Arnaud LEHNER	Maître de conférences, Université de Rouen Normandie, Rouen	Co-encadrant

Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale EA4358



Normande de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement





# THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

**Utilisation de petites molécules et d'enzymes afin de perturber la croissance polarisée et l'adhésion des tubes polliniques**

Présentée et soutenue par  
**Ferdousse LAGGOUN**

Thèse soutenue publiquement le 13 décembre 2017  
devant le jury composé de

Mme. Hayat EL MAAROUF- BOUTEAU	Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6	Rapporteur
Mr. Jérôme PELLOUX	Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne, Amiens	Rapporteur
Mr. Denis FALCONET	Chargé de recherche, Université Grenoble Alpes, Grenoble	Examineur
Mme. Valérie LEFEBVRE	Maître de conférences, Université de Picardie Jules Verne, Amiens	Examineur
Mme. Marie - Pascale PRUD'HOMME	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie, Caen	Examineur
Mme. Isabelle BOULOGNE	Maître de conférences, Université de Rouen Normandie, Rouen	Examineur
Mr. Jean-Claude MOLLET	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie, Rouen	Directeur
Mr. Arnaud LEHNER	Maître de conférences, Université de Rouen Normandie, Rouen	Co-encadrant

**Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale EA4358**

## ***REMERCIEMENTS***

Tout d'abord, j'aimerais remercier tous les membres du jury de me faire l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse, en particulier Pr. Jérôme Pelloux et le Pr. Hayat El-Maarouf Bouteau d'avoir accepté d'être mes rapporteurs.

Je remercie les Pr. Patrice Lerouge et Pr. Azeddine Driouch pour avoir bien voulu m'accueillir au sein du laboratoire pour mes stages et pour mon doctorat.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Pr. Jean-Claude Mollet, pour son encadrement, pour sa confiance sur le projet et pour m'avoir permis d'avoir une certaine autonomie. Mais également pour tout ce qu'il m'a apporté au cours de ces quatre années notamment ses connaissances sur le pollen, mais également ses compétences en recherche et en rédaction.

Je remercie également mon co-encadrant de thèse, Dr. Arnaud Lehner, pour son encadrement, pour son aide et son intérêt constant tout au long de ma thèse et pour tout ce qu'il a su me transmettre comme compétences. Mais aussi d'avoir été très présent pour me préparer à mes enseignements en apportant son expérience et ses conseils.

Je remercie également Flavien, mon prédécesseur sur le projet, pour avoir pris le temps de me préparer pour mon concours, de m'orienter et de répondre à mes questions.

Je remercie également ma petite Marie pour avoir toujours été présente pour m'aider au début de ma thèse. Merci également pour tes conseils, ta gentillesse et particulièrement pour ton amitié.

Je remercie particulièrement Jérémy, mon poussin, très présent sur ma thèse durant ma dernière année, pour le travail que tu as effectué sur mes données, pour tes idées, tes conseils, mais aussi pour ton amitié.

Je remercie tous mes collègues : aussi bien les permanents et les post-doctorants. Merci d'avoir su créer un environnement de travail si enrichissant axé sur l'échange et la convivialité. Je n'ai hélas pas assez de papier pour tous vous décrire et vous remercier mais le cœur y est !

A Alain, que je remercie pour son aide et pour nos conversations sur le degré de méthyestérification des pectines. Mais pas seulement, merci de m'avoir montré qu'on peut imaginer de nouvelles choses en sciences et utiliser la créativité pour innover! J'ai également beaucoup apprécié nos discussions sur l'art, la littérature et les voyages : une vraie bouffée d'air frais!

Je remercie particulièrement, Muriel, Bruno, François et Gaëtan pour leur aide sur la partie GC, SEC et PACE, ainsi que pour leurs conseils.

A mes collègues de bureau, ma Rousse et Pilou..... Aux doctorants actuels, Rominet, chouchou, Marcus, Alexis, Yohanna,... A ceux qui sont partis, Rimounette... Ou à ceux qui sont partis puis revenus, Barbie, Max, Abdoul... A ceux que j'ai oublié de citer aussi ..... Pour les heures passées en votre compagnie à la paillasse, pour tous ces protocoles échangés, pour m'avoir toujours aidé.... Merci!

A mes amies Sosso, Galou et Alinette que ce soit au laboratoire ou ailleurs, je sais que je peux toujours compter sur vous et j'espère qu'un jour je pourrais vous rendre tout ce que vous m'avez apporté.

A ma Rosie (miss Bulgarie) : toujours détendue et calme à mon antipode, avec ton originalité, ton imagination, ta sagesse et ton authenticité.

A Hilal (même à l'autre bout de la mer!) : Tu es la preuve vivante que rien ne peut compromettre des liens aussi forts qu'une véritable amitié, encore moins la distance!

A Lyes (je m'abstiendrais de faire des commentaires!) et à Mina : Le duo de choc! Que ce soit pour faire les garde-malades ou pour passer du temps ensemble et avoir des crampes d'estomac à force de rire (un clin d'œil à Djakou, Camélia et Malika! Be free....) et merci surtout pour votre écoute, vos conseils (oui, Lyes...) et votre amitié.

A Fatah, pour tes débats politiques sans fin et surtout (surtout) pour ta délicieuse cuisine traditionnelle qui me manque terriblement!

A Imene (Coach sportif) que ce soit pour courir ensemble sur les quais ou pour prendre un café : merci pour ton amitié!

A Sandy, même avec 7 heures de décalage, on a toujours trouvé le moyen de communiquer : heureuse de toujours te compter parmi les miens!

A Sarah (ma poupée) : Même si tu es à Paris, pour moi tu seras toujours à Rouen et dans mon cœur.

Je suis chanceuse car vous n'êtes pas que mes amis, vous êtes aussi ma famille!

Et pour finir (comme on dit en anglais « the last but not the least »), à mes parents : pour tous vos sacrifices depuis notre plus jeune âge pour qu'on puisse réussir, je vous dédie ce travail, c'est le moins que je puisse faire et je vous remercie de m'avoir conduit jusqu'ici avec amour, courage et tendresse. Merci de m'avoir appris à ne reculer devant rien, à ne jamais baisser les bras et à ne jamais abandonner.

A mes sœurs, Mimi et Biba: pour tous nos souvenirs, pour les moments passés ensemble (que ce soit Ed ou les spartiates) et pour avoir toujours su trouver les mots justes quand ça n'allait pas, c'est le rêve de chaque personne sur cette terre d'avoir des sœurs comme vous!

A mon petit frère Adilou: Je suis partie depuis 7 ans, chaque fois que je reviens à la maison tu es plus grand et j'ai du mal à te reconnaître. Mais la chaleur de ta voix et ta joie de vivre contagieuse n'ont jamais changé. Merci, mon petit cœur, d'être notre rayon de soleil et de m'avoir appris du haut de tes 16 ans que le stress n'a pas de raison d'être!

## LISTE DES ABREVIATIONS

ABPs : .....	actin-binding proteins
AGPs : .....	arabinogalactan proteins
AIR : .....	résidus insolubles dans l'alcool
Ara : .....	arabinose
CRIBs : .....	Cdc42/Rac-interactive binding
CRPs : .....	cystein rich peptides
DM ou DME : .....	degré de méthylestérification
DMSO : .....	diméthylsulfoxyde
DP : .....	degré de polymérisation
F : .....	fraction
FAO ou ROS : .....	formes actives de l'oxygène
Gal : .....	galactose
GalA : .....	acide galacturonique
GC : .....	chromatographie en phase gazeuse
Glc : .....	glucose
GPI : .....	glycosylphosphatidylinositol
GT : .....	glycosyltransferase
HGs : .....	homogalacturonanes
LTPs : .....	lipid transfer proteins
Mal : .....	maltose
Man : .....	mannose
MG : .....	milieu de germination
MGDG : .....	monogalactosyldiacyl glycérol
MGU : .....	unité germinative mâle
NO : .....	oxyde nitrique
NOX : .....	NADP(H) oxidase
O : .....	ovule
PACE : .....	analyse de polysaccharides sur gel d'électrophorèse
PG : .....	grain de pollen
PGase : .....	polygalacturonase
PMEs : .....	pectins methylesterases

PMEIs : .....	PME inhibitors
PM ou MW : .....	poids moléculaire
PT : .....	tube pollinique
RG-I/II : .....	rhamnogalacturonane-I/II
Rham : .....	rhamnose
RICs : .....	Rop-interactive CRIB motif-containing proteins
RLKs : .....	receptor-like kinases
ROP1 : .....	Rho GTPase 1
SCA : .....	Stigma/Style Cystein-rich Adhesin
SEC : .....	chromatographie d'exclusion stérique
SI : .....	rejet du soi
TT ou TTE : .....	tissu de transmission femelle
WAKs : .....	cell-wall associated kinases
XyG : .....	xyloglucane
Xyl : .....	xylose



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de reproduction des Angiospermes.....	2
Figure 2: Anatomie d'une fleur d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
Figure 3 : Représentation schématique d'un style creux chez le lys .....	4
Figure 4 : Représentation schématique d'un style plein chez <i>A. thaliana</i> et coloration d'un stigmate à l'aniline bleue mettant en évidence des tubes polliniques dans le tissu de transmission.....	5
Figure 5 : Principales étapes permettant la formation des différentes cellules du sac embryonnaire. ....	6
Figure 6 : La microsporogénèse et la microgamétogénèse.....	7
Figure 7 : Structure de la paroi du grain de pollen. ....	8
Figure 8 : Grains de pollen de <i>Lilium auratum</i> , <i>Helianthus annuus</i> et <i>Ricinus communis</i> observés en microscopie électronique à balayage.....	9
Figure 9 : Tube pollinique de tabac en microscopie photonique montrant les différentes régions et de lys en microscopie électronique à transmission .....	13
Figure 10 : Schéma représentatif de la structure du tube pollinique montrant la participation des filaments d'actine dans le mouvement des différents organites. ....	16
Figure 11 : Explosion d'un tube pollinique <i>LAT52-GUS</i> entrant dans une synergide au niveau de l'ovule.....	20
Figure 12 : Représentation schématique de la structure de la paroi végétale .....	24
Figure 13 : La paroi du tube pollinique d' <i>A. thaliana</i> .....	24
Figure 14 : Représentation schématique de la structure de la cellulose. ....	25
Figure 15 : Coloration d'un tube pollinique d' <i>A. thaliana</i> à l'aniline bleue, observé au microscope à épifluorescence.....	27
Figure 16 : La composition des chaînes latérales de XyG et leurs diversités.....	29
Figure 17 : Représentation schématique de la structure « boîte à œuf » des HG. ....	32
Figure 18 : Représentation schématique de la structure du RG-I et de ses chaînes latérales. ....	34
Figure 19 : Représentation schématique de la structure du RG-II et de sa dimérisation avec un atome de bore .....	35
Figure 20 : Représentation schématique de la structure des AGPs. ....	37
Figure 21 : Adhésion d'un grain de pollen sur un stigmate humide ou sur un stigmate sec .....	45
Figure 22 : Comparaison entre la génétique chimique directe et inverse.....	48

Figure 23 : Structure des molécules isolées lors du criblage.....	58
Figure 24 : Structure of the compounds selected during the chemical screen.....	77
Figure 25 : Dose-response effect of the compounds on <i>Arabidopsis thaliana</i> pollen tube phenotypes and length. ....	80
Figure 26 : Effect of the selected concentrations of the compounds on pollen tube diameters .....	82
Figure 27 : Effect of the compounds on anion superoxide production. ....	83
Figure 28 : Effect of the compounds on the time-course of ROS production using CM-H <sub>2</sub> DCFDA staining .....	84
Figure 29 : Effect of the compounds on callose plug deposition after 6 h of treatment.....	85
Figure 30 : Cell surface immuno-labeling of epitopes associated with weakly methylesterified homogalacturonan and arabinogalactan proteins using LM19 and LM2 .....	86
Figure 31 : Effect of the compounds on actin filament and RIC4 dynamics using pollen tubes expressing <i>Lifect-mEGFP</i> and <i>CRIB4-GFP</i> .....	89
Figure 32 : Size exclusion chromatography profile of dextrans (2000, 500 and 10 kDa) and GalA (0.19 kDa). ....	122
Figure 33 : Imidazole extracts are promoting pollen tube adhesion.....	123
Figure 34 : Removal of starch in the AIR and in the imidazole extract did not disrupt the adhesive property of the imidazole extract.....	124
Figure 35 : Monosaccharide composition of the imidazole extract.....	125
Figure 36 : PGase treatment disrupts pollen tube adhesion and RG-I backbone and RG-II alone do not promote pollen tube adhesion.....	126
Figure 37 : Size exclusion chromatography of <i>A. thaliana</i> seed mucilage, untreated imidazole extract and treated with PGase .....	127
Figure 38 : PACE analysis of the imidazole extract treated with PGase. ....	128
Figure 39 : <i>Endo</i> -(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase treatment of the imidazole extract did not modified pollen tube adhesion but $\alpha$ -L-arabinofuranosidase partially reduces pollen tube adhesion. ....	129
Figure 40 : Monosaccharide composition of the imidazole extract treated with <i>endo</i> -(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase and with $\alpha$ -L-arabinofuranosidase .....	130
Figure 41 : Immunoblot labeling of the untreated and treated with <i>endo</i> -(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase imidazole extracts using LM6, LM13 and LM16. ....	131
Figure 42 : <i>Endo</i> -(1,4)- $\beta$ -galactanase treatment of the imidazole extract disrupts pollen tube adhesion.. ..	132

Figure 43 : $\beta$ -galactosidase treatment of the imidazole extract partially disrupts pollen tube adhesion.....	132
Figure 44 : Size exclusion chromatography of imidazole extract treated with <i>endo</i> -(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase, $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and $\beta$ -galactosidase. ....	134
Figure 45 : Commercial lemon pectins are also promoting pollen tube adhesion.....	136
Figure 46 : Monosaccharide composition of the lemon pectins with different DME: 85, 67, 62 and 8.6%.....	137
Figure 47 : PACE analysis of lemon pectin with 85% DME treated with PGase. ....	138
Figure 48 : Size exclusion chromatography of untreated lemon pectin with 85% DME and treated with PGase.....	139
Figure 49 : Effect of the abundance of GalA and Gal, in the different native and treated polymers, on pollen tube adhesion.....	140

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Volumes appliqués lors des traitements des tubes polliniques avec les molécules de la chimiothèque. ....	59
Tableau 2 : Liste des anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes pariétaux de leurs organismes de production et des principaux épitopes reconnus. ....	60
Tableau 3 : Liste des enzymes (Megazyme®, Irlande), des organismes dont elles sont issues et des conditions d'utilisations. ....	64
Tableau 4 : Composition du gel de migration PACE (30% d'acrylamide) pour un volume de 5 mL...	67
Tableau 5 : Composition du gel de concentration PACE (8% d'acrylamide) pour un volume de 2 mL. ....	67
Tableau 6 : Préparation de la courbe étalon. ....	68
Table 7 : Preparation of the standard for the determination of the degree of methylesterification (DME) of the imidazole extract. ....	119
Table 8 : Composition of the concentration and migration acrylamide gels for PACE electrophoresis. ....	121

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	i
LISTE DES FIGURE.....	iii
LISTE DES TABLEAUX .....	v
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vi
AVANT-PROPOS.....	ix
INTRODUCTION .....	1
I - La reproduction .....	2
1-1 L'anatomie de la fleur .....	2
1-1-1- Le stigmate .....	3
1-1-2- Le style .....	4
1-1-3- L'ovaire .....	6
1-2- Le gamétophyte mâle.....	7
1-2-1- La formation du grain de pollen .....	7
1-2-2- La pollinisation.....	9
1-2-3- La réhydratation du grain de pollen.....	11
1-2-4- Le tube pollinique.....	12
1-2-5- Etude in vitro des tubes polliniques.....	18
1-3- Les interactions avec le tissu de transmission femelle.....	18
II- La paroi du tube pollinique .....	22
2-1- Les différents polysaccharides de la paroi .....	23
2-1-1- Les $\beta$ -glucanes .....	24
2-1-2- Les hémicelluloses.....	28
2-1-3- Les pectines .....	31
2-2- Les glycoprotéines de la paroi .....	36
2-2-1- Les arabinogalactanes protéines (AGPs).....	36
2-2-2- Les extensines.....	38
2-3- Le remodelage de la paroi du tube pollinique.....	39
2-3-1- Xyloglucane-endo-transglucosidases/hydrolases .....	40
2-3-2- Pectines méthylestérases et leurs inhibiteurs/ pectines acétylestérases .....	40
2-3-3- Glycane hydrolase .....	41
III- L'adhésion cellulaire .....	42
3-1- Généralités sur l'adhésion.....	43

3-2- Adhésion cellulaire et reproduction sexuée .....	45
3-2-1- L'adhésion du pollen au stigmate.....	45
3-2-2- L'adhésion du tube pollinique à la matrice extracellulaire du style .....	46
IV- La génétique chimique .....	47
4-1- Le principe .....	47
4-2- La méthodologie .....	48
4-3- Les avantages et les inconvénients .....	50
4-4- Les applications en recherche végétale.....	50
OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE .....	54
MATERIEL ET METHODES.....	55
I Matériel végétal et Tests biologiques .....	56
1-1- Culture des plantes.....	56
1-2- Récolte des fleurs et culture du pollen.....	57
1-3- Le test d'adhésion des tubes polliniques.....	57
1-4- La chimiothèque et le traitement des tubes polliniques .....	58
II- Méthodes d'imagerie cellulaire.....	59
2-1- Coloration cytochimique de la callose à l'aniline bleue décolorée.....	59
2-2- Immunomarquages des tubes polliniques .....	59
2-3- Observations au microscope confocal inversé des tubes polliniques d' <i>A. thaliana</i> pLAT52::lifeact-mEGFP et CRIB4-GFP .....	61
III - Méthodes préparatives et analytiques de la matrice d'adhésion.....	61
3-1- Obtention de la paroi brute .....	61
3-2- Extraction de fractions enrichies en pectines.....	62
3-2-1- Imidazole-HCl .....	62
3-2-2- Oxalate d'ammonium .....	62
3-3- Extraction de fractions enrichies en hémicelluloses .....	63
3-4- Extraction du mucilage de graines d' <i>A. thaliana</i> .....	63
3-5- Traitements enzymatiques des fractions enrichies en pectines.....	63
3-6- Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) .....	64
3-7- Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID).....	65
3-7-1- Préparation des échantillons .....	65
3-7-2- Analyse .....	65
3-8- Analyse de Polysaccharides par Electrophorèse sur gel de polyacrylamide .....	66
3-9- Détermination du degré de méthylesterification des pectines .....	67
3-10- Dot-blot.....	68
RESULTATS.....	70

Partie 1 (article): Deux nouvelles petites molécules isolées par criblage affectent la germination des grains de pollen et la croissance et le développement des tubes polliniques d'Arabidopsis thaliana .	71
Partie 2 : Etude de l'adhésion in vitro des tubes polliniques d'Arabidopsis thaliana par une approche enzymatique de déconstruction d'une matrice enrichie en polysaccharides.....	111
DISCUSSION.....	141
I- Deux nouvelles petites molécules isolées par criblage affectent la croissance et le développement des tubes polliniques d'Arabidopsis thaliana.....	142
II- Etude de l'adhésion in vitro des tubes polliniques d'Arabidopsis thaliana par une approche enzymatique de déconstruction d'une matrice enrichie en polysaccharides.....	144
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	155
ANNEXES.....	186
Curriculum Vitae .....	187

## AVANT-PROPOS

La reproduction sexuée des plantes, aboutissant à la production de graines, est une étape clé permettant (1) la pérennisation, (2) la dissémination des espèces et (3) la colonisation de nouveaux espaces. Elle est aussi d'une importance économique colossale à l'échelle mondiale, européenne et française. En effet, elle représentait en 2009 de manière directe et indirecte (fruits, céréales, oléagineux, protéagineux et produits dérivés de la vigne), un chiffre d'affaire de 25 milliards d'euros en France (Insee, 2009). Cette étape clé est menée par une cellule à croissance polarisée, le tube pollinique, qui transporte les deux gamètes mâles. Celui-ci pénètre de manière intrusive les tissus femelles, et après avoir localisé un ovule, va le fertiliser et aboutira à la production de graines et de fruits.

Le laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (EA4358) s'intéresse entre autre à la « croissance cellulaire des cellules végétales ». En particulier, il souhaite comprendre sur le modèle « grain de pollen » et « tube pollinique », les mécanismes adaptatifs permettant, en conditions climatiques normales et/ou de stress thermiques par exemple, aux tubes polliniques d'atteindre les ovules, de produire des graines saines et de comprendre l'impact de ces stress sur leurs productions. Bien évidemment, comme toute relation sexuée, une intime relation existe entre le voyage du gamétophyte mâle, le tube pollinique, et ses interactions avec les tissus femelles du stigmate, en passant par le tissu de transmission jusqu'aux ovules. Au cours de ce trajet, des processus d'adhésion cellulaire en particulier ont montré leurs importances.

Ce travail s'inscrit dans la suite des travaux de la thèse de Flavien Dardelle qui a initié un crible de molécules issues de la chimiothèque du CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie) contenant 258 molécules chefs de famille. Ses travaux ont permis d'isoler 2 composés ayant la capacité de perturber à la concentration testée (20  $\mu$ M), la germination et la croissance des tubes polliniques chez *Arabidopsis thaliana*. En parallèle, il a été montré que l'adhésion cellulaire des tubes polliniques dans les parois des cellules de transmission et lors de leurs émergences sur le septum menant aux ovules, pouvait jouer un rôle prépondérant dans le succès de la fertilisation. Afin d'affiner la compréhension de ces mécanismes, un test d'adhésion *in vitro* a été développé pour déterminer les composés impliqués dans ce processus.



A cette fin, ce manuscrit de thèse est composé de 5 parties:

1/ Chapitre I : L'introduction présente le contexte général de l'étude, les mécanismes moléculaires impliqués dans la croissance du tube pollinique et son interaction avec les différentes parties des tissus femelles, ainsi que les constituants de la paroi des tubes polliniques, interfaces de contact entre ces deux entités. L'importance de l'adhésion cellulaire sera présentée plus généralement dans l'organisation des cellules somatiques chez les plantes, et son rôle capital lors de la reproduction sexuée. Finalement, les principes et les outils nécessaires à la réalisation d'un crible d'une chimiothèque et les récentes applications en biologie végétale seront évoqués.

2/ Chapitre II : la partie matériel et méthodes détaille les différentes techniques et le matériel utilisés pour cette étude.

3/ Chapitre III : Il présente les résultats obtenus et sera composé de deux parties. La première portera sur les effets phénotypiques et moléculaires de deux nouvelles petites molécules issues du criblage, ainsi qu'un autre composé, la galvestine-1 (Botté et al., 2011), affectant plus ou moins fortement la germination des grains de pollen et la croissance des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana*. La seconde partie portera sur la mise en place d'un test d'adhésion reproductible de tubes polliniques, sur une matrice d'adhésion enrichie en polysaccharides et sa déconstruction par des traitements enzymatiques spécifiques.

4/ Chapitre IV : La discussion permettra d'argumenter nos résultats face aux nombreux travaux publiés sur la croissance polarisée des tubes polliniques, leurs perturbations et les phénomènes d'adhésion cellulaire peu étudiés médiés par les polymères.

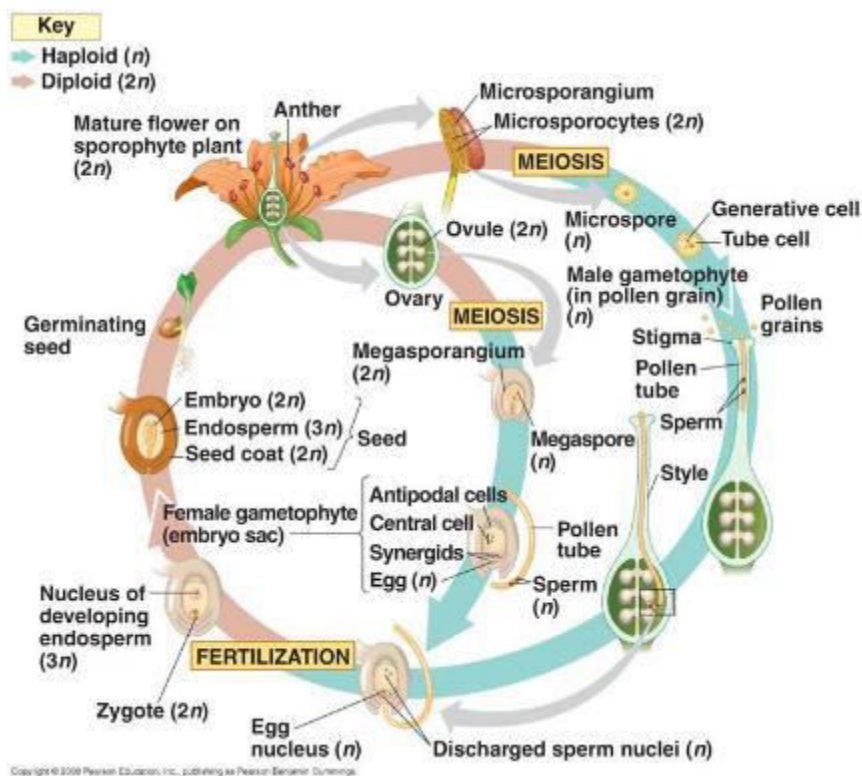
5/ Chapitre V : Cette partie comporte une conclusion générale avec les perspectives qui permettront d'approfondir nos résultats et valider nos hypothèses.

Toutes les références bibliographiques suivront ce dernier chapitre et à la fin du manuscrit une partie annexes comportera un *Curriculum Vitae* ainsi que l'ensemble des résultats de recherche valorisés (articles et communications orales et affichées).

# **INTRODUCTION**

## I - La reproduction

La reproduction sexuée chez les végétaux supérieurs a un grand intérêt économique : elle aboutit à la production de graines et de fruits (Fig. 1). Ceux-ci sont utilisés dans divers domaines notamment la nutrition humaine et animale, la production de bioénergie, la production de molécules à intérêt thérapeutique.... Cette phase démarre lorsque les grains de pollen sont déposés sur le stigmate où ils adhèrent, s'hydratent et produisent un tube pollinique qui va croître à travers le tissu de transmission femelle pour délivrer les deux gamètes mâles à l'ovule, et ainsi permettre la fécondation.



**Figure 1 :** Cycle de reproduction des Angiospermes.

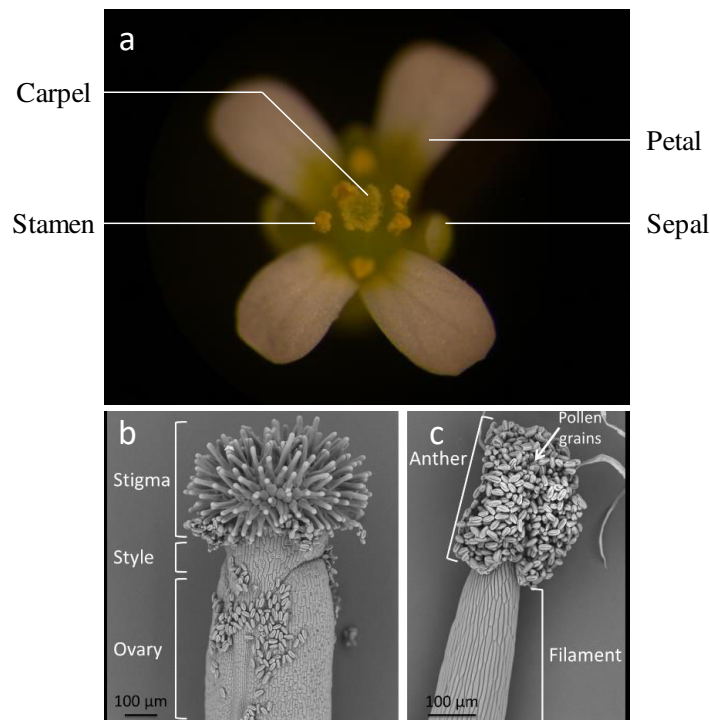
(Copyright© 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings)

### 1-1 L'anatomie de la fleur

Les plantes à fleurs sont les angiospermes (actuellement les plantes les plus abondantes et les plus diverses sur terre). La majorité des angiospermes sont monoïques (plus précisément hermaphrodisme monoïque), les fleurs comportent à la fois les organes de reproduction femelles et mâles (Fig. 2a). Seuls, 6% des angiospermes sont dioïques (Zhu et al., 2016).

De l'extérieur vers l'intérieur, une fleur d'*Arabidopsis*, plante modèle, se compose de quatre verticilles concentriques:

- Les sépales (l'ensemble forme le calice) } Le périanthe
- Les pétales (l'ensemble forme la corolle) }
- Les étamines : ce verticille représente la partie mâle de la fleur. C'est un ensemble d'anthères (contenant les grains de pollen), chaque anthère est portée par un filet (Fig. 2c).
- Les carpelles : ce verticille représente la partie femelle de la fleur (Fig. 2b), l'ensemble est fusionné en un pistil ou gynécée formé de haut en bas : d'un stigmate, d'un style et d'ovaires.



**Figure 2 :** Anatomie d'une fleur d'*Arabidopsis thaliana* (a) complète. Structure de la surface (b) du carpelle et (c) d'une étamine au microscope électronique à balayage. (Mollet et al., 2013)

### 1-1-1- Le stigmate

Le stigmate est la partie du carpelle qui réceptionne les grains de pollen. Les propriétés de sa surface varient beaucoup selon les espèces. Mais on peut classer les stigmates en trois catégories : les stigmates secs, les stigmates humides qui sont les grandes catégories (Heslop-

Harrison and Shivanna, 1977), et une catégorie intermédiaire, les stigmates semi-secs, chez la famille des Asteraceae (Allen et al., 2010).

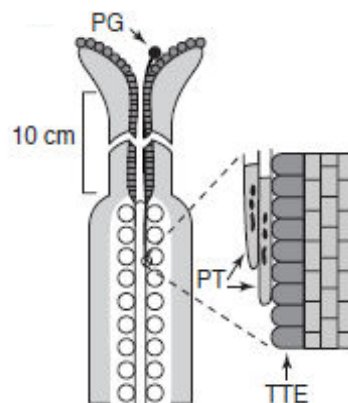
Les stigmates humides possèdent à leurs surfaces des exsudats, comme chez le lys ou le tabac, de nature aqueuse ou lipidique. Les cellules à la surface de ces stigmates sont souvent lysées afin de libérer ces exsudats riches en protéines, lipides, sucres et/ou pigments, permettant d'attirer les insectes et de capter de façon non spécifique les grains de pollen (Heslop-Harrison, 2000; Swanson et al., 2004; Mollet *et al.*, 2007).

Les stigmates secs ne possèdent pas d'exsudat à leurs surfaces comme dans la famille des *Brassicaceae*, dont *Arabidopsis thaliana*. Ils sont constitués de papilles stigmatiques recouvertes d'une cuticule et d'une fine pellicule protéique à l'extérieur permettant de capter de façon beaucoup plus spécifique les grains de pollen (Zinkl et al., 1999; Edlund, 2004; Lehner et al., 2010).

### 1-1-2- Le style

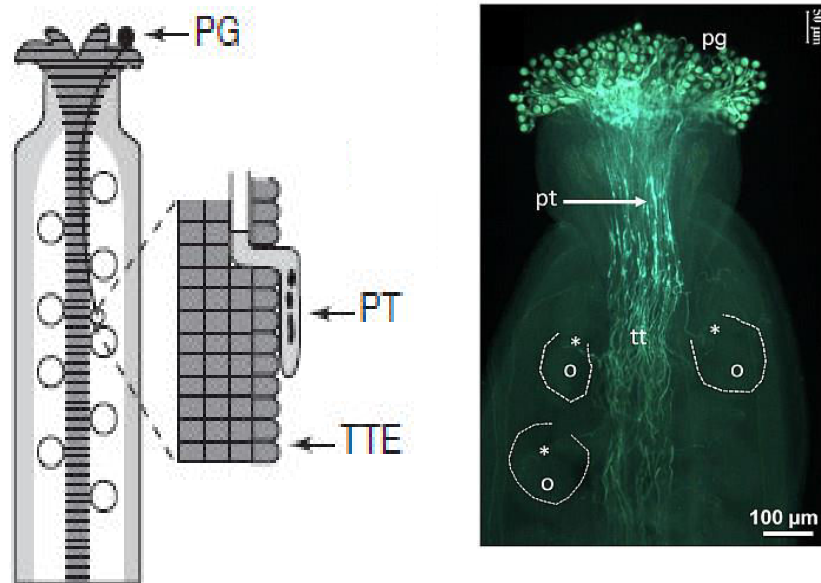
Il correspond à la partie centrale du pistil qui forme un axe cylindrique reliant le stigmate à l'ovaire. Les tubes polliniques vont traverser et adhérer à la partie interne de cet organe contenant le tissu de transmission. Il existe deux types de styles, selon les espèces : des styles creux et des styles pleins.

Dans les styles creux (Fig. 3), le tissu de transmission est tapissé de cellules épidermiques dépourvues de cuticule sécrétant des exsudats, et formant un canal creux comme chez le lys. Les tubes polliniques vont donc croître à la surface de ces cellules épidermiques (Lord, 2000; Mollet et al., 2000).



**Figure 3 :** Représentation schématique d'un style creux chez le lys. (Lord, 2000)  
PG : grain de pollen, PT : tube pollinique, TTE : épiderme du tissu de transmission.

Dans les styles pleins, le tissu de transmission est constitué de cellules plus ou moins jointives qui vont remplir l'intérieur du style, comme chez *A. thaliana* (Fig. 4), le tabac et la tomate. Les tubes polliniques vont donc croître à l'intérieur de ce tissu de manière intrusive (Lord, 2000). Le tissu de transmission joue deux rôles clés : le rôle d'un tissu nourricier et de protection pour les tubes polliniques, mais aussi le rôle d'adhésion et de guidage spatio-temporel des tubes *via* la perception de divers signaux (de Graaf, 2005; Mollet et al., 2007; Crawford and Yanofsky, 2008).



**Figure 4 :** Représentation schématique (à gauche) d'un style plein chez *A. thaliana* et (à droite) coloration d'un pistil pollinisé à l'aniline bleue mettant en évidence les grains de pollen sur le stigmate et des tubes polliniques dans le tissu de transmission dont certains ont atteint les ovules (\*). (Lord, 2000; Mollet et al., 2013)

O : ovule, PG ou pg: grain de pollen, PT ou pt : tube pollinique, tt : tissu de transmission, TTE : épiderme du tissu de transmission.

### 1-1-3- L'ovaire

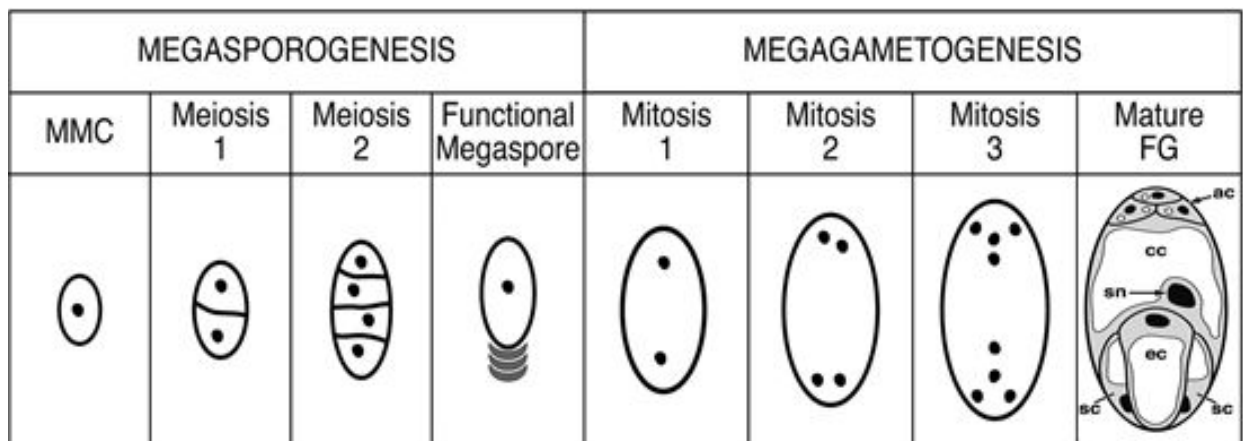
Il représente la partie basale du pistil, dilatée et creuse. Elle peut contenir un ou plusieurs ovules contenus dans des loges ovariennes. À sa base, l'ovule est attaché à l'ovaire par le funicule. Le sac embryonnaire se situe à l'intérieur de l'ovule, cette structure contient 8 noyaux constituant 7 cellules orientées de haut en bas en trois groupes:

- groupe 1 : 3 cellules antipodales,
- groupe 2 : une cellule centrale (possédant 2 noyaux),
- groupe 3 : une oosphère et deux synergides situées du côté du micropyle.

L'élaboration de ces structures se déroule en deux phases : la mégasporogénèse et la mégagamétogénèse (Fig. 5).

- la mégasporogénèse : suite à la différenciation de la mégaspore mère, elle va subir une méiose donnant quatre cellules haploïdes, ou quatre mégaspores alignées linéairement. Les trois mégaspores généralement proches du micropyle dégénèrent, seule une mégaspore (cellule apicale) sera fonctionnelle et donnera lieu au mégagamétophyte.

- la mégagamétogénèse : la mégaspore fonctionnelle subit trois mitoses successives sans cytokinèse conduisant à la formation de huit noyaux haploïdes. Les noyaux vont se répartir par migration nucléaire, trois à chaque pôle et deux au centre. La cytokinèse se produit en terminant la formation du sac embryonnaire (Yadegari, 2004; Boavida et al., 2005; Figueiredo and Köhler, 2016).



**Figure 5** : Principales étapes permettant la formation des différentes cellules du sac embryonnaire. (Yadegari, 2004)

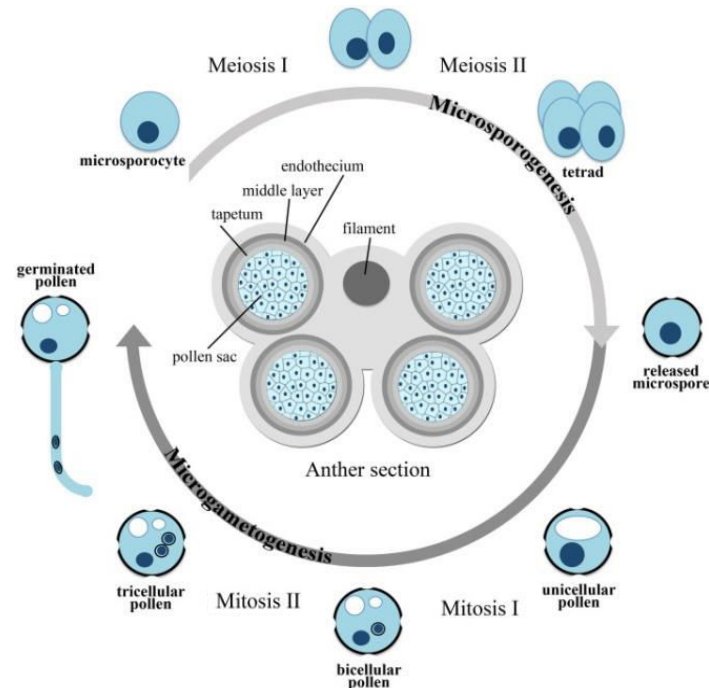
MMC : mégaspore, EC : oosphère, SC : synergides, SN : noyau secondaire, CC : cellule centrale, AC : cellules antipodales.

## 1-2- Le gamétophyte mâle

### 1-2-1- La formation du grain de pollen

Les grains de pollen vont se former dans les anthères. Durant la microsporogénèse (Fig. 6), certaines cellules, les archéspores, vont se multiplier pour donner une masse de cellules mères, les microsporocytes. Les microsporocytes subissent une méiose qui conduit à la formation de quatre cellules haploïdes, les tétraspores (Twell et al., 1998; Honys and Twell, 2004). Ces cellules sont entourées de callose et synthétisent une paroi dite primexine. Sous l'effet d'enzymes telles que la  $\beta$ -(1-3)-glucanase, les PME (pectines méthylestérases) et les *endo-*

polygalacturonases, issues du tapis staminal, les tétraspores sont séparées en microspores libres. Des travaux effectués sur les mutants *quartet*, *qrt1* et *qrt3*, codant respectivement pour une PME et une polygalacturonase, ont permis de montrer l'importance de ces enzymes lors de la séparation des tétraspores (Hird et al., 1993; Owen and Makaroff, 1995; Rhee, 2003, Francis et al., 2006).



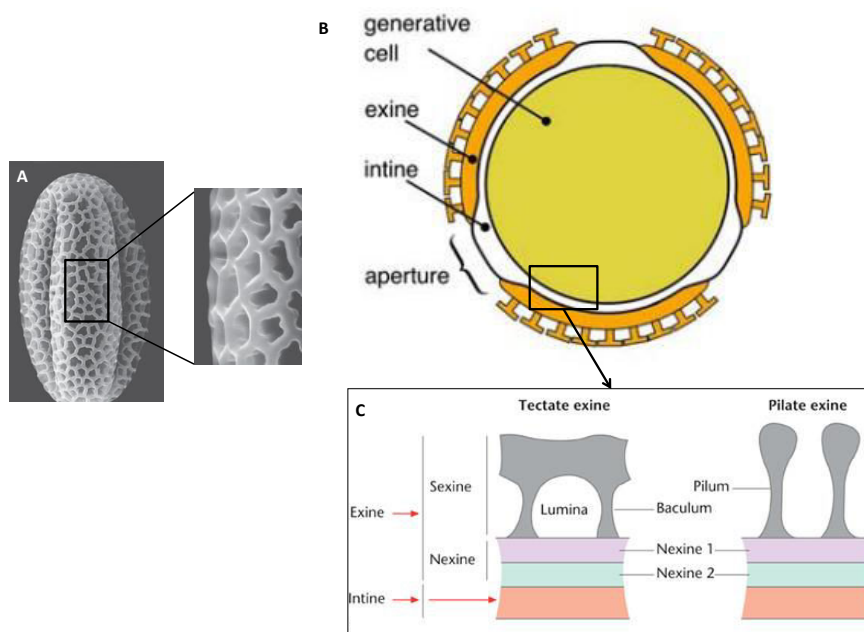
**Figure 6 :** La microsporogénèse et la microgamétogénèse. (Biancucci et al., 2015)

Lors de l'étape de microgamétogénèse, on observe l'expansion et la maturation de chaque microspore séparément *via* la déposition d'une couche d'exine à l'extérieur des microspores, puis une autre couche, l'intine, est à son tour déposée entre l'exine et la membrane plasmique durant la période d'expansion (Quilichini et al., 2014).

Au cours de cette maturation, le noyau va subir par la suite une mitose inégale et une déshydratation pour devenir un gamétophyte mâle ou un grain de pollen mature. Un grain de pollen peut être bicellulaire (noyau végétatif et noyau génératif) quand la seconde mitose se produit dans le tissu femelle ou tricellulaire : au moment de l'anthèse, les grains de pollen des *Brassicaceae* (*A. thaliana*), des *Poaceae* et des *Asteraceae* sont composés de trois noyaux (un noyau végétatif et deux noyaux gamétiques). La seconde mitose se fait donc dans les anthères, ce qui est favorable à une fécondation rapide. Ce caractère est considéré comme une avancée d'un point de vue phylogénique (Brewbaker, 1967; Williams et al., 2014). Après la déhiscence des anthères, les grains de pollen ne contiennent que 10 à 20% de leurs poids total en eau (Stanley and Linskens, 1974).



Lorsque ces grains de pollen sont matures, ils sont protégés par une paroi qui présente de nombreuses variations structurales, de composition ou d'épaisseur. Elle est constituée d'un mélange de polymères qui confèrent au pollen une grande résistance mécanique et chimique à la dégradation. Cette paroi se compose de deux parties : l'intine et l'exine (Fig. 7A et B). L'exine est elle-même formée de deux couches : la sexine (externe) et la nexine (interne). La sexine est une couche réticulée grâce aux bacula qui sont ornées avec des tectums et aux pilums qui ne sont pas ornés (Fig. 7C). La sexine est majoritairement composée de sporopollenine. L'exine joue également un rôle important dans l'adhésion aux insectes pollinisateurs et à la surface du stigmate (Edlund, 2004). L'intine est partiellement exposée à l'environnement *via* les apertures, et est composée de cellulose, callose, pectines et xyloglycanes (Esau, 1977; Hesse et al., 2009; Dardelle et al., 2010; Borg and Twell, 2010; Lampugnani et al., 2013; Lou et al., 2014).

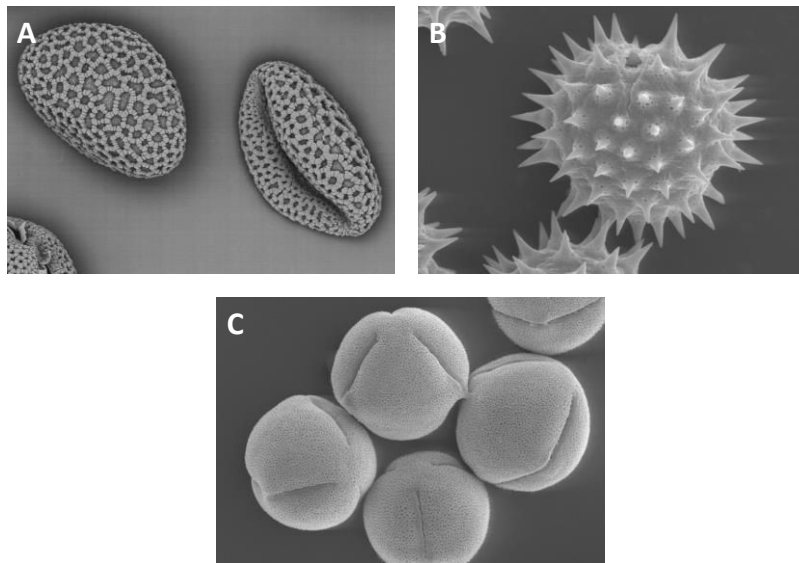


**Figure 7:** Structure de la paroi du grain de pollen.

(A) Structure de la surface du grain de pollen d'*A. thaliana* observée au microscope électronique à balayage. (B) Schéma de la structure d'un grain de pollen. (C) Détails des ornements de l'exine. (Borg and Twell, 2010; Katifori et al., 2010)

Les différences présentées par l'exine permettent de distinguer différentes formes de grains de pollen dépendant de l'espèce (Fig. 8). En effet, l'exine peut contenir une ou plusieurs ouvertures selon l'espèce. L'ouverture est une région spécialisée plus fine qui en général diffère par son ornementation et/ou sa structure. Les ouvertures servent de site de germination, mais elles peuvent également servir de porte d'entrée pour l'eau ou d'autres substances, et jouent aussi un

rôle important dans l'harmoméga-thie, qui est la résistance aux variations de volume au cours des évènements de déshydratation/réhydratation (Wodehouse, 1935; Mignot et al., 1994; Hesse et al., 2009; Prieu, 2015).



**Figure 8 :** Grains de pollen de (A) *Lilium auratum*, (B) *Helianthus annuus* et (C) *Ricinus communis* observés en microscopie électronique à balayage.

(<http://remf.dartmouth.edu/imagesindex.html>)

### 1-2-2- La pollinisation

Après la maturation des grains de pollen, le pollen peut se disséminer (Keijzer, 1987; Wilson et al., 2011). La dissémination du pollen peut se faire par plusieurs mécanismes :

- l'anémogamie : le pollen est transporté par le vent, ce type de transport est majoritairement présent chez les Gymnospermes,
- l'entomogamie : le pollen est transporté par des insectes,
- l'ornithogamie : le pollen est transporté par les oiseaux,
- l'autogamie : la fécondation se fait spontanément sans l'intervention d'un facteur externe.

### Les phénomènes d'incompatibilité

Afin de permettre la fécondation croisée et le brassage génétique, les plantes ont mis en place au cours de l'évolution différents mécanismes empêchant l'auto-fécondation. Ces mécanismes se révèlent importants, notamment à cause de la proximité spatiale des organes mâle et femelle favorisant l'auto-fécondation. Plusieurs mécanismes peuvent être cités : anatomique, temporel et génétique.

Les mécanismes anatomiques d'incompatibilité sont mis en place grâce à un polymorphisme floral complexe, telle que l'hétérostylie où les fleurs ont des styles longs et des étamines courtes. De ce fait, la probabilité d'auto-fécondation est réduite, comme c'est le cas chez la primevère commune (*Primula vulgaris*) (Webb and Lloyd, 1986; Barrett, 2002).

Dans le cas des mécanismes temporels, les organes de reproduction mâle et femelle ne sont pas matures en même temps. Ce phénomène est appelé dichogamie, comme chez le maïs (*Zea mays*), où les organes mâles sont matures avant les organes femelles (Bertin and Newman, 1993).

Un contrôle génétique élaboré permet également aux plantes de reconnaître, d'accepter ou de rejeter, le pollen selon son origine. Il existe deux principaux types d'incompatibilité :

- l'interspécifique : qui est le rejet du pollen par une plante d'une autre espèce,
- l'intraspécifique : qui est le rejet du pollen par une plante d'une même espèce. Cela permet un meilleur brassage génétique, et on désigne ce type de rejet par SI : self incompatibility (rejet du soi).

La compatibilité résulte de la perte de fonctionnalité des gènes d'incompatibilité (Self Incompatibility : SI) au cours du temps, comme c'est le cas pour *A. thaliana*. C'est l'un des plus grands tournants de l'évolution dans l'histoire des plantes à fleurs (Darwin, 1876; Tsuchimatsu et al., 2010). Les incompatibilités sporophytique et gamétophytique reposent sur deux mécanismes différents.

Les bases moléculaires du rejet sporophytique (SSI) ont été largement étudiées chez les *Brassicaceae* (de Nettancourt, 2001), qui sont contrôlées par SRK (S-locus Receptor Kinase) et SCR/SP11 (S-locus Cystein Rich/S-locus Protein 11), qui sont respectivement des déterminants femelles et mâles du *locus S* (Nasrallah and Nasrallah, 1993; Schopfer et al., 1999; Takayama et al., 2000). La SRK (S-locus Receptor Kinase) est un récepteur à activité sérine/thréonine kinase localisé au niveau des papilles stigmatiques. SCR/SP11 (S-locus Cystein-Rich/S-locus Protein 11) est une petite protéine riche en cystéines présente sur le manteau pollinique, agissant comme un ligand sur le domaine LRR (Leucine-Rich Repeat) extracellulaire du récepteur SRK. Ainsi, une cascade de signalisation va induire l'inhibition de la réhydratation du grain de pollen (Ikeda et al., 1997).

Le système de rejet gamétophytique (GSI) est de type S-RNase (S-locus RiboNucléase). Il est commun aux familles des Solanaceae, Rosaceae et Plantaginaceae. Il a été montré chez le coquelicot (*Papaver rhoeas*) que le pollen non compatible subissait une mort cellulaire programmée (PCD : Programmed cell death) par ce type de système SI (Thomas and Franklin-Tong, 2004)

### 1-2-3- La réhydratation du grain de pollen

Une fois que le grain de pollen entre en contact avec le stigmate, la reprise de l'activité du grain de pollen dépend de sa réhydratation, qui elle-même dépendant du flux d'eau provenant du stigmate. Dans le cas d'*A. thaliana*, le stigmate est sec donc une adhésion en premier lieu est nécessaire avant la réhydratation (voir la partie adhésion).

Ce flux d'eau vers l'intérieur de la cellule végétative est facilité par des aquaporines dont la découverte date de 25 ans (Agre et al., 1993). Ces transporteurs appartiennent à la famille des canaux membranaires. Le génome d'*A. thaliana* contient 38 séquences codant pour des aquaporines (Quigley et al., 2002). Elles sont présentes à la fois dans le plasmalemme et dans le tonoplaste (Losch, 1999). Les aquaporines chez les plantes sont classées en quatre sous-familles importantes: PIPs (plasma membrane-intrinsic proteins), TIPs (tonoplast-intrinsic proteins), NIPs (nodulin 26-like-intrinsic proteins) et SIPs (small basic membrane-intrinsic proteins) (Quigley et al., 2002).

Certaines isoformes des TIPs et des PIPs transportent aussi du glycérol, de l'urée, de l'acide silicique, de l'acide borique ; mais aussi du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou des gaz tels que l'ammoniac ou le CO<sub>2</sub> (Forrest and Bhave, 2008; Soto et al., 2008; Maurel et al., 2008; Jang et al., 2012; Pérez Di Giorgio et al., 2016b). Soto et al. (2008) ont émis l'hypothèse que les aquaporines pourraient jouer un rôle important durant la réhydratation des grains de pollen sur le stigmate.

Deux gènes TIPs nommés *AtTip1.3* et *AtTip5.1*, sont fortement et spécifiquement exprimés dans le pollen mature d'*A. thaliana* (ils font partie des 10% des gènes les plus exprimés). Ces données confirment celles obtenues par Bock et al. (2006) qui ont analysé l'expression des gènes du gamétophyte mâle à différents stades de développement. *AtTIP1.3* et *AtTIP5.1* sont également colocalisées dans le tonoplaste de la cellule végétative (Wudick et al., 2014).

Sommer et al. (2008) ont effectué une expression transitoire de quatre gènes *PIPs* d'*A. thaliana* dans le pollen du lys. Contrairement à *PIP1*, *PIP2* induit une augmentation de l'apport d'eau à l'intérieur du pollen. *PIP2* jouerait également un rôle dans la déshydratation des anthères avant la déhiscence chez le tabac (Bots et al., 2005; Firon et al., 2012). Les *PIPs* pourraient également être présentes dans les parties femelles (Marin-Olivier et al., 2000; Dixit et al., 2001).

Plus récemment, deux autres aquaporines de la sous-famille des NIPs: *NIP4.1* et *NIP4.2* ont été caractérisées. Pérez Di Giorgio et al. (2016a) ont montré que *NIP4.1* est exprimé

dans le grain de pollen mature, alors que *NIP4.2* est spécifiquement exprimé dans le tube pollinique.

#### **1-2-4- Le tube pollinique**

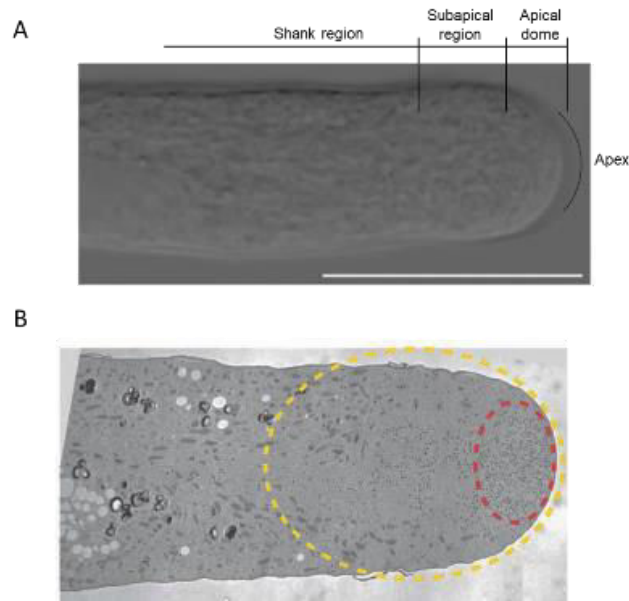
Lorsque le grain de pollen reprend son activité métabolique, un tube pollinique va émerger au niveau d'une des ouvertures. Sa fonction est d'acheminer, en pénétrant et en traversant les papilles stigmatiques et le tissu de transmission, les gamètes mâles aux ovules pour aboutir à la double fécondation.

Le tube pollinique est une cellule à croissance polarisée uniquement au niveau de la zone apicale et par expansion de la cellule végétative. Il fait partie des cellules eucaryotes dont la croissance est parmi les plus rapides (de 58 à 400 nm/sec selon les espèces) (Cheung and Wu, 2008).

La longueur du tube pollinique peut atteindre jusqu'à une dizaine de centimètres pour les plantes à style long comme le lys. Ce type de croissance est employé dans tout le règne végétal, mais il est typique de quelques types cellulaires, tels que chez les mousses, comme *Physcomitrella patens* (Decker et al., 2006), ou chez les plantes supérieures : les poils absorbants (situés au niveau de la zone pilifère des racines) (Schiefelbein et al., 1992; Grierson et al., 2014) ou le tube pollinique (Rounds and Bezanilla, 2013).

Le tube pollinique possède une forme cylindrique avec plus ou moins le même diamètre observé tout au long du tube en culture *in vitro*, et est sub-divisé en plusieurs régions en partant de l'apex (Fig. 9A) : la zone apicale, la zone sub-apicale et la partie cylindrique.

La zone apicale apparaît claire, car elle ne contient pas d'organites, mais observée au microscope électronique à transmission, elle est riche en vésicules de sécrétion golgiennes (Fig. 9B). Cette zone permet l'entrée de l'eau et du calcium dans la cellule, ce qui est vital pour la croissance du tube pollinique (Hepler and Winship, 2015).



**Figure 9 :** Tube pollinique de tabac en microscopie photonique montrant les différentes régions (A) et de lys en microscopie électronique à transmission (B) montrant : entouré en pointillés jaunes la zone claire et en pointillés rouges les vésicules de sécrétions à l’apex. (Lancelle and Hepler, 1992; Wang and Jiang, 2014). Barre d’échelle = 25  $\mu\text{m}$ .

En raison de sa dynamique complexe, le tube pollinique met en place des régulations très fines de son métabolisme. La croissance se fait par oscillations, qui sont des poussées cytoplasmiques précédées par une fluctuation du gradient de calcium dans la zone apicale. En effet, plusieurs phases régulières de croissance rapide, puis lente, ont été identifiées et associées à une réorganisation de la structure et du métabolisme à l’intérieur du tube pollinique (Jaffe et al., 1975; Holdaway-Clarke et al., 1997; Messerli et al., 2000). Le calcium intra-cellulaire libéré est un important messager secondaire dans la régulation de la croissance et de l’orientation du tube pollinique (Steinhorst and Kudla, 2013).

Le calcium est également impliqué dans des événements antérieurs à l’élongation du tube pollinique, notamment lors de la germination et de l’initiation. Iwano et al. (2004) ont montré *via* l’utilisation de YC3.1 (*Yellow cameleon 3.1*, un senseur fluorescent du calcium), que lors de la pollinisation, les grains de pollen peuvent induire une augmentation locale du calcium dans les cellules des papilles stigmatiques et un gradient de calcium est formé dans le grain de pollen. Ce gradient formé au niveau du grain proviendrait des papilles stigmatiques (Miyawaki et al., 1997).

L’application d’inhibiteurs de transporteurs ou de chélateurs de calcium inhibent la croissance du tube pollinique, indiquant l’importance de la régulation de la concentration cytosolique du calcium pour l’élongation du tube pollinique (Picton and Steer, 1983;

Obermeyer and Weisenseel, 1991; Pierson et al., 1994; Guan et al., 2013). *In vivo*, les tubes polliniques utilisent les réserves de calcium externe du pistil, et l'apport externe de calcium augmente l'élongation des tubes polliniques *in vitro* (Brewbaker and Kwack, 1963; Franklin-Tong, 1999).

L'influx du calcium à l'intérieur de la cellule serait facilité par la présence de canaux glutamate receptor-like (GLR) (Michard et al., 2011). Trente *GLR* ont été identifiés chez *A. thaliana*, dont six seulement sont exprimés dans le pollen (Pina et al., 2005; Roy et al., 2008). Ces canaux joueraient également un rôle pour moduler le gradient apical du calcium, ce qui affecterait la croissance du tube pollinique. Cette modulation se fait par le biais d'un acide aminé externe provenant du pistil la D-sérine (Michard et al., 2011). Suwińska et al. (2015, 2017) ont montré que chez *Petunia hybrida* le *silencing* post-transcriptionnel de l'expression du gène de la calreticulin, une protéine multifonctionnelle de stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique, affectait la croissance du tube pollinique, l'organisation du cytosquelette et le gradient de calcium.

En plus du gradient de calcium intracellulaire, un gradient de pH a été mis en évidence dans le tube pollinique. A l'extrémité de l'apex, une zone acide est observée, alors que dans la zone claire il y a une bande alcaline (Feijó et al., 1999). Le gradient de pH est maintenu par la pompe H<sup>+</sup> ATPase qui permet l'entrée des protons de l'extrémité de l'apex des tubes polliniques, et la sortie des protons un peu plus en arrière (Obermeyer et al., 1992). Le pH a déjà démontré son rôle dans la régulation du métabolisme, notamment l'activité enzymatique (Guern et al., 1991), la modulation de la phosphorylation (Blowers and Trewavas, 1989), la structure et l'activité du cytosquelette (Yonezawa et al., 1985; Suprenant, 1991; Andersland and Parthasarathy, 1993; Edmonds et al., 1995), l'endocytose et l'exocytose (Gluck et al., 1982; Cosson et al., 1989) et la synthèse des protéines et la division cellulaire (Dube et al., 1991; Grandin et al., 1991).

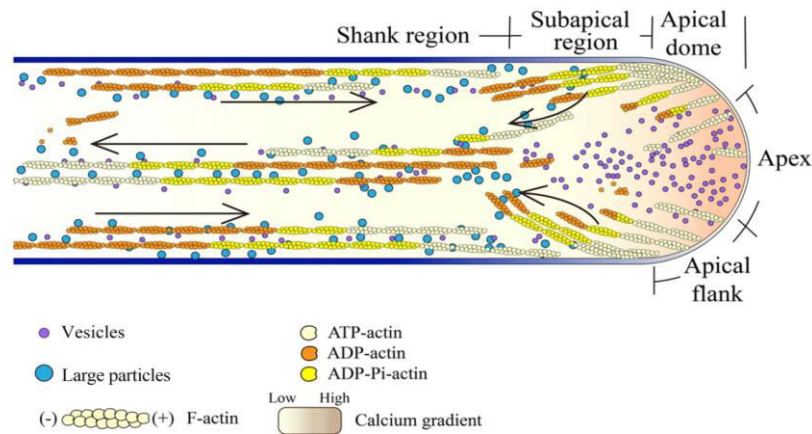
Outre le calcium et le pH, l'importance des formes actives de l'oxygène (FAO) dans la croissance polarisée des tubes polliniques a été montrée. Les FAO ou ROS (*reactive oxygen species*), en dépit de leurs toxicités, jouent un rôle de second messager et sont localisées à l'apex des tubes polliniques (Potocký et al., 2007). Les FAO jouent un rôle lors de la germination, elles sont détectées très tôt pendant l'hydratation du pollen et durant sa germination chez le kiwi (Speranza et al., 2011). Les FAO jouent également un rôle lors de la croissance polarisée (Potocký et al., 2007) et de l'élongation (Lassig et al., 2014). En effet, la production de FAO est entre autre associée aux RBOH (*respiratory burst oxydase homologs*) localisées au niveau de la membrane plasmique, et appartenant à la famille des NADP(H) oxydases (NOX)

spécifiques au tube pollinique. L'importance des NOX dans la production de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) a été mise en évidence par l'utilisation d'un inhibiteur de NOX: le DPI (diphénylene iodonium chloride). Les tubes polliniques de tabac traités avec le DPI ne produisent pas d' $O_2^{\cdot-}$  et leurs croissances sont réduites, la structure de la zone apicale est déstabilisée et les tubes éventuellement éclatent. L'apport exogène de  $H_2O_2$  permet de restaurer la croissance (Potocký et al., 2007). Plus précisément, RbohH et RbohJ semblent être essentielles pour la croissance du tube pollinique et lors de la fécondation. Ces deux protéines présentent un motif en N-terminal cytosolique dit *calcium-binding EF-hand* suggérant un lien fonctionnel entre le calcium et les FAO. Ce lien a été initialement prouvé par l'application de calcium sur les tubes polliniques de tabac qui déclencherait une augmentation de la production de FAO (Potocký et al., 2007; Boisson-Dernier et al., 2013; Lassig et al., 2014; Wudick and Feijó, 2014; Kaya et al., 2015).

Durant sa croissance, la cellule végétative, contenant la MGU (Unité Germinative Mâle), se déplace au fur et à mesure que le tube pollinique croît. Ce déplacement se fait grâce à des dépôts réguliers de bouchons de callose permettant à la cellule végétative de conserver un volume plus ou moins constant (Lord, 2000; Cai et al., 2011). La MGU est une unité stable entre le noyau végétatif et les deux gamètes spermatiques (Dumas et al., 1984; Mogensen, 1992).

Le tube pollinique possède un mouvement cytoplasmique en « fontaine inversée », maintenu principalement par le cytosquelette (Cheung and Wu, 2008) (Fig. 10). Les principaux composants du cytosquelette sont les microtubules et les filaments d'actine. Les microtubules permettent principalement le transport de la MGU en tant qu'unité, alors que les filaments d'actine sont impliqués dans le transport des organites et des vésicules, et dans la croissance du tube pollinique. Des mécanismes d'exocytose sont impliqués dans le transport massif de vésicules chargées de composés membranaires et pariétaux (Geitmann, 1999; Zonia and Munnik, 2008) et ces apports réguliers permettent de maintenir la croissance polarisée.





**Figure 10** : Schéma représentatif de la structure du tube pollinique montrant la participation des filaments d'actine dans le mouvement des différents organites. Les flèches dans le cytoplasme représentent le sens du mouvement cytoplasmique. (Qu et al., 2015)

Le cytosquelette chez les eucaryotes joue un rôle central dans la régulation de la morphologie cellulaire et de la croissance (Valster et al., 1997). L'étude de l'actine dans le tube pollinique a été faite en premier par le biais de l'utilisation d'anticorps anti-actine ou par des colorations cytochimiques à la phalloïdine (Rutten and Derksen, 1990). L'observation de l'actine au niveau de l'apex était fastidieuse à cause de la fixation (Miller et al., 1996; Derksen et al., 1995). L'observation de la dynamique de l'actine est devenue possible grâce à l'utilisation de tubes polliniques transformés par Lifeact-EGFP, ce qui a permis de confirmer l'implication de la distribution spatiale de l'actine dans la croissance polarisée du tube pollinique (Fu et al., 2001; Qu et al., 2013).

Trois formes de structures d'actine sont observées dans les tubes polliniques : de longs filaments d'actine sont observés tout au long du tube, des filaments plus courts et moins organisés sont ensuite observés dans la zone sub-apicale, puis des filaments d'actine très courts et très dynamiques sont disposés au niveau de la zone apicale pour former une structure nommée *actin fringe* (Gibbon et al., 1999; Fu et al., 2001; Hepler et al., 2001; Vidali and Hepler, 2001; Wang et al., 2008; Staiger et al., 2009). Rounds et al. (2014) ont suggéré que l'*actin fringe* contribuerait à la sécrétion ciblée des vésicules dans la paroi à des sites de fusion à l'apex du tube pollinique, et contribuerait ainsi à la croissance polarisée du tube pollinique. La dynamique de l'actine dans le pollen est régulée par plusieurs ABPs (*actin-binding protein*) dont l'ADF (*actin-depolymerising factor*), la profilin, et la superfamille des protéines villin/gelsolin/fragmin. Ces ABPs vont se fixer aux monomères et/ou aux filaments d'actine pour promouvoir la polymérisation en filaments, ou la dépolymérisation sous forme d'actine

monomérique. Elles sont également régulées par le calcium et le pH (Ren and Xiang, 2007; Wang et al., 2008; Qu et al., 2013).

Au centre de tous les mécanismes de régulations de la croissance polarisée du tube pollinique, la protéine ROP1, de la sous-famille de Rho GTPase, est localisée dans la membrane plasmique à l'apex du tube pollinique. Elles sont impliquées dans plusieurs processus lors de la croissance des plantes, le développement et les réponses à l'environnement (Yang, 2008). Un groupe de protéines les RICs (*Rop-interactive CRIB motif-containing proteins*) interagissent spécifiquement avec ROP1 dans le tube pollinique, en se liant aux ROPs par un motif CRIB (*Cdc42/Rac-interactive binding*). Chez *A. thaliana*, 11 gènes codent des protéines RICs. Les RICs sont classées en 5 groupes présentant très peu d'homologie de séquence en dehors du domaine CRIB conservé. Chaque protéine RIC interagit avec ROP différemment, et a des fonctions différentes dans le tube pollinique (Wu et al., 2001; Gu et al., 2005). Ainsi, dans le tube pollinique, ROP1 induit la dépolymérisation de l'actine et l'accumulation du calcium par deux facteurs en aval : RIC4 et RIC3 dans l'ordre. Ces deux facteurs peuvent s'équilibrer afin de permettre une exocytose et une croissance rapide du tube pollinique (Gu et al., 2005; Lee et al., 2008).

### **1-2-5- Etude *in vitro* des tubes polliniques**

L'étude du développement du gamétophyte mâle, la réhydratation du grain de pollen et la germination, la croissance et le développement du tube pollinique sont de haute importance pour l'étude fondamentale de la reproduction sexuée chez les végétaux supérieurs (Boavida and McCormick, 2007). Le tube pollinique est également considéré comme l'un des meilleurs modèles pour l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans la croissance polarisée, et plus particulièrement pour l'étude des mécanismes impliqués dans la biosynthèse et le remodelage de la paroi.

La mise au point de milieux de culture adéquats a permis de réaliser de nombreuses études *in vitro* qui ont permis des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la croissance polarisée des tubes polliniques. Les premiers milieux de germination contenaient du saccharose (Van Tieghem, 1872). Au fil du temps, les milieux ont été optimisés *via* l'identification de sels importants pour la croissance des tubes polliniques tels que le calcium et le bore (Brewbaker and Kwack, 1963). Alors que la culture de pollen bicellulaire, tel que le lys ou le tabac, est assez simple avec des taux de germination observés assez importants, chez *A. thaliana* (pollen tricellulaire), la culture était beaucoup plus

fastidieuse. Mais grâce à la mise au point d'un milieu adéquat et des conditions de culture optimales (Boavida and McCormick, 2007), les taux de germination obtenus atteignent 80%.

Néanmoins, malgré l'optimisation des milieux de germination et des conditions de culture, la croissance des tubes polliniques *in vitro* reste très inférieure à celle observée *in vivo*, ce qui suggère un rôle capital du tissu femelle dans la croissance des tubes polliniques.

### 1-3- Les interactions avec le tissu de transmission femelle

La croissance du tube pollinique dans le pistil est entretenue par des échanges de signaux entre le tissu femelle et le tube pollinique afin de permettre une double fécondation correcte. Chez le lys, possédant un style creux, lors de la croissance du tube pollinique sur le stigmate, le guidage des tubes polliniques à ce stade est influencé par une chemocyanine, une petite protéine appartenant à la famille des plantacyanines. Des essais *in vitro* ont montré que la chemocyanine a une activité chemotropique sur les tubes polliniques (Kim et al., 2004). Une surexpression de la plantacyanine chez *Arabidopsis* induit l'enroulement des tubes polliniques sur les papilles stigmatiques, qui restent sur le stigmate sans que les tubes polliniques ne pénètrent le tissu de transmission. Cette surexpression induit une augmentation de la concentration de la plantacyanine sur le stigmate, ce qui perturbe le guidage des tubes polliniques (Dong et al., 2005).

Dans le cas du stigmate sec et d'un style plein (comme chez *A. thaliana*), le tube pollinique a besoin de s'introduire entre les cellules du tissu femelle pour y croître de façon intrusive. Ce n'est pas le cas pour les stigmates creux, où le tube pollinique va croître et se diriger vers le centre du stigmate. Les tubes polliniques vont ensuite entrer dans le style et croître en adhérant aux cellules épidermiques qui tapissent l'intérieur du style et qui constituent le tissu de transmission. Le tissu de transmission possède plusieurs rôles importants : le guidage, la nutrition, la défense, l'adhésion, mais aussi un rôle actif pour l'élongation des tubes polliniques (Sanders and Lord, 1989; Lord and Russell, 2002; Mollet et al., 2007).

Les tubes polliniques progressent dans les espaces intercellulaires du stigmate et du tissu de transmission. Quelques mécanismes ont été mis en évidence pour faciliter ce passage, parmi lesquels la force de turgescence. En effet, le mutant *tod1* (*TurgOr regulation Defect 1*) est partiellement stérile car beaucoup de tubes polliniques n'arrivent pas à pénétrer dans le pistil (Chen et al., 2015).

De même, les tubes polliniques vont percevoir des signaux de guidage, parmi lesquels les arabinogalactanes protéines (AGPs), dont le degré de glycosylation augmente avec la

progression du tube pollinique dans le style vers les ovules, comme chez le tabac (Cheung et al., 1995). Il a aussi été montré que le GABA (acide gamma aminobutyrique) était impliqué dans le guidage des tubes polliniques. En effet, GABA stimule la croissance des tubes polliniques, mais l'inhibe à de fortes concentrations. Une augmentation de la concentration du GABA est observée, et correspond à la direction de la croissance des tubes polliniques avec une plus forte concentration dans la région du micropyle. La concentration en GABA est contrôlée par POP2 (POLLEN PISTIL INTERACTION2) chez *A. thaliana*. POP2 est une transaminase impliquée dans la dégradation du GABA. Lors du *knock-out* du gène *POP2*, un arrêt de la croissance des tubes polliniques est observé dans le tissu de transmission dû à une forte accumulation de GABA (Palanivelu et al., 2003; Renault et al., 2011).

Lorsque le tube pollinique quitte le tissu de transmission pour atteindre l'ovule, il adhère au funicule, structure permettant d'attacher l'ovule et le tégument du sac embryonnaire, pour se diriger vers le micropyle. Les signaux de guidage au niveau du funicule peuvent provenir du funicule lui-même, comme il a été montré sur un ovule seul en culture semi *in vivo*. Les ovules dépourvus de funicule attirent les tubes polliniques, mais à de plus faibles fréquences (Palanivelu and Preuss, 2000). Le premier article, par Guan et al. (2014), a parlé de guidage funiculaire *via* des mutants *mpk3/mpk6* (*Mitogen-activated protein kinases*) qui ne peuvent pas percevoir les signaux funiculaires, mais peuvent percevoir les signaux micropylaires.

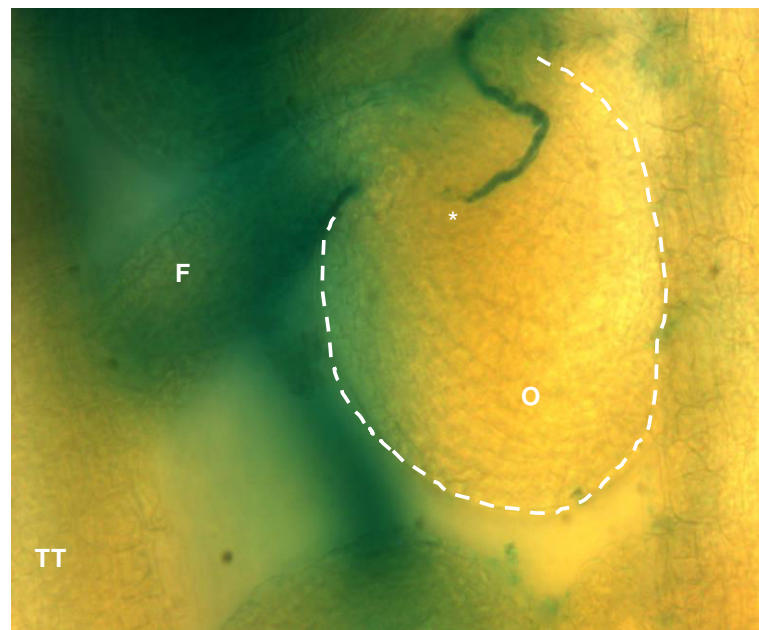
Une fois que le tube pollinique quitte le funicule, il est attiré par le micropyle *via* une autre batterie de signaux. Cette étape est la plus étudiée *via* l'identification de nouveaux chémoattractants du micropyle chez le maïs, *Torenia* et *Arabidopsis*. *Arabidopsis* utilise un chémoattractant, nommé LURE, qui est un peptide riche en cystéine (CRP) (Okuda et al., 2009) de la sous famille des DEFL (DEFENSIN-LIKE) (Silverstein et al., 2007). Les tubes polliniques qui n'ont pas été rendus compétents par leurs passages par le stigmate et le pistil, ne peuvent pas percevoir l'attractant ovulaire LURE (Higashiyama et al., 1998; Okuda and Higashiyama, 2010; Palanivelu and Tsukamoto, 2012; Leydon et al., 2014). PRK6 (POLLEN-SPECIFIC RECEPTOR-LIKE KINASE6) est un récepteur membranaire de LURE localisé à l'apex du tube pollinique. Il est essentiel pour la perception de LURE et interagirait avec ROPGEFs (*Rho of plant guanine nucleotide-exchange factors*) qui est important pour la croissance du tube pollinique *via* le contrôle de l'activité du signal de ROP1 (Okuda et al., 2009; Takeuchi and Higashiyama, 2016). Chez *Torenia*, AMOR, un polysaccharide de type arabinogalactane, avec des acides glucuroniques méthylés, est présent dans le style aurait un rôle pour rendre les tubes polliniques compétents à percevoir les signaux émis par l'ovule (Mizukami et al., 2016). La

structure minimale pour avoir une activité serait un disaccharide composé d'un acide glucuronique 4-O-méthylé et d'un galactose lié en  $\beta$ -(1→6) (4-Me-GlcA- $\beta$ -(1→6)-Gal).

### La fécondation

L'une des deux gamètes mâles va féconder l'oosphère formant le zygote, et l'autre le noyau central permettant la formation de l'albumen (Palanivelu and Preuss, 2006; Stewman et al., 2010). Ce phénomène est plus précisément nommé « double fécondation ». La double fécondation chez les Angiospermes a été découverte par Guignard (1899) et Nawaschin (1898) chez les Liliacées.

Le tube pollinique pénètre dans l'ovule par le micropyle, entre dans le sac embryonnaire en se développant dans une des deux synergides. La croissance du tube s'arrête et le tube pollinique explose, libérant ainsi rapidement son contenu (Fig. 11), incluant les deux cellules spermatiques, dans le cytoplasme de la synergide qui dégénère (Yadegari, 2004).



**Figure 11** : Explosion d'un tube pollinique *LAT52-GUS* entrant dans une synergide au niveau de l'ovule. (Crédit photo : Lehner .A)

TT : tissu de transmission. F : funicule. O : ovule (entouré par des pointillés blancs). (\*) libération du contenu du tube pollinique.

L'explosion du tube pollinique lors de son contact avec l'une des synergides est contrôlée par le gène *FERONIA* (*FER*) codant pour un récepteur de la famille des RLK (RECEPTOR-LIKE KINASE) localisé au niveau de l'appareil filiforme des synergides (Escobar-Restrepo et al., 2007). *FER* contrôlerait également *NORTIA* (*NTA*), un autre

récepteur (Kessler et al., 2010). Les mutants *fer* et *nta* donnent des tubes polliniques qui pénètrent dans les synergides, mais qui n'explorent pas. FER contrôlerait la surproduction de FAO à l'entrée du gamétophyte femelle et induirait la rupture du tube pollinique pour la libération des cellules spermatiques (Duan et al., 2014).

*LORELEI (LRE)*, qui coderait une protéine possédant une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) et un motif M8CM (modified eight-cysteine motif), serait aussi impliquée dans la réception du tube pollinique par le gamétophyte femelle. Elle fonctionnerait avec NTA et FER pour la réception des tubes polliniques (Liu, 2016; Tsukamoto et al., 2010).

*FER* a deux homologues dans le tube pollinique, également de la famille de *RLK* : *ANXUR1* et *ANXUR2*. L'étude *in vitro* des tubes polliniques du double mutant *anxur1anxur2*, montre qu'ils explosent à l'apex juste après la germination. ANXUR jouerait donc un rôle dans le maintien de l'intégrité du tube pollinique (Boisson-Dernier et al., 2009).

Plus récemment, plusieurs autres protéines ont été découvertes, TUAN (TUN) et EVAN (EVN). Ces deux protéines seraient impliquées dans la *N*-glycosylation des protéines dans le réticulum endoplasmique et joueraient un rôle dans la perception du tube pollinique par l'intermédiaire de FER. Comme *fer*, la mutation dans ces gènes conduit à la croissance du tube pollinique à l'intérieur des synergides, sans rupture. Ces deux gènes jouent donc des rôles importants mais distincts. EVN joue un rôle essentiel pour le développement du pollen, TUN est importante pour la croissance et l'intégrité du tube pollinique en affectant la stabilité d'ANXUR (Lindner et al., 2015). En effet, chez le mutant *tun*, ANXUR1 est dégradée par une voie de dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD, Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation). Ces résultats indiquent que la *N*-glycosylation des protéines est importante pour les interactions entre les gamétophytes mâles et femelles comme chez les animaux.

Un autre acteur dans la signalisation de la perception du tube pollinique par les synergides a été identifié. Il s'agit de MARIS (MRI), un RLCK (RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASE). *MRI* est exprimé préférentiellement dans le tube pollinique et également dans les poils absorbants des racines. La perturbation de l'expression de ce gène induit une explosion spontanée des tubes polliniques. Ces travaux suggèrent donc que MRI contrôle l'intégrité de la paroi en aval d'ANXUR1/2 (Boisson-Dernier et al., 2015).

Un groupe de petite protéine femelle-spécifique ENs (*early nodulin-like proteins*) serait également requis pour la réception des tubes polliniques. Elles possèderaient un domaine PCNL (*plastocyanin-like domain*), une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) et une partie glycanique contenant des arabinogalactanes. EN14 interagit fortement et spécifiquement avec

le domaine extracellulaire de FER. La surexpression d'*EN15* perturbe le guidage des tubes polliniques vers l'ovule et la fécondation, suggérant un rôle central des ENs dans la communication mâle-femelle et dans la fécondation (Hou et al., 2016).

Après la libération des cellules spermatiques dans les synergides, elles vont fusionner avec l'oosphère et le noyau de la cellule centrale (Russell, 1992). A ce stade, il n'y a plus de tubes polliniques attirés par les synergides afin d'éviter la polyspermie (Beale et al., 2012), sauf dans le cas d'un échec de la fécondation. Dans ce cas, le gamétophyte femelle peut alors encore attirer d'autres tubes polliniques pour qu'il y ait fécondation. Ceci est possible grâce au maintien d'une synergide persistante et fonctionnelle pour l'attraction des tubes polliniques (Kasahara et al., 2012). En cas de fécondation réussie, le gamétophyte femelle fécondé induit une cascade de signalisation indépendante qui vise à éliminer la synergide persistante en orientant cette cascade de signalisation par la production d'éthylène (Beale et al., 2012; Kasahara et al., 2012; Maruyama et al., 2013; Völz et al., 2013). Plus récemment, un mutant *jagger* ou *agp4* a été étudié. JAGGER serait impliquée dans la synthèse de l'arabinogalactane protéine 4. Chez ce mutant, même en cas de fertilisation réussie, les synergides persistent, ne dégèrent pas après la double fécondation et continuent d'attirer d'autres tubes polliniques. JAGGER jouerait donc le rôle d'un intermédiaire dans la dégénération de la synergide (Pereira et al., 2016a, 2016b).

Prado et al. (2004) ont montré que l'oxyde nitrique (NO) agissait comme un chimiotrope négatif lors du guidage des tubes polliniques aux ovules. Le NO joue, par ailleurs, un rôle crucial durant différents stades de croissance de la plante en agissant comme un messager (Domingos et al., 2015). Chez le mutant *Atmos1*, une nitric oxyde synthase potentielle, la fertilité est réduite (Guo et al., 2003; Prado et al., 2008).

## **II- La paroi du tube pollinique**

La paroi cellulaire végétale, également appelée matrice extracellulaire, est un élément de structure cellulaire qui entoure chaque cellule végétale. Durant la croissance de la cellule, une première paroi, dite paroi primaire, est synthétisée autour de la cellule, elle est prédominante chez les cellules jeunes. Au niveau des tissus, elle permet de compartimenter les cellules par le biais de la lamelle moyenne. La paroi est synthétisée en premier lors de la division mitotique. La paroi se caractérise par une composition hétérogène d'enchevêtrements de polysaccharides et de protéines qui confèrent à chaque tissu ou cellule différentes propriétés mécaniques

spécifiques, définies par une balance entre l'élasticité permettant l'élongation cellulaire et la rigidité permettant de résister à la pression de turgescence (Ray et al., 1972).

Elle confère également des propriétés physiologiques à la cellule permettant la transduction des signaux (Roberts, 2001), la défense des plantes en réponse à une attaque par des pathogène (Silipo et al., 2010), une adaptation aux stress abiotiques, l'adhésion cellulaire (Durand et al., 2009) ou la communication avec les cellules voisines (Brownlee, 2002). Après la fin de l'élongation cellulaire et de la différenciation, une paroi dite secondaire pourra se déposer à l'intérieur de la cellule dans certains tissus afin de consolider la paroi primaire.

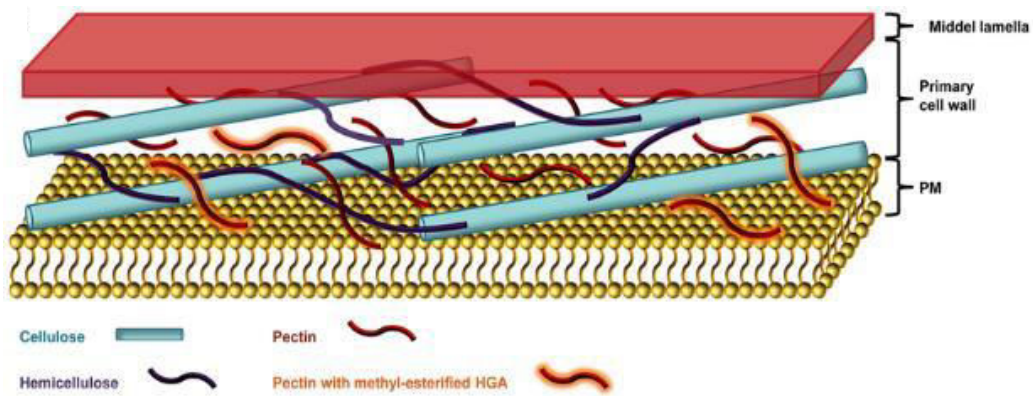
La compréhension des mécanismes de synthèse et de la fonction des polymères de la paroi est devenue possible grâce à des approches de biochimie et de génomique fonctionnelle. La paroi du tube pollinique, en dépit du fait que ce soit une cellule extrêmement spécialisée, représente un excellent modèle pour l'étude de la synthèse et du remodelage de la paroi. Le tube pollinique a l'avantage d'être une cellule unique à croissance rapide et cultivable *in vitro*.

La mise en place de la paroi et sa synthèse représentent pour la plante un coût énergétique élevé. Environ 10% des gènes d'*A. thaliana* sont impliqués dans son métabolisme (McCann and Carpita, 2008). Mais, selon des données transcriptomiques, la proportion de gènes exprimés dans la plante et le grain de pollen est variable. Le pollen utilise 3% de ses gènes dans le métabolisme de la paroi, ce qui est équivalent à la proportion de gènes exprimée au niveau de la plante (Becker and Feijó, 2007). En effet, *A. thaliana* possède 800 gènes impliqués dans la synthèse de la paroi et un tiers de ses gènes est exprimé et/ou spécifique au pollen (Pina et al., 2005).

## 2-1- Les différents polysaccharides de la paroi

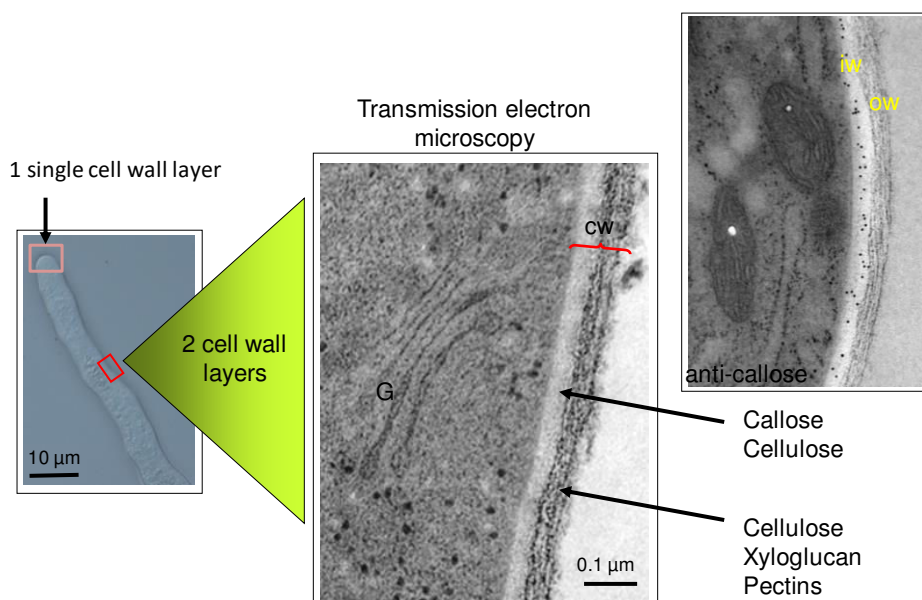
On distingue 3 catégories de polymères en fonction de leurs extractibilités et de leurs compositions en monosaccharides: la cellulose, les hémicelluloses et les pectines. Ces 3 catégories interagissent entre elles. Les polymères d'hémicellulose s'associent aux filaments de cellulose *via* des liaisons non covalentes (hydrogène) formant un réseau cellulose-hémicellulose, et conférant une certaine résistance mécanique. Un second réseau va venir s'ajouter à celui-ci, la matrice pectique, qui participe également à la dynamique de la paroi (Fig. 12). Ces polysaccharides sont synthétisés par le biais d'enzymes comme les synthases et les glycosyltransférases (GT) (Coutinho and Henrissat, 1999; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).





**Figure 12 :** Représentation schématique de la structure de la paroi végétale primaire. (Malinovsky et al., 2014)

La composition de la paroi est définie par l'âge et/ou la fonction de la cellule, l'espèce et le cycle de vie. Le tube pollinique possède une organisation de paroi spécifique (Fig. 13). *In vivo* et *in vitro*, les tubes polliniques sont composés de deux parois en arrière de l'apex, tandis qu'à l'apex, site de dépôt des composés pariétaux, une seule paroi est présente (Li et al., 1995; Ferguson et al., 1998 ; Hesagawa et al., 1998). La paroi interne est riche  $\beta$ -glucanes (callose et cellulose) et la paroi externe est composée de cellulose, d'hémicellulose (plus précisément de xyloglucane) et de pectines. Au niveau apical, la paroi est riche en glycoprotéines (plus précisément en AGPs), en pectines (qui sont fortement méthylestérifiées), en xyloglucane et contient peu de cellulose (Mollet et al., 2002; Dardelle et al., 2010).



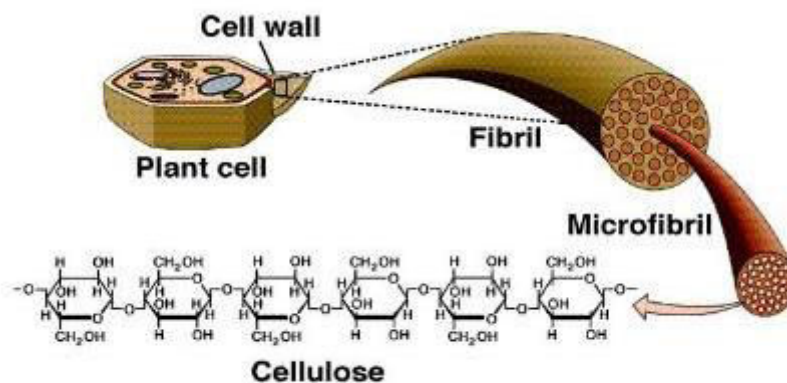
**Figure 13:** La paroi du tube pollinique d'*A. thaliana* (Dardelle et al., 2010) montrant une couche externe fibrillaire ainsi qu'une couche interne translucide aux électrons et riche en callose comme mis en évidence par immuno-marquage cw : paroi, G : appareil de Golgi, iw : paroi interne, ow : paroi externe.

## 2-1-1- Les $\beta$ -glucanes

### La cellulose

Le polymère le plus abondant sur terre, elle représente 15 à 20% de la masse sèche de la paroi primaire. Elle est utilisée en industrie pour la fabrication du papier, d'isolation phonique et thermique dans les habitations, mais aussi comme additif alimentaire (E460 et E466). La cellulose est sous forme de microfibrilles (Fig. 14) composées de 36 chaînes de D-glucose liés en  $\beta$ -(1,4). Ces chaînes sont des répétitions de motif de cellobiose, un disaccharide formé de 2 D-glucoses inversés (Haworth, 1932).

Le degré de polymérisation (DP) de ces chaînes n'excède pas 8000 dans la paroi primaire (Brett, 2000). Les 36 chaînes de glucanes co-cristallisent en se liant entre elles par des liaisons faibles (Van Der Waals et hydrogène) (Harris et al., 2010). La synthèse de la cellulose se fait au niveau de la membrane plasmique *via* les complexes cellulose synthases composés de 36 sous-unités protéiques, chacune synthétisant une chaîne glucanique (Somerville, 2006). Elles sont regroupées en rosette chez les plantes supérieures (Cosgrove, 2005; Mueller and Brown, 1980).



**Figure 14** : Représentation schématique de la structure de la cellulose.  
(<http://www.mhhe.com/biosci/botany>)

Deux familles multigéniques joueraient un rôle dans la synthèse de la cellulose, *CESA* (*CELLULOSE SYNTHASE A*) dont 10 membres ont été identifiés dans le génome d'*A. thaliana*, ainsi que 6 membres de *CSLD* (*CELLULOSE SYNTHASE LIKE-D*) chez *A. thaliana* (Richmond, 2000; Richmond and Somerville, 2000; Doblin et al., 2002).

La cellulose joue un rôle dans la détermination de la forme et de la taille de la cellule, et dans le contrôle du volume cellulaire (Bessueille and Bulone, 2008) *via* le maintien de la turgescence en assurant une résistance à la pression osmotique. Les microfibrilles de cellulose

jouent également un rôle dans le contrôle de la direction de la croissance, en effet l'orientation des microfibrilles dans la paroi à la surface de l'épiderme contrôle la direction de la croissance de l'organe (Kutschera, 2008).

Chez le lys, *A. thaliana* et *Solanum chacoense*, les microfibrilles de cellulose sont orientées de façon longitudinale par rapport à la direction de croissance des tubes polliniques (Aouar et al., 2010; Lehner et al., 2010; Chebli et al., 2012; Hepler and Winship, 2015). La paroi des tubes polliniques contient très peu de cellulose par rapport aux cellules végétatives. Pourtant, sa présence est importante pour la croissance et le maintien du tube pollinique (Geitmann, 2010). En effet, la cellulose est présente tout le long de la paroi du tube pollinique permettant de stabiliser l'apex, particulièrement dans la zone de transition, entre la partie apicale et la partie cylindrique. Chez *Torenia fournieri*, la distribution de la cellulose change de façon spacio-temporelle. Elle est abondante dans les tubes polliniques qui viennent de germer et absente de l'apex des tubes polliniques plus vieux (Wu et al., 2008). Chez *N. tabacum*, CESA et CSLD sont détectées sur toute la longueur du tube pollinique avec une concentration plus élevée à l'apex (Cai et al., 2011).

Un membre de la famille des CELLULOSE SYNTHASE-LIKE D1, identifié chez *Nicotiana alata*, la *NaCSLD1*, est exprimée uniquement dans les anthères et dans les tubes polliniques *in vitro* (Doblin et al., 2001). Les mutants *cesal* et *cesa3* sont des mutants létaux. Une proportion non négligeable des tubes polliniques de ces mutants hétérozygotes (50%) est fortement déformée ou ne produit pas de tubes polliniques (Persson et al., 2007). Chez les mutants *csld1* et *csld4*, les tubes polliniques ont un apex instable et finissent par exploser. *In vivo*, ces mutants sont stériles en raison de leurs tailles anormalement réduites, et à la désorganisation de la structure de la paroi des tubes polliniques (Wang et al., 2011).

Les mêmes phénotypes sont observés lors du traitement des tubes polliniques avec une cellulase ou un inhibiteur de la synthèse de la cellulose, tel que le dichlorobenzonitrile (DCB) (Anderson et al., 2002; Aouar et al., 2010; Hao et al., 2013).

### **La callose**

Contrairement à la cellulose, la callose est formée de chaîne de D-glucose liées en  $\beta$ -(1,3) avec quelques branchements en  $\beta$ -(1,6). Ces chaînes possèdent une conformation en hélice et peuvent se lier à une voire deux autres chaînes similaires. La callose est un polysaccharide spécialisé, car il est constitutif uniquement dans la paroi de certaines cellules, comme pour les tubes polliniques (Fig. 15) (Parre and Geitmann, 2005a) ou dans les tubes criblés du phloème (Xie et al., 2011). La callose est également présente sous certaines conditions, comme lors de

la division cellulaire dans la plaque cellulaire (Hong et al., 2001) ou induite en réponses aux stressés biotiques et abiotiques (Verma and Hong, 2001).



**Figure 15 :** Coloration d'un tube pollinique à l'aniline bleue, observé au microscope à épifluorescence, mettant en évidence des bouchons de callose (flèches blanches). Barre d'échelle = 40  $\mu\text{m}$ .

Tout comme la cellulose, la synthèse de la callose se fait au niveau de la membrane plasmique, par le biais de callose synthases. Chez *A. thaliana*, douze gènes putatifs codant des callose synthases ont été identifiés (Richmond and Somerville, 2000; Verma and Hong, 2001).

Les callose synthases sont localisées à l'apex et sur la partie distale des tubes polliniques de tabac, alors que la callose se localise essentiellement dans la partie distale et dans les bouchons de callose. Dans les tubes polliniques longs, la CALS s'accumule également près des bouchons de callose (Cai et al., 2011). CALS5 serait aussi impliquée dans le dépôt correct d'exine sur les grains de pollen et dans leurs viabilités. Cependant, Nishikawa et al. (2005), ont trouvé que l'absence de dépôts et de bouchons de callose n'altérerait ni la longueur des tubes polliniques *in vitro*, ni la production de graines *in vivo*. Il est donc difficile pour le moment de déterminer le rôle exact de la callose dans le tube pollinique.

La callose, qui est un des polymères les plus abondants de la paroi des tubes polliniques, pourrait aussi jouer un rôle dans la résistance de la paroi aux tensions et/ou aux compressions. En effet, un traitement des tubes polliniques de *S. chacoense* avec une lyticase, enzyme capable de dégrader la callose, provoque une réduction de la rigidité de la paroi, augmente le diamètre des tubes polliniques et augmente la viscoélasticité dans la partie distale du tube pollinique (Geitmann, 1999; Parre and Geitmann, 2005a).

### 2-1-2- Les hémicelluloses

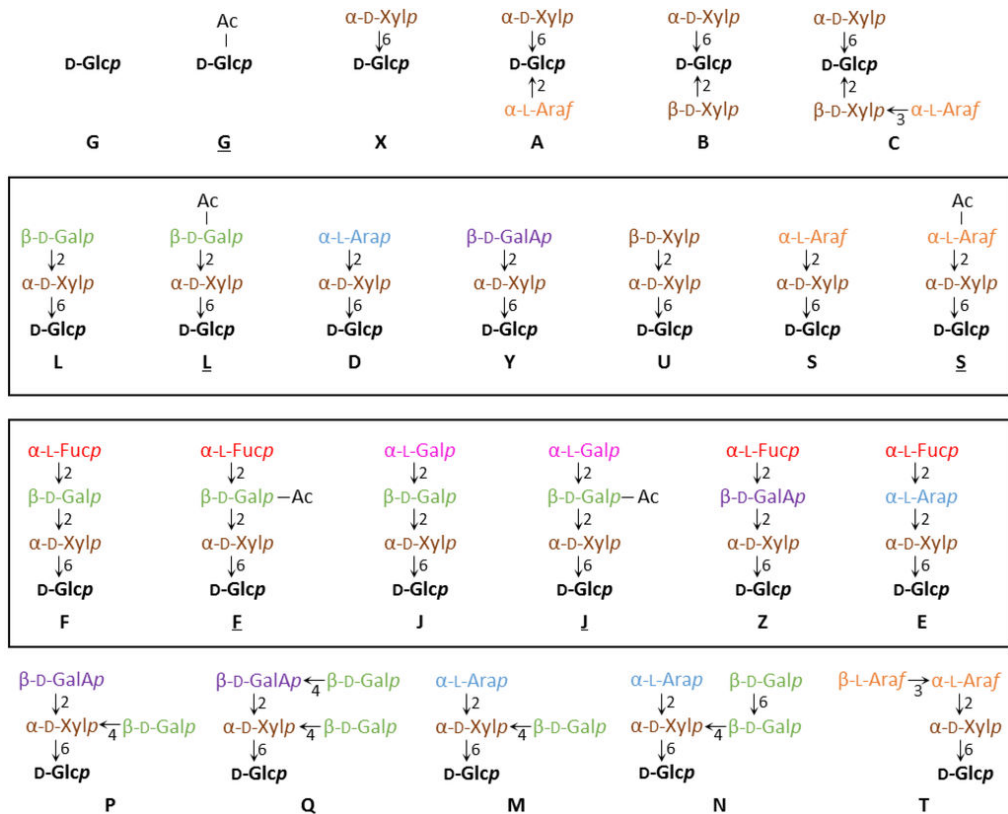
Les hémicelluloses sont définies comme étant « des polysaccharides de la paroi qui ne peuvent être solubilisés par des tampons, de l'eau chaude ou des agents chélateurs mais uniquement par des agents chaotropiques plus ou moins forts tels que les bases » (O'Neill and York, 2003; Obel et al., 2007). Elles sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique, mais aussi comme plastique et comme additif alimentaire (E426). Les hémicelluloses sont assemblées dans l'appareil de Golgi, puis sécrétées par exocytose dans la paroi *via* le *trans-Golgi network* (Driouich et al., 2012).

Le squelette des hémicelluloses est composé de résidus  $\beta$ -(1,4)-D-pyranose. Ces résidus peuvent être du glucose, mannose ou xylose. Les hémicelluloses sont alors appelées xyloglucanes (XyG), mannanes ou xylanes, respectivement (Ebringerová, 2005). Les plus abondantes de la paroi sont : les XyG, mannanes, glucomannanes, xylanes et les arabinoxylanes. Un autre groupe appelé glucanes à liaisons mixtes possèdent des liaisons en (1,4) et (1,3). Selon l'espèce et le type de paroi (primaire ou secondaire), la composition en hémicellulose varie.

#### Les xyloglucanes

Les XyG sont des chaînes de D-glucose liés en  $\beta$ -(1,4). Ils ont un DP inférieur à celui de la cellulose et peuvent atteindre 3500 (Fry, 1989). Ils peuvent être *O*-acétylés à différentes positions (Kiefer et al., 1989). Ces glucanes peuvent être substitués en  $\beta$ -(1,6) par des chaînes latérales composées le plus souvent de xylose, galactose, arabinose et/ou fucose. Afin de faciliter la description de ces XyGs, Fry et al. (1993) ont proposé une nomenclature se basant sur l'utilisation d'un code à une lettre, et reposant sur la nature du sucre terminal de la chaîne latérale.

Les plus communes sont : X, G, F, L et S (Fig. 16), alors que les motifs considérés comme les plus rares sont : J, B, C... etc. La présence de groupements *O*-acétylés sur ces motifs est indiquée par une lettre soulignée.



**Figure 16 :** Composition des chaînes latérales de XyG et leurs diversités.  
(Schultink et al., 2014)

Plusieurs protéines impliquées dans la synthèse du XyG ont été identifiées. Ces protéines ont été localisées dans l'appareil de Golgi. La synthèse de la chaîne principale se fait en premier par le biais de (1-4)- $\beta$ -glucan synthase, dans le compartiment *cis* de l'appareil de Golgi (Chevalier et al., 2010).

La maturation du XyG a lieu dans les compartiments *median* et *trans*, cette maturation commence par l'ajout de xylose sur les chaînes de glucose *via* des XyG xylosyltransférases qui appartiennent à la famille des glycosyltransférases. La substitution d'un résidu fucose sur le galactose se fait par le biais des XyG fucosyltransférases, telles qu'AtFUT1 qui permet l'ajout du fucose en  $\alpha$ -(1,2). Ce fucose est apporté par l'UDP-L-fucose qui provient du GDP-D-mannose (Nakayama et al., 2003).

Les XyG sont liés à la cellulose par des ponts hydrogène qui permettent de réguler l'expansion cellulaire. En effet, les XyGs ont été particulièrement étudiés car ils sont essentiels pour déterminer l'expansibilité de la paroi primaire, l'expansion des parois étant un des sujets fondamentaux de la recherche sur les parois végétales (Cosgrove, 2005; Obel et al., 2007). Ils permettent également d'empêcher l'agrégation des microfibrilles de cellulose et augmente

également la résistance de la paroi cellulaire (Scheller and Ulvskov, 2010; Popper et al., 2011). Mais aucune information sur ces interactions n'est disponible à ce jour dans le tube pollinique.

Pour l'instant, le XyG est la seule hémicellulose décrite dans le tube pollinique. Chez *A. thaliana*, les épitopes associés au XyG sont détectés tout au long du tube pollinique (Dardelle et al., 2010). L'analyse de la paroi du tube pollinique par spectrométrie de masse après digestion à l'endo-glucanase a permis de distinguer deux oligosaccharides dominants (XLXG/XXLG et XXFG), tous les deux étant mono *O*-acétylés. Ils représentent 68% des ions totaux (Dardelle et al., 2010), alors que les fragments de XyG provenant des organes végétatifs d'*A. thaliana* sont majoritairement XXXG (Zablackis et al., 1995; Lerouxel et al., 2002; Nguema-Ona et al., 2006; Obel et al., 2009).

L'étude du mutant *reb1-1* (*root epidermal bulger1-1*) chez *A. thaliana*, possédant des XyGs non fucosylé et non galactosylé, a montré un phénotype au niveau des poils absorbants, cellules possédant le même type de croissance polarisée que les tubes polliniques. *REB1* coderait pour une enzyme (UDP-D-Glucose 4-epimerase) impliquée dans la biosynthèse du D-galactose et la structure des XyGs est affectée. Ces résultats suggèrent que les résidus galactoses joueraient un rôle prépondérant dans l'interaction entre le XyG et la cellulose (Nguema-Ona et al., 2006).

Ces deux résultats, mis en parallèle, démontrent que la paroi du tube pollinique possède ses propres caractéristiques par rapport aux organes végétatifs (Mollet et al., 2013). Chez *N. alata* et chez plusieurs espèces de tomates, des XyG fucosylés ont également été retrouvés. Alors que chez les Solanacées, l'analyse du XyG dans les organes végétatifs montre uniquement des motifs arabinosylés et non pas fucosylés. Ceci semble indiquer l'importance de la fucosylation du XyG dans la paroi des tubes polliniques (Dardelle et al., 2015; Mollet et al., 2013). Par contre, la présence de résidus fucosylés sur le XyG pourrait promouvoir une plus faible interaction avec la cellulose, particulièrement à l'apex afin d'assurer une croissance rapide. En outre, la présence de groupements *O*-acétyls sur le XyG pourrait moduler l'interaction entre les polymères et/ou empêcher sa dégradation enzymatique (Mollet et al., 2013).

Par une approche de bioinformatique, Lehner et al. (2015) ont recherché des gènes codant pour des XyG fucosyltransférases proches d'AtFUT1 et PsFT1, deux protéines caractérisées comme étant des galactoside  $\alpha$ -2-fucosyltransferases. Ainsi, la présence de 19 gènes a été prédite chez *Solanum lycopersicum*, *Solanum melongena*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annuum* et *Coffea canephora*. Ces gènes codent des protéines contenant toutes, 3 motifs identiques trouvés chez les  $\alpha$ -1,2- et  $\alpha$ -

1,6-fucosyltransférases. Sur ces 19 protéines, six ont montré de fortes similarités avec AtFUT1 et/ou PsFT1, ce qui en fait de très bonnes candidates pour la fucosylation. Néanmoins, des données expérimentales sont nécessaires pour vérifier plus en détail le profil d'expression de ces gènes dans les grains de pollen et dans les tubes polliniques, et d'évaluer leurs fonctions biochimiques.

### **2-1-3- Les pectines**

Les pectines sont les composants majoritaires de la paroi primaire et de la lamelle moyenne des eudicotylédones, elles peuvent représenter environ 40% de la paroi d'*A. thaliana* (Zabackis et al., 1995; Liepman et al., 2010). Les pectines sont très utilisées comme additifs alimentaires (E440) pour conférer des propriétés gélifiantes et stabilisantes pour les confitures, les gelées, les marmelades, les produits laitiers et les plats préparés (Sakai et al., 1993).

Les pectines sont des polysaccharides complexes qui sont extraits de la paroi par de l'eau chaude, des acides dilués ou des chélateurs de calcium. Les pectines sont constituées de trois principaux domaines : l'homogalacturonane (HG), le rhamnogalacturonane-I (RG-I) et le rhamnogalacturonane-II (RG-II) (Zabackis et al., 1995).

D'autres domaines ont été caractérisés par la suite, le xylogalacturonane et l'apiogalacturonane, qui sont constitués d'une chaîne d'acide galacturonique substituée par des  $\beta$ -D-xylopyranoses ou  $\beta$ -D-apiofuranoses, respectivement (Hart and Kindel, 1970; Longland et al., 1989; Schols et al., 1995).

Cinquante trois enzymes seraient nécessaires à la synthèse de tous les domaines pectiques dont 14 *O*-acétyl et *O*-méthyltransférases, et plus de 17 glycosyltransférases (Mohnen, 2008). La biosynthèse, comme pour les hémicelluloses, a lieu dans l'appareil de Golgi (*cis*, *median* et *trans*), les polysaccharides sont ensuite exportés vers la paroi dans des vésicules de sécrétion (Driouich et al., 2012).

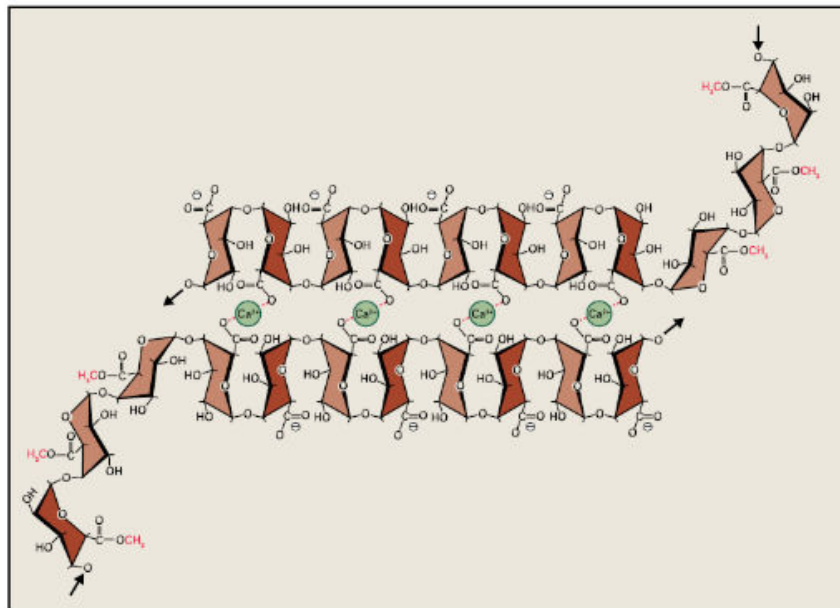
#### **Les homogalacturonanes**

Les homogalacturonanes (HGs) sont des polymères linéaires composés de résidus d'acide  $\alpha$ -(1,4)-D-galacturonique. Ces résidus peuvent être méthylestérifiés en C6 et/ou *O*-acétylés en C2 et C3.

Les HGs sont synthétisés et sécrétés sous forme fortement méthylestérifiés (Zhang and Staehelin, 1992; Cheung and Wu, 2008), et seront par la suite déméthylestérifiés dans la paroi par le biais de pectines méthylestérases (PMEs). Cette modification du degré de



methylestérification des HGs a lieu très près de l'apex (entre 3 et 10  $\mu\text{M}$ ). Deux réactions sont sous le contrôle du degré de méthylation (DM): la formation de structure en « boîte à œuf » permettant à plusieurs HGs d'interagir entre eux par des ponts  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 17). Cette structure permettrait de rigidifier la paroi. De même, l'élimination des groupements méthyles permet l'action de la polygalacturonases (PGases) sur les HGs pour le relâchement pariétal (Micheli, 2001; Jarvis et al., 2003; Pelloux et al., 2007; Chebli et al., 2012).



**Figure 17 :** Représentation schématique de la structure « boîte à œuf » des HG (Carpita et al., 2015)

La synthèse des HGs se fait par le biais des galacturonosyltransférases (GalAT) qui vont catalyser l'élongation des HGs. L'identité de ces enzymes a été découverte chez *A. thaliana*, GALactUronosylTransférase1 (GAUT1) appartient à la famille des GT8 et a été la première caractérisée biochimiquement (Sterling et al., 2001, 2006). Quinze gènes d'*AtGAUT*, sauf *AtGAUT2*, sont exprimés de façon ubiquitaire alors que 10 *AtGATL* (*GAUT-like*) sont exprimés de façon spécifique dans les tissus (Caffall et al., 2009; Kong et al., 2011; Funakawa and Miwa, 2015). Alors qu'aucun des mutants *gaut13* ou *gaut14* n'a montré de phénotype au niveau de la plante, les doubles mutants *gaut13/gaut14* présentent une inhibition de l'élongation des tubes polliniques (Wang et al., 2013).

D'autre part, afin de comprendre le rôle des HGs dans la paroi des tubes polliniques, plusieurs traitements enzymatiques ont été faits. Le traitement avec une pectinase commerciale à de faibles concentrations permet de promouvoir la croissance des tubes polliniques et de diminuer la rigidité du tube pollinique, aussi bien sur la partie cylindrique qu'à l'apex, induisant son gonflement. De plus fortes concentrations induisent une explosion des tubes polliniques.

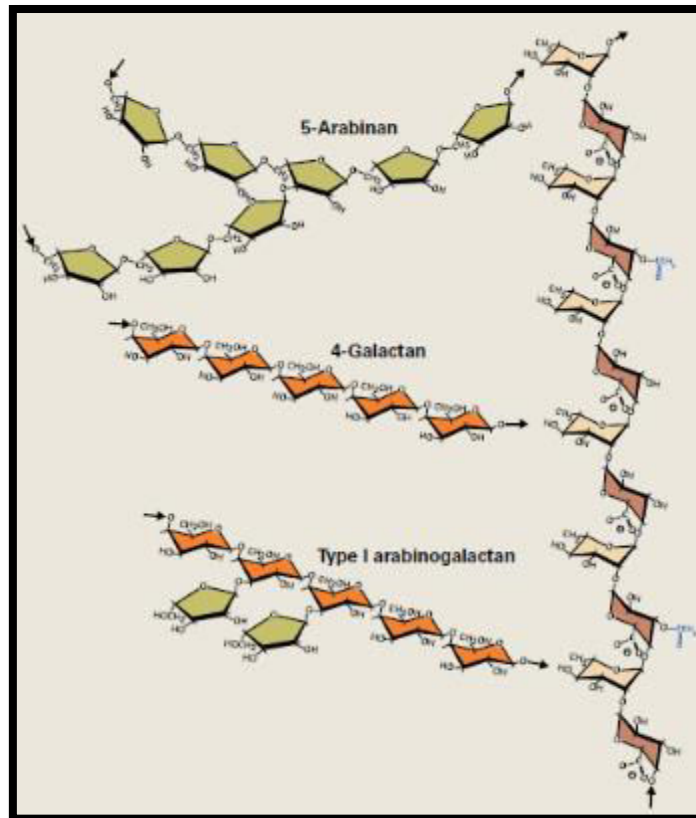
Le traitement des tubes polliniques avec des PME exogènes induit un résultat opposé puisque la rigidité du tube pollinique augmente en raison de la déméthylestérification des HGs, provoquant la formation des boîtes à œufs entre les chaînes HGs *via* des ponts calciques (Parre and Geitmann, 2005b).

### **Le rhamnogalacturonane de type I**

Le RG-I se compose de la répétition d'une unité disaccharide composé de  $\alpha$ -L-rhamnopyranose lié en  $\alpha$ -(1,4) avec du D-galacturonosylpyranose. Le DP de polymère peut dépasser 100 (McNeil et al., 1980 ; Visser and Voragen, 1996). L'acide galacturonique peut aussi être *O*-acétylé en C2 ou C3, et le rhamnose peut être substitué en C4 par des sucres neutres. Ces sucres neutres peuvent être seuls (galactose) ou former de longues chaînes linéaires ou branchées, telles que des arabinogalactanes de type I, des arabinanes ou des galactanes (50 résidus ou plus) (Fig. 18). Les monosaccharides sont liés en  $\alpha$ -(1,5) pour l'arabinose et en  $\beta$ -(1,4) et  $\beta$ -(1,6) pour le galactose. La taille, la configuration et les types des chaînes latérales sur le RG-I dépendent de l'espèce, de l'organe, des tissus et des stades de développement (Vincken et al., 2003).

Le RG-I jouerait également un rôle dans la rigidification de la paroi, notamment *via* la présence des chaînes de galactanes. En effet, une paroi qui en contient est deux fois plus rigide qu'une paroi qui n'en contient pas (McCartney et al., 2000). Par contre, les chaînes d'arabinanes réduiraient la rigidification de la paroi (Jones et al., 2003; Caffall and Mohnen, 2009)

Stonebloom et al. (2016) ont identifié un gène *At3g26370* qui coderait une glycosyltransférase. Celle-ci serait responsable de la synthèse des chaînes d'arabinogalactanes liées au RG-I, ils l'ont nommé Pectic Arabino Galactan synthesis-Related (PAGR). Une mutation dans ce gène affecte la croissance du tube pollinique.



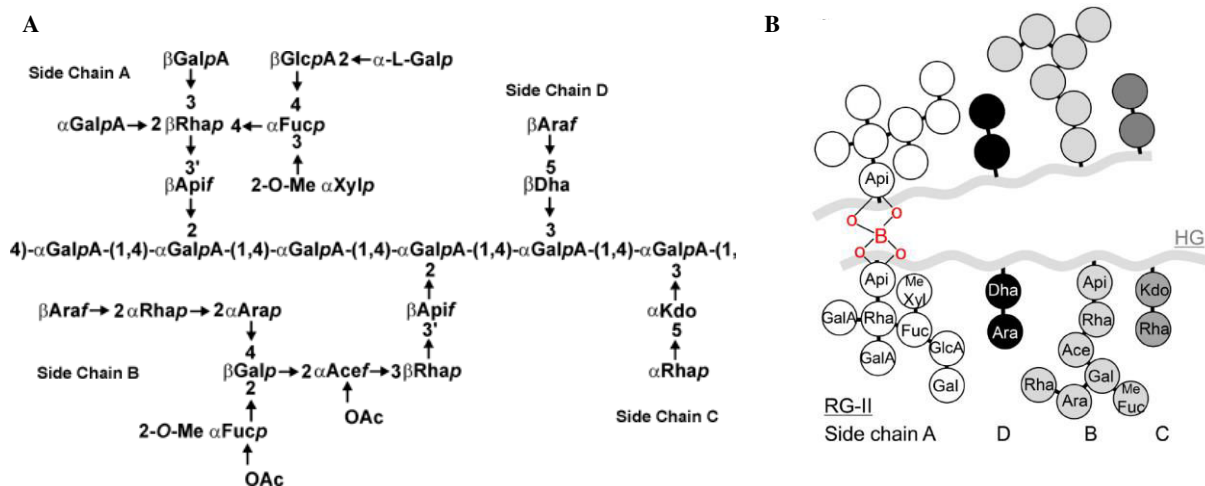
**Figure 18 :** Représentation schématique de la structure du RG-I et de ses chaînes latérales. (Carpita et al., 2015)

Les chaînes latérales du RG-I sont également présentes en abondance dans la paroi des tubes polliniques. Les chaînes d'arabinanes sont distribuées de façon uniforme dans tout le tube pollinique. Au microscope électronique à transmission, les arabinanes ont été plus détectés dans la paroi externe du tube pollinique. Les chaînes de galactanes ont également été trouvées dans les tubes polliniques d'*A. thaliana*, mais le marquage reste très faible (Dardelle et al., 2010).

La paroi des tubes polliniques d'*A. thaliana* est composée de 43% d'arabinose et 8% de galactose provenant probablement des chaînes latérales du RG-I et/ou des AGPs. Elle est composée également de 20% de glucose provenant en majorité de la callose (et dans une moindre mesure des XyGs), 11% d'acide galacturonique et 5% de rhamnose. Ces données suggèrent que la paroi est composée pour moitié d'HG, et pour l'autre de chaînes principales de RG-I fortement substituées par des arabinanes, révélant un rôle important des chaînes d'arabinanes du RG-I dans la croissance et le développement du tube pollinique (Dardelle et al., 2010; Mollet et al., 2013).

## Le rhamnogalacturonane de type II

Le RG-II est composé d'une chaîne principale de  $\alpha$ -(1,4)-D-galacturonate substituée par 4 chaînes latérales complexes (Fig. 19). Le RG-II est caractérisé par la présence de sucres particuliers dont le D-apiose (Api), l'acide L-acérique (AceA), le 2-O-méthyl-L-fucose, le O-méthyl-D-xylose, le L-galactose, l'acide 2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosarique (Dha), et le 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate (Kdo). Malgré cette complexité, sa structure est très conservée chez toutes les plantes terrestres, ce qui souligne l'importance de ce motif dans la paroi en dépit de sa faible abondance. Une des caractéristiques importante du RG-II est sa capacité à former des dimères à l'aide d'un atome de bore *via* des liaisons diester-borates entre deux résidus apiose de la chaîne A (O'Neill et al., 2004). Cette dimérisation est facilitée par des chaperonnes qui peuvent être des polyhistidine et des glycoprotéines de la paroi, sans que cette dimérisation soit définitive (Chormova and Fry, 2016). Cette dimérisation jouerait également un rôle dans la rigidification de la paroi.



**Figure 19** : Représentation schématique de la structure du RG-II (A) et de sa dimérisation avec un atome de bore (B) (O'Neill, 2001; Funakawa and Miwa, 2015)

Le RG-II semble également avoir un rôle important dans la germination et la croissance du tube pollinique. Delmas et al. (2008) ont montré que la mutation d'un gène codant pour une KDO SYNTHASE inhibait la germination des tubes polliniques induisant une stérilité mâle. La croissance du tube pollinique est aussi considérablement réduite lors de la mutation d'un gène codant pour une glycosyltransférase MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 4 (MGP4) impliquée dans la synthèse du RG-II (Liu et al., 2011). Un autre mutant hétérozygote impliqué dans l'activation du Kdo : *cks* (*cmp-kdo synthetase*) inhiberait l'élongation des tubes polliniques (Kobayashi et al., 2011). Plus récemment, les travaux de Dumont et al. (2014) ont montré

l'importance d'un gène codant une SIALYLTRANSFERASE-LIKE 2 (SIA2), qui est probablement impliqué dans le transfert du Dha ou du Kdo sur le RG-II. En effet, les mutants hétérozygotes montrent un taux de germination très faible, des tubes polliniques très courts et *in vivo* une absence de transmission de la mutation par le gamétophyte mâle, expliquant l'absence de lignées homozygotes pour cette mutation. Il y a très peu d'étude sur la distribution du RG-II dans la paroi du tube pollinique. Le RG-II a été mis en évidence dans les tubes polliniques de lys *via* l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le complexe RG-II-borate et la forme monomérique du RG-II (Matoh et al., 1998). En utilisant le même anticorps, un faible marquage a aussi été observé sur tout le tube pollinique d'*A. thaliana*, de *S. lycopersicum* et de *N. benthamiana* (Dumont et al., 2014).

## 2-2-Les glycoprotéines de la paroi

Après les polysaccharides, les composants essentiels de la paroi sont les protéines. Chez *A. thaliana*, il y a entre 1000 et 2000 protéines pariétales différentes, qui représentent environ 10% de la masse sèche de la paroi (Borderies et al., 2003; Lee et al., 2004). Les protéines pariétales ne sont pas restreintes à la paroi elle-même, mais forment aussi des éléments structuraux et fonctionnels entre la paroi et la membrane plasmique. Ce continuum est vital pour la perception des signaux de l'environnement externe (Jamet et al., 2006; Johnson et al., 2013).

Les analyses des protéines extraites de la paroi ont montré que les protéines sont riches en acides aminés hydroxyproline (Hyp), proline (Pro), Sérine/thréonine (Ser/Thr) et glycine (Gly) (Lamport, 2001). Ces protéines sont des *hydroxyproline-rich glycoproteins* (HRGPs) et des *glycine-rich glycoproteins* (GRPs). Ces protéines sont non enzymatiques (Showalter, 1993; Cassab, 1998).

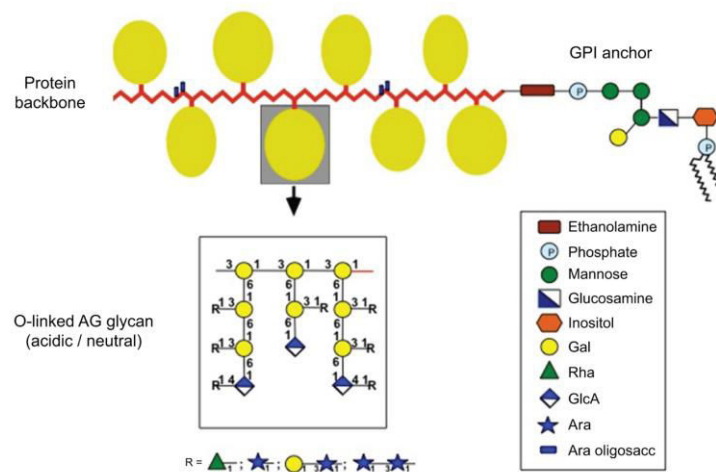
Les HRGPs incluent les extensines, les arabinogalactanes-protéines (AGPs) et les *proline-rich proteins* (PRPs). Sur les peptides des HRGPs, de larges fragments glycaniques sont insérés par *O*-glycosylation (Showalter, 1993).

### 2-2-1- Les arabinogalactanes protéines (AGPs)

Elles ont été mises en évidence pour la première fois dans les sécrétions de l'acacia appelées gomme arabique. Ce sont des protéoglycanes de la paroi et de la membrane plasmique fortement *O*-glycosylés. Cette *O*-glycosylation est composée d'un ou plusieurs polysaccharides complexes contenant principalement du D-galactose ou du L-arabinose. Ces motifs

glycosidiques décorant le corps protéique sont divers et variés et dépendent de l'espèce, du tissu et du stade de développement (Seifert and Roberts, 2007). Cependant, ces motifs sont souvent nommés arabinogalactanes de type II, constitués généralement d'une chaîne principale de galactanes liés en  $\beta$ -(1,3), avec les chaînes secondaires de galactanes liés en  $\beta$ -(1,6). Ces dernières sont souvent substituées avec de l'arabinose, mais aussi avec du rhamnose et de l'acide glucuronique en proportions plus faibles. Les premières mises en évidence des AGPs ont été faites grâce à la synthèse d'un phénylglycoside, un réactif nommé  $\beta$ -D-glucosyl de Yariv (Yariv et al., 1962). Ce réactif permet de se lier spécifiquement aux  $\beta$ -(1,3)-galactanes des AGPs (Kitazawa et al., 2013).

Le corps protéique des AGPs est caractérisé par sa richesse en 5 acides aminés : hydroxyproline/proline, sérine, thréonine et alanine. La partie polysaccharidique des AGPs peut représenter jusqu'à 90% de la masse totale. Les AGPs sont classées en 4 sous-groupes : AGPs classiques, AGPs riches en lysine (Lys-rich AGPs), AGPs peptides et les fasciclin-like AGPs (Schultz et al., 2002). Le corps protéique des AGPs non matures est constitué de 3 domaines distincts : un peptide signal en N-terminal, un domaine riche en proline/hydroxyproline et un domaine hydrophobe en C-terminal. Un site d'ancrage pour les AGPs dans la membrane plasmique, notamment par le biais d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), a été caractérisé chez le poirier et la rose (Oxley and Bacic, 1999; Svetek et al., 1999). Cette ancre peut être clivée sous l'action de phospholipases C et D, libérant ainsi les AGPs dans la paroi (Fig. 20). Chez *A. thaliana*, 55 des 85 AGPs sont prédites avec une ancre GPI (Showalter et al., 2010).



**Figure 20** : Représentation schématique de la structure des AGPs. (Tan et al., 2012)

Les AGPs ont beaucoup de fonctions biologiques durant le cycle de vie de la plante et sont particulièrement associées avec le développement et la reproduction. Rae et al. (1985) ont déduit que les AGPs sont des composants mineurs de la paroi des tubes polliniques, après l'analyse de la composition des extraits de paroi de *Nicotina glauca* qui contient des  $\alpha$ -(1,5) arabinanes, une grande quantité de callose et peu de cellulose. Chez *A. thaliana*, une étude plus récente indique que la paroi des tubes polliniques contenait du galactose provenant d'arabinogalactanes de type II (galactose lié en 3 et 3,6). Les résidus de galactose restant (liés en 4 et 4,6) sont typiques d'arabinogalactanes de type I caractéristique du RG-I (Dardelle et al., 2010; Nguema-Ona et al., 2012). D'après des études immunohistochimiques, les AGPs sont détectées dans l'apex du tube pollinique d'*A. thaliana*. La croissance des tubes polliniques de lys est inhibée après un traitement au réactif de Yariv. Cette inhibition de croissance est réversible lorsque le réactif est retiré du milieu et un nouvel apex émerge en arrière du premier (Mollet et al., 2002). Les gènes *AGP6* et *AGP11* semblent être exprimés spécifiquement dans le pollen (Pereira et al., 2006). Le double mutant *agp6/agp11* présente de nombreux grains de pollen avortés, un taux de germination fortement réduit et des tubes polliniques présentant une longueur de 35% inférieure au sauvage (Coimbra et al., 2010). Ces travaux suggèrent un rôle des AGPs dans l'élongation et la croissance polarisée des tubes polliniques.

### 2-2-2- Les extensines

Elles ont été identifiées il y a un peu plus de 50 ans (Lamport, 1963) et sont considérées à présent comme des éléments structuraux de la paroi primaire (Cannon et al., 2008; Lamport et al., 2011). Le génome d'*A. thaliana* compte 65 gènes codant des extensines (Showalter et al., 2010). Elles se distinguent des autres HRGPs par un motif répété de sérine et d'hydroxyproline. Les hydroxyprolines représentent 40% de la masse molaire du corps protéique, elles sont arabinosylées tandis que les sérines sont galactosylées (Wilson and Fry, 1986).

Les extensines sont présentes dans la paroi interne du tube pollinique du maïs (Sommer-Knudsen et al., 1997). Baumberger et al. (2003) ont mis en évidence la présence d'extensines chimères dans le génome d'*A. thaliana* et du riz. Ces LRX (LRR/EXTENSIN) contiennent un domaine LRR (*leucine-rich repeat*) et un domaine extensine. Le domaine LRR est un motif protéique qui sert d'intermédiaire dans les interactions spécifiques protéines-protéines (Kobe and Deisenhofer, 1994, 1995). Une extensine spécifique du pollen PEX1 (POLLEN EXTENSIN-LIKE 1) jouerait un rôle dans le développement du tube pollinique (Rubinstein *et al.*, 1995). Les travaux de Stratford et al. (2001) ont montré que cette extensine contenait

également un domaine LRR. Ce domaine LRR, qui est un domaine conservé, suggère que PEX1 est impliquée dans l'interaction protéine-ligand durant la croissance du tube pollinique.

Le rôle d'une autre extensine dans le tube pollinique a été mis en évidence : EXT18. Le mutant *ext18* présente un taux élevé de grains de pollen non viable et sur le peu de grains de pollen viable qui reste (10% en comparaison aux 60% de viables chez le sauvage), les tubes polliniques qui parviennent à émerger du grain de pollen explosent (Choudhary et al., 2015).

Les arabinosyls sont ajoutés au corps protéique par le biais d'Hydroxyproline O-arabinosyltransférases (HPATs). L'effet du triple mutant *hpat1/2/3* knockout chez *A. thaliana* est stérile car les tubes polliniques ne s'allongent pas assez après la pollinisation. Ceci laisse penser que la présence d'arabinose dans les extensines joue un rôle dans l'élongation du tube pollinique (MacAlister et al., 2016)

## 2-3- Le remodelage de la paroi du tube pollinique

La paroi n'a pas une architecture figée. Au cours de la vie de la cellule, elle va subir des modifications durant la croissance et le développement normal de la cellule afin de pouvoir devenir plus rigide, plus flexible et/ou plus poreuse.

Ces modifications vont se faire par le biais d'enzymes pariétales après le dépôt des composés pariétaux. Ces enzymes de la paroi ont des fonctions diverses. Par exemple, il y a des enzymes impliquées dans la modification des polysaccharides pariétaux tels que les xyloglucane-endo-transglucosidases/hydrolases (XET ou XTH), les PME, les endoglucanases ou les polygalacturonases (PGases) (Fry, 1995; Bordenave, 1996; Campbell and Braam, 1999; Cosgrove, 2005)

D'autres protéines vont venir modifier les connexions entre les différents polysaccharides de la paroi afin de contrôler le relâchement de la paroi, tels que les expansines qui permettent la relaxation du réseau cellulose-hémicellulose en milieu acide (Cosgrove, 2000). L'analyse du profil d'expression de ces gènes a révélé que deux expansines, une  $\alpha$ -*EXPA4* et une  $\beta$ -*EXPB5*, sont fortement exprimées dans les grains de pollen secs, ainsi que durant l'imbibition du pollen et la croissance du tube pollinique (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Sharova, 2007).

Les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\cdot$ ), produit dans l'apoplaste du tissu, joueraient un rôle lors du relâchement de la paroi pendant la germination des graines de *Lepidium sativum* (Müller et al., 2009). Cette réaction est non spécifique, irréversible et ces radicaux sont capables de rompre très localement des liaisons covalentes dans beaucoup de molécules (Halliwell and Gutteridge,



1990). Ainsi, des polysaccharides tels que les pectines et le XyG peuvent être hydrolysés *in vitro* en présence de OH<sup>-</sup> (Miller, 1986; Fry, 1998). OH<sup>-</sup> est produit par la réaction de Fenton en utilisant comme donneur d'électrons l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et comme receveur d'électrons le Fe<sup>2+</sup> ou le Cu<sup>2+</sup>. La production de OH<sup>-</sup> peut également être catalysée par la peroxydase à partir de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en présence d'un agent réducteur comme le NADPH (Chen and Schopfer, 1999).

### **2-3-1- Xyloglucane-endo-transglucosidases/hydrolases**

Ces enzymes (xyloglucane-endo-transglucosidases/hydrolases ou XTH) possèdent deux activités. L'activité xyloglucane-endo-transglucosidases permet de cliver les polymères de XyG et d'assembler les nouveaux fragments avec d'autres chaînes de XyG. L'activité des xyloglucane-*endo*-hydrolases permet d'hydrolyser le XyG. Les XTHs joueraient un rôle central dans la construction et pour défaire l'assemblage de la paroi (Rose, 2003). *Via* une construction GUS, l'activité *XTH29* et *XTH30* a été détectée au cours du développement des anthères et dans les grains de pollen matures (Becnel et al., 2006), alors que *XTH1* et *XTH33* sont uniquement détectés dans des fleurs très jeunes. Le profil d'expression de *XTH29* et *XTH30* semblerait être pollen spécifique (Mollet et al., 2013).

### **2-3-2- Pectines méthylestérases et leurs inhibiteurs/ pectines acétylestérases**

La plupart des PME de plantes déméthylestérifient les HGs en bloc, alors que les PME fongiques agissent de façon plus aléatoire (Verlent et al., 2005).

Les premiers mutants qui ont révélé l'importance des PME dans la croissance du tube pollinique sont les mutants *vanguard1* (*vgd1*), qui présentent des tubes polliniques explosant *in vivo* et une forte réduction de la fertilité (Jiang et al., 2005). L'inactivation d'*AtPPME1* affecte la forme des tubes polliniques et le taux de germination du pollen, suggérant qu'*AtPPME1* est nécessaire pour maintenir l'intégrité de la paroi et la croissance polarisée (Tian *et al.*, 2006). Une autre PME, *PME48*, est la seconde PME la plus exprimée dans les grains de pollen secs et imbibés. Les grains de pollen de mutants homozygotes *pme48*<sup>-/-</sup>, présentent un délai d'imbibition et de germination. De plus, de nombreux grains de pollen présentent deux apex émergents du grain au lieu d'un seul chez le sauvage. Le phénotype sauvage de ce mutant est restauré par l'ajout de calcium dans le milieu. Ceci suggère que chez le sauvage, les HGs faiblement méthylestérifiés dans la paroi du grain de pollen seraient une source de calcium

nécessaire à la signalétique durant la germination (Leroux et al., 2015). Ces études confirment l'importance des PME dans l'élongation du tube pollinique et sa germination.

Les activités des PME sont contrôlées négativement et spatio-temporellement par les PMEIs (Inhibiteurs de PME) (Camardella et al., 2000; Giovane et al., 2004; Wolf et al., 2009). Les PMEIs joueraient un rôle crucial dans la régulation de l'activité des PME durant la germination du pollen et la croissance du tube pollinique (Bosch et al., 2005). Un PMEI (At1g10770) a été montré comme important dans le pollen. En effet, la suppression de son expression induit une diminution du nombre de graines (une stérilité mâle partielle) par inhibition de la croissance des tubes polliniques (Zhang et al., 2010). L'apport exogène d'un PMEI purifié de kiwi induit l'explosion des tubes polliniques (Paynel et al., 2014).

Une seule pectine acétylestérase a été détectée à ce jour dans le pollen du riz (Dai et al., 2006). Chez le tabac, la surexpression de la *PECTIN-ACETYLESTERASE 1 (PAEI)*, isolée du peuplier, affecterait la forme des grains de pollen et leurs pouvoirs germinatifs (Gou et al., 2012).

### 2-3-3- Glycane hydrolase

Les enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -glucanes : *endo*-(1,3)- $\beta$ -glucanases et *endo*-(1,4)- $\beta$ -glucosidases. Un traitement modéré des tubes polliniques avec une *endo*-(1,3)- $\beta$ -glucanase stimule la germination des grains de pollen (Roggen and Stanley, 1969; Parre and Geitmann, 2005a) alors qu'un traitement avec des inhibiteurs de glucosidases, le D-gluconolactone et la nojirimycine, inhibent la croissance des tubes polliniques (Kotake et al., 2000). Il a été montré que l'*endo*-(1,3)- $\beta$ -glucanase jouerait un rôle important dans l'élongation des tubes polliniques de lys (Takeda et al., 2004). Une hypothèse a donc été émise, selon laquelle les propriétés mécaniques de la callose, particulièrement la résistance à la déformation latérale, seraient régulées par les glucanases (Parre and Geitmann, 2005a; Abercrombie et al., 2011; Mollet et al., 2013).

Les PGases sont impliquées dans la dégradation des HGs. Les PGases sont impliquées lors de la maturation des grains de pollen de *Brassica campestris* dans la formation de l'exine et/ou de l'intine (Huang et al., 2009). Elles sont également libérées lors de la réhydratation du pollen (Zaidi et al., 2012). Elles sont également détectées dans l'apex des tubes polliniques chez *Brassica napus* lors de la pénétration du tube pollinique dans les papilles stigmatiques, suggérant qu'elles joueraient un rôle dans le relâchement local de la paroi des cellules stigmatiques lors de la pollinisation (Dearnaley and Daggard, 2001). Comme les PGases

dégradent les HGs faiblement méthylestérifiés et que la déméthylestérification de ces HGs par les PME est accompagnée d'une libération de protons, il a été suggéré que ce changement local de pH dans la paroi des tubes polliniques pourrait promouvoir l'activité des PGases (Micheli, 2001; Bosch and Hepler, 2005).

Les  $\beta$ -galactosidases (BGALs) peuvent agir sur différents substrats incluant les AGPs, galactolipides, ainsi que les chaînes latérales des RG-I, RG-II et XyG en libérant ainsi du galactose. Deux *BGALs* sont fortement exprimées dans les grains de pollen mature et deux autres sont fortement exprimés dans le pistil chez *Arabidopsis* (Mollet et al., 2013). Chez le riz, deux gènes sont fortement exprimés dans les grains de pollen secs (Mollet et al., 2013). Comme les mutants défectueux en *BGALs* présentent des altérations de la fertilité, une hypothèse suggérant que celles-ci pourraient être impliquées dans le turnover de la paroi des tubes polliniques de *Brassica campestris* en hydrolysant les arabinogalactanes a été émise (Singh and Knox, 1985). Il a également été suggéré qu'elles joueraient un rôle dans le guidage des tubes polliniques dans le style en modifiant les chaînes latérales des AGPs (Cheung et al., 1995; Wu et al., 1995).

Les arabinofuranosidases hydrolysent la partie terminale non réductrice des résidus d' $\alpha$ -L-arabinofuranosides permettant de libérer des oligomères d'arabinoses (Tagawa and Kaji, 1969). Les données transcriptomiques ne montrent pas une forte expression dans le pollen de gènes codant pour des arabinofuranosidases. Ce résultat est très surprenant car l'arabinose est l'un des constituants principaux de la paroi des tubes polliniques d'*A. thaliana*. Ceci suggère deux possibilités, soit les arabinanes des tubes polliniques ne sont pas remodelés et/ou des arabinofuranosidases proviendraient du tissu femelle (Dardelle et al., 2010; Mollet et al., 2013).

### **III- L'adhésion cellulaire**

L'adhésion cellulaire est un mécanisme commun chez beaucoup de systèmes biologiques et se fait par le biais de la matrice extracellulaire. Les cellules animales et végétales possèdent toutes deux une matrice extracellulaire (Wyatt and Carpita, 1993), l'une étant principalement protéique et l'autre principalement osidique (Cassab, 1998; Borner et al., 2003; Albersheim et al., 2010; Lee et al., 2011; Albenne et al., 2013). Alors que l'adhésion cellulaire dans les cellules animales est plutôt bien décrite dans la bibliographie (Harwood and Coates, 2004). Peu d'information est disponible sur les mécanismes d'adhésion des cellules végétales.

Cependant plusieurs types d'adhésion cellulaire ont été décrits :

1/ Entre la membrane plasmique et la paroi : Une des molécules décrites comme permettant ce type d'adhésion est une vitronectine-like (Zhu et al., 1993) appartenant à la famille des intégrines, également présente chez les animaux.

2/ Entre les cellules au sein d'un tissu : par le biais de jonctions intercellulaires, lors de la mise en place de la paroi après la cytokinèse, lamelle moyenne se forme permet l'attachement cellule-cellule.

3/ Par contact *de novo* entre deux cellules appelée également adhésion active et qui est retrouvée lors de la reproduction sexuée.

### 3-1- Généralités sur l'adhésion

La majorité des cellules végétales maintiennent une position fixe durant leur développement adhérant aux cellules voisines par l'interface de la paroi. Cette matrice extracellulaire fournit un échafaudage pour la communication cellule-cellule. Afin de comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la connaissance de la composition et de l'organisation de la paroi est importante. La formation de la paroi se fait durant la division cellulaire quand la plaque cellulaire est formée entre les deux nouvelles cellules résultant d'une exocytose massive et dirigée de vésicules contenant des HGs. Puis, des vésicules contenant de la cellulose synthases sont exocytosées et le dépôt des hémicelluloses commence (Dhonukshe et al., 2006; Reichardt et al., 2007; Miart et al., 2014; Daher and Braybrook, 2015).

Ainsi une nouvelle paroi est formée par chaque nouvelle cellule, avec une zone entre elles est riche en pectine : la lamelle moyenne (Ridley et al., 2001). Cette lamelle moyenne est le médiateur physique majeur de l'adhésion cellulaire. Sa composition laisse penser que les pectines pourraient être impliquées dans l'adhésion cellulaire et plus particulièrement les HGs qui sont les constituants majoritaires de la lamelle moyenne.

L'implication des pectines dans l'adhésion cellulaire a été mise en évidence par l'étude de mutants. Ainsi, chez le mutant *quasimodo1*, une réduction de l'adhésion cellulaire est observée (Bouton *et al.*, 2002). *QUAI* code une galacturonosyltransférase de la famille des GT8 également dénommée GAUT8, probablement impliquée dans la synthèse des HGs. En effet, le mutant montre une réduction de 25% de l'acide galacturonique dans la paroi en comparaison avec le sauvage. Cette réduction de la cohésion cellulaire a été observée dans l'hypocotyle, les tissus vasculaires, les cals et les cellules bordantes (Bouton, 2002; Orfila et al., 2002; Leboeuf, 2005; Durand et al., 2009). Une étude a mis en évidence, par un crible de suppresseurs sur le mutant *qual*, un gène *ESMERALDA 1 (ESMD1)* codant une *O*-fucosyltransférase. En effet le

phénotype normal est restauré chez *qua1-1* et *qua2-1*, via deux mutants alléliques *esmd2-1* et *esmd1-1*, sans pour autant restaurer la composition en HG de la paroi. Ces résultats suggèrent que les pectines ne seraient donc pas les seules à avoir un rôle dans l'adhésion (Verger et al., 2016).

Chez les plantules du mutant *emb30* (*embryo defective30*) ou *gnom*, les cellules se séparent plus facilement que chez le sauvage, indiquant une perturbation de l'adhésion cellulaire. Ceci serait dû à une localisation anormale des HGs faiblement méthylestérifiés, normalement présents dans la lamelle moyenne. Chez ce mutant, les HGs faiblement méthylestérifiés sont principalement localisés dans les espaces interstitiels (Ridley et al., 2001; Shevell et al., 2000). Chez le mutant, *pme3* et chez des plantes surexprimant des *PMEIs*, une grande facilité de production de protoplastes sa été observée suggérant que les cellules étaient moins adhésives entre elles (Lionetti et al., 2015).

Ces résultats mis en parallèle laissent penser que la déméthylation des HGs et la formation de boîtes à œufs grâce à la présence de calcium joueraient un rôle dans l'adhésion cellulaire (Daher and Braybrook, 2015). Le mutant *tumorous shoot development 2* (*tsd2*), codant aussi une PME putative, présente également une perte de l'adhésion cellulaire (Frank et al., 2002; Krupková et al., 2007). Le mutant *ectopically parting cells 1* (*ecp1*), dont le gène muté appartient à la famille GT64, montre un problème sévère d'adhésion cellulaire avec une diminution du taux de galactose dans la paroi (Singh et al., 2005). Le mutant *ecp1-2* (un autre allèle) montre également une diminution de galactose et présente en plus une réponse hypersensible à l'acide abscissique mais ne présente pas une perturbation de l'adhésion contrairement au premier mutant, ce qui laisserait penser que le gène *ECPI* n'intervient pas forcément seul dans l'adhésion (Bown et al., 2007).

Le RG-I, plus particulièrement de ses chaînes latérales, pourrait également avoir un rôle dans l'adhésion cellulaire. Chez des mutants ayant des chaînes d'arabinogalactanes modifiées, une nette diminution de l'adhésion est observée comme chez le mutant *nolac-H14* (*non-organogenic callus with loosely attached cells*) (Iwai et al., 2001) ou *cnr* (*coloreless non-ripening*) (Orfila et al., 2002). On observe également que la perte des chaînes d'arabinanes induit une augmentation de la séparation cellulaire et de la perte de la structure du fruit lors de la maturation de la pomme. Ceci semblerait indiquer que les chaînes latérales du RG-I auraient aussi un rôle dans l'adhésion et la cohésion cellulaires (Peña and Carpita, 2004). Pourtant, la lamelle moyenne semble contenir très peu, voir pas, de chaînes latérales de RG-I (Jarvis et al., 2003).

Plus récemment, des travaux sur *Physcomitrella patens*, par une approche de « silencing » sur la famille de protéines ROP, ont montré que les plantes dont l'expression des gènes *ROP* a été réduite, en plus d'un problème pour initier la croissance apicale, ont un problème de remodelage de la paroi, une augmentation de la dynamique des filaments d'actine et présentent une réduction de l'adhésion cellulaire. Les ROP joueraient donc non seulement un rôle dans la croissance polarisée mais également dans la mise en place de la paroi expliquant pourquoi les mutants présentent un problème d'adhésion (Burkart et al., 2015).

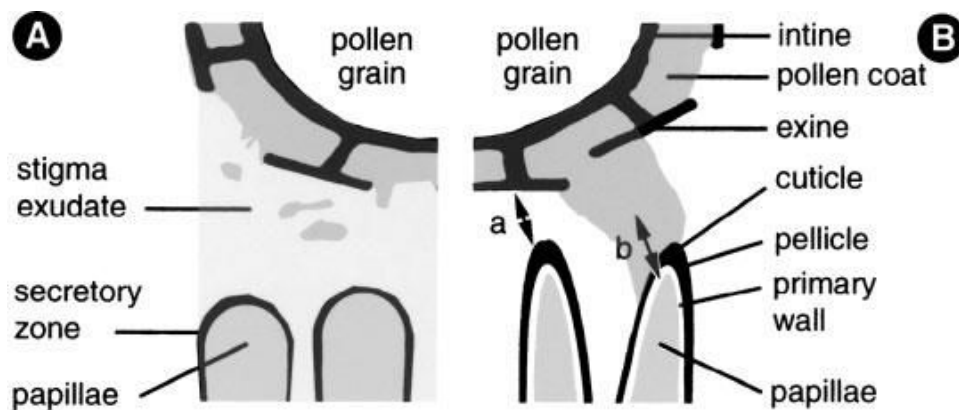
## 3-2- Adhésion cellulaire et reproduction sexuée

### 3-2-1- L'adhésion du pollen au stigmate

La première étape de la pollinisation implique l'adhésion du grain de pollen aux cellules stigmatiques, lieu de reconnaissance et d'hydratation. La nature de cette adhésion dépend du stigmate.

Sur les stigmates humides, l'adhésion du pollen repose sur la tension de la surface liquide (Fig. 21A) (Heslop-Harrison, 2000; Swanson et al., 2004). Effectivement, le pollen peut adhérer aux stigmates humides, s'hydrater voir même germer sans que ce soit espèce spécifique (Wheeler et al., 2001).

Sur le stigmate sec d'*A.thaliana*, la capture du pollen est rapide (30 secondes) et espèce spécifique. Elle se fait par le biais de l'exine qui pourrait impliquer des interactions hydrophobes (Fig. 21B) (Zinkl et al., 1999).



**Figure 21** : Adhésion d'un grain de pollen sur un stigmate humide (A) ou sur un stigmate sec (B). a : L'exine promeut l'adhésion initiale du grain de pollen sur le stigmate. b : formation d'un pied d'attachement *via* la migration des protéines du manteau pollinique. (Mollet et al., 2007)

Après ce premier contact sur les papilles stigmatiques initié par l'exine, le mouvement des protéines du manteau polliniques vont permettre le renforcement de l'adhésion en formant un pied d'attachement. Les glycoprotéines de la paroi cellulaire des papilles stigmatiques seraient également impliquées (Kandasamy et al., 1994; Luu et al., 1999). Cette adhésion est décrite comme étant « tardive » car le maximum de cohésion est obtenu 30 min après la capture initiale du pollen (Zinkl et al., 1999).

### **3-2-2- L'adhésion du tube pollinique à la matrice extracellulaire du style**

Après la germination du pollen, le tube pollinique va devoir croître dans le tissu de transmission du style. Cette croissance se fait à la surface des cellules épidermiques tapissant le style dans les styles creux et elle est intrusive lorsqu'elle se fait entre les cellules du tissu de transmission dans les styles pleins. Mais dans les deux cas, il a été montré que les tubes polliniques vont adhérer au tissu de transmission *via* des observations par microscopie électronique à transmission et à balayage (Jauh et al., 1997; Lord, 2000). L'adhésion favorise non seulement la croissance des tubes polliniques mais elle permet aussi leurs guidages jusqu'aux ovules par le biais de la paroi et des molécules chimiotropiques (Johnson and Lord, 2006; Lord, 2003).

Peu de travaux ont été effectués sur l'adhésion des tubes polliniques, ils ont été principalement réalisés sur le modèle du lys avec la mise au point d'un test d'adhésion *in vitro* des tubes polliniques sur une matrice. La première matrice testée était composée d'exsudats isolés de styles (Jauh et al., 1997). Deux partenaires sont essentiels pour cette adhésion, d'une part une protéine de 9 kDa: la SCA (Stigma/Style Cystein-rich Adhesin) et un polymère pectique d'autre part. Comme son nom l'indique, SCA est une protéine riche en cystéine, stable à la chaleur avec des similarités de séquence avec les lipid transfer proteins (LTPs) qui sont des protéines impliquées dans différents processus biologiques tels que la croissance des tubes polliniques mais aussi les mécanismes de défense des plantes (Park and Lord, 2003; Park et al., 2000). Les polymères pectiques sont des HGs faiblement méthylestérifiés (Mollet et al., 2000). La SCA pourrait permettre de relier les polymères de la paroi du tube pollinique et ceux du tissu de transmission.

Une vitronectine-like a été mise en évidence à quelques microns de l'apex des tubes polliniques de tabac et de lys grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le récepteur de la vitronectine (VnR, Vitronectin Receptor). Elle jouerait un rôle dans la croissance du tube pollinique et dans son interaction avec la matrice extracellulaire du style (Sun et al., 2000).

Chez de nombreuses espèces, les AGPs sont abondantes dans le pistil et à l'interface de la membrane plasmique et de la paroi des tubes polliniques. Etant attachées à la membrane plasmique *via* une ancre GPI, elles sont prédites pour avoir des propriétés adhésives (Majewska-Sawka and Nothnagel, 2000; Schultz et al., 2000).

## IV- La génétique chimique

Le besoin actuel croissant de comprendre la fonction des gènes dans la biologie végétale exige une approche plus dynamique et plus rapide que les techniques de génétique classique. La génétique fonctionnelle nécessite la modification du gène d'intérêt en l'éteignant par knock-out, par exemple. L'absence de phénotypes due à la redondance des gènes et/ou la létalité que peut provoquer une mutation peuvent significativement compliquer les approches de génomique fonctionnelle. La génétique chimique est définie comme l'étude de l'effet de petites molécules sur les processus biologiques ayant pour objectif d'altérer l'activité des protéines.

### 4-1- Le principe

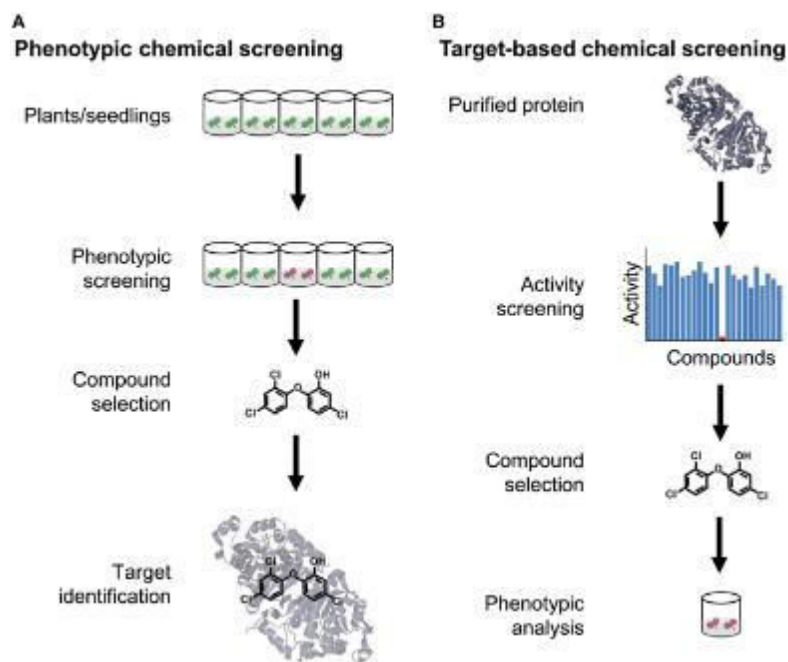
C'est une discipline assez récente en recherche académique qui se base sur l'utilisation de petites molécules, de tailles généralement inférieures à 700 Da, pour identifier de nouvelles voies de signalisations et ainsi explorer des processus biologiques. Ces molécules vont modifier la dynamique d'un processus biologique en se liant principalement aux protéines (Ziegler et al., 2013). Vue la diversité des protéines, le nombre d'acides aminés, les séquences, les modifications post-traductionnelles et les structures secondaires ou tertiaires : la cible de ces molécules est vaste.

Cette technologie a longtemps été utilisée dans l'industrie pharmaceutique afin de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques en utilisant le criblage à haut débit (High Throughput screening, HTS). Ces criblages de plusieurs dizaines de milliers de molécules quelques fois nécessitent souvent des robots automatisés. Cette technique n'a été introduite dans la recherche fondamentale que récemment (Mitchison, 1994; Schreiber, 1998) et encore plus récemment dans la recherche en biologie végétale (McCourt and Desveaux, 2010).



## 4-2- La méthodologie

Que ce soit pour la génétique fonctionnelle ou chimique, deux approches sont possibles: directe ou inverse. Dans l'approche directe, l'application de molécules permet de sélectionner un ou des phénotypes d'intérêt puis ces molécules sont utilisées dans le but d'identifier la protéine cible (Fig. 22). L'approche inverse, on part d'une protéine d'intérêt de fonction inconnue, on crible des molécules capables d'interagir avec et on teste leurs effets sur le développement de la plante (Stockwell, 2000; Serrano et al., 2015).



**Figure 22** : Comparaison des approches entre la génétique chimique directe et inverse (Serrano et al., 2015)

Il faut disposer d'une banque de molécules dite « chimiothèque ». Ces molécules peuvent être synthétiques, hémisynthétiques ou naturelles, ces dernières sont issues d'extraits de plantes par exemple, elles ne sont donc pas pures : on parle alors plus précisément d'extractothèque. Il faudra donc déterminer quel est le principe actif de l'extrait ; l'activité pouvant résulter d'un effet synergique (Walsh and Chang, 2006).

Par le biais de toutes ces méthodes, la diversité des produits obtenus est considérable. Mais parmi ces molécules au sein d'une même librairie, beaucoup peuvent avoir de fortes ressemblances structurales. Ainsi, pour réduire le nombre de molécules à cribler, elles sont souvent regroupées par « chefs de famille ». Une fois qu'un chef de famille est identifié en

induisant un phénotype (constituant un hit), toutes les molécules de cette même famille seront testées afin de sélectionner la plus active.

La première chimiothèque est apparue dans les années 90' et cette pratique s'est ensuite rapidement étendue. La chimiothèque de Sanofi comporte aujourd'hui à elle seule un million de composés. D'autres entreprises se sont également spécialisées dans la synthèse et la vente de chimiothèques telles que exquiron®, axxam®, Peackdale® ou ChemBridge®.

En pratique, les molécules d'une même chimiothèque sont préparées à la même concentration, dans le même solvant et présentées sous forme de plaques au format 384 ou 96 puits qui permettent le transfert direct et automatisé de la plaque mère à la plaque de criblage. Les chimiothèques peuvent aussi être institutionnelles. En France, la chimiothèque nationale (<http://chimiotheque-nationale.cn.cnr.fr/?lang=fr>) a été créée en 2003 par des laboratoires académiques afin de promouvoir la valorisation scientifique et industrielle de ces molécules.

Après avoir choisi une chimiothèque, l'étape suivante est la mise au point d'un test biologique robuste, rapide et fiable.

Les tests *in vitro* utilisés en biologie cellulaire et les analyses biochimiques ne sont pas toujours adaptés au criblage. En effet, pour qu'un test phénotypique puisse être adapté au criblage à haut débit, il doit répondre à différents critères d'exigence :

- La miniaturisation : le test doit pouvoir se réaliser dans un petit volume réactionnel donc être adapté au format microplaque (pouvant contenir différents nombre de puits selon le besoin). Plus le modèle est simple plus les possibilités de standardisation sont optimisées ;
- Le niveau de détection (microscopie, fluorescence, luminescence) doit être suffisamment sensible et pouvoir être facilement quantifiable (automatisation de l'acquisition et du traitement informatique des données). Ceci est rendu possible grâce à l'amélioration et au développement des systèmes d'acquisition et des techniques d'imagerie ;
- Le test doit être rapide (high throughput).
- Les résultats doivent être fiables, robustes et reproductibles. Ils doivent permettre de discriminer parmi tous les composés testés, ceux qui auront une activité biologique significative. Le plus souvent, les composés sont testés une fois ou en duplicat. La confiance que l'on peut accorder au test doit donc être la plus grande possible.

### 4-3- Les avantages et les inconvénients

L'approche de génétique chimique est utilisée pour les raisons suivantes:

- Le test a l'avantage d'être rapide et peut s'appliquer soit directement aux cellules soit à un organisme entier.
- La molécule peut être ajoutée à tout moment dans le milieu.
- Le phénotype est souvent dose-dépendant (plus la concentration de la molécule est élevée, plus le phénotype est prononcé) et réversible après le transfert dans un milieu sans produit.
- La possibilité d'utiliser plusieurs molécules agissant sur différentes cibles en même temps afin de voir leurs effets synergiques (Walsh and Chang, 2006).

Mais comme toutes techniques, la génétique chimique présente également des inconvénients :

- La grande difficulté à identifier la cible de la molécule et son mode d'action (Kaschani and van der Hoorn, 2007).
- La molécule peut avoir un large champ d'action et cibler plusieurs protéines : le phénotype observé sera donc l'effet de la somme des actions de la molécule.
- La possibilité de la modification ou de la dégradation de la molécule par le métabolisme de l'organisme : cette dégradation peut avoir plusieurs conséquences : inactivée la molécule, rendre la molécule toxique ou la faire réagir avec d'autres protéines (Raikhel and Pirrung, 2005).

### 4-4- Les applications en recherche végétale

A ce jour, les recherches de génétique chimique les plus récurrentes en sciences végétales ont été menées sur les voies de signalisation hormonale : brassinostéroïdes, l'acide salicylique, l'auxine et les strigolactones.

L'auxine a un rôle central dans les différents aspects de la croissance et du développement des plantes et plus particulièrement dans l'élongation cellulaire. Un criblage à haut débit de 1000 composés commerciaux a permis d'isoler et d'identifier des inhibiteurs d'auxine et ce en utilisant des lignées d'*A. thaliana* exprimant le gène rapporteur *GUS* ( $\beta$ -glucuronosidase) sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'auxine (DR5). Ce criblage a permis d'identifier deux molécules, perturbant la voie de signalisation à l'auxine. En effet, ils n'induisaient pas l'expression du gène rapporteur *GUS* dans les racines malgré la présence d'auxine dans le milieu (Armstrong et al., 2004).

Les brassinostéroïdes ont également été sujets à plusieurs études par des approches de génétique chimique. Ainsi, le brassinazole, un composé triazole, interagirait avec la DWF4 (DWARF4), une cytochrome P450 monooxygénase, enzyme clé de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes (Choe et al., 1998; Asami et al., 2001). À part leurs rôles dans l'élongation cellulaire, les brassinostéroïdes joueraient également un rôle dans le développement du tube pollinique (Asami and Yoshida, 1999). D'ailleurs, c'est à partir des grains de pollen de *Brassica napus* que le brassinolide a été isolé et caractérisé pour la première fois (Grove et al., 1979).

Plus récemment, beaucoup d'attention a été portée sur les strigolactones, des molécules multifonctionnelles, qui sont non seulement des phytohormones mais elles jouent également le rôle de signaux dans la rhizosphère permettant la communication entre plantes et lors d'interactions avec des pathogènes ou des microorganismes bénéfiques (Nakamura and Asami, 2014; Kombrink and Kaiser, 2016).

Le second topique phare de la génétique chimique chez les plantes est l'interaction plante-pathogène et les réponses immunitaires des plantes. Ces études permettent à la fois de comprendre le fonctionnement de l'immunité des plantes mais aussi de trouver de potentiels stimulateurs de ces défenses. Ainsi des petites molécules qui stimulent les défenses des plantes ont été identifiées par criblage moléculaire, comme l'acide 3,5-dichloroanthranilique (DCA) et l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA). Elles ont montré une certaine efficacité dans l'inhibition de la multiplication de *Pseudomonas syringae* sur des plantes d'*A. thaliana* préalablement traitées par ces molécules. Des études de Microarray ont révélé un cluster de 142 gènes en réponse à ces deux molécules avec différents niveaux d'expression dans la mise en place des mécanismes de défense (Knoth et al., 2009). Plus récemment, des composés appelés « imprimatins » se sont avérés efficaces pour améliorer une nouvelle fois la protection d'*A.thaliana* contre *P. syringae*. Ces composés inhiberaient les activités de deux Salicylic Acid Glucosyltransferases (SAGTs) qui transforment l'acide salicylique, impliqué dans les voies de signalisation de défense, en un métabolite inactif le SA-O-β-D-glucoside (Noutoshi et al., 2012).

Dans la grande majorité des travaux de génétique chimique en biologie végétale, des plantules ou une culture cellulaire sont utilisées. Via ces modèles, la génétique chimique a permis de comprendre plusieurs mécanismes cellulaires. Plusieurs inhibiteurs de la synthèse de la cellulose (CBIs : *cellulose biosynthesis inhibitors*) ont été mis en évidence par criblage moléculaire, ce qui a permis de comprendre la réponse de la cellulose synthase A (CESA) aux molécules mais aussi le fonctionnement de la CESA dans les cellules vivantes (Brabham and Debolt, 2012). Le DCB, un des inhibiteurs de la cellulose synthase, a également montré un effet sur le cytosquelette (Peng et al., 2013).

En dépit des avancées de la recherche en génétique chimique en sciences végétales, un modèle plus simple et plus facile à manipuler serait plus approprié. Le pollen représente un très bon candidat car il présente un certain nombre d'avantages : le pollen est unicellulaire, facile à cultiver et à récolter (quelques fleurs suffisent), permet d'observer le phénotype assez rapidement (quelques heures) et 70% des gènes exprimés dans la plante entière sont exprimés dans le pollen (Mascarenhas, 1993). Récemment un criblage de 1040 composés sur le pollen de tabac a permis de mettre en évidence des composés qui stimulaient la croissance des tubes polliniques. Ceux-ci avaient aussi un effet positif sur la croissance racinaire (Chuprova-Netochin et al., 2016).

Robert et collaborateurs (2008) ont identifié une molécule (endosidin 1 (ES1)) affectant essentiellement le trafic entre la membrane plasmique et les endosomes en utilisant des tubes polliniques de tabac. Ce même composé interférait aussi l'endocytose dans les cellules de plantules d'*A. thaliana*. Botté et collaborateurs (2011) ont identifié une molécule la galvestine-1 qui interfère avec la voie de synthèse du monogalactosyldiacyl glycérol (MGDG) en inhibant une enzyme la monogalactosyldiacyl (MGD) galactosyltransférases. Cette molécule, inhibe partiellement l'élongation des tubes polliniques d'*A. thaliana* sans affecter le taux de germination. Des techniques de criblages ont également été mises en place comme l'utilisation du rouge de Congo, un réactif qui colore les polysaccharides, qui permet d'apprécier l'élongation des tubes polliniques par mesure de la fluorescence en utilisant un lecteur de plaque. Ainsi avec cette méthode semi-quantitative, si les tubes polliniques sont traités avec une molécule qui inhibe l'élongation des tubes polliniques une diminution de la fluorescence est observée (Hartman et al., 2014).

Vu l'opportunité qu'offre l'utilisation des petites molécules dans la recherche en biologie végétale, les défis seraient de parvenir à identifier à la fois la cible de ces molécules mais également de pouvoir remonter à la voie de signalisation responsable du phénotype. La génétique chimique a depuis longtemps trouvé ses principales applications en industrie. La recherche de nouvelles molécules qui induisent un phénotype chez les plantes est aussi un moyen d'établir une stratégie pour trouver des molécules d'intérêt en agronomie (Kombrink and Kaiser, 2016).

## Objectifs des travaux de thèse :

Ils s'intéressent en particulier à l'étude de la la croissance polarisée du tube pollinique et à son interaction avec le tissu de transmission femelle *via* des processus d'adhésion cellulaire.

Le projet se compose de deux parties :

1/ L'étude approfondie par des méthodes de microscopie (confocale et à épifluorescence) de l'impact de deux molécules, M1 et M2, perturbant la germination des grains de pollen et la croissance du tube pollinique. Une autre molécule déjà caractérisée a été ajoutée, la galvestine-1 qui inhibe la synthèse des galactolipides et l'élongation des tubes polliniques (Botté et al., 2011). Afin d'étudier plus finement leurs effets à l'échelle cellulaire chez *Arabidopsis thaliana*, nous nous sommes intéressés à leurs effets sur le dépôt de certains composés de la paroi comme la callose, un polymère majoritaire de la paroi des tubes polliniques et sur la production des Formes Actives de l'Oxygène (FAO). L'effet de ces molécules a aussi été étudié sur la dynamique des filaments d'actine et RIC4, un effecteur de Rho-GTPase (ROP1), en utilisant des tubes polliniques contenant des constructions GFP.

2/ La recherche d'une matrice d'adhésion des tubes polliniques qui mime *in vitro* la matrice extracellulaire du tissu de transmission femelle, nous a conduit à essayer de caractériser la structure minimale permettant l'adhésion des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana* par déconstruction de cette matrice par une approche enzymatique. Cette matrice est constituée d'extraits de la paroi de feuilles d'*A. thaliana*, dont la composition est proche de celle d'extraits de la paroi de fleurs. La caractérisation de cette matrice a été faite par des approches biochimiques principalement *via* des analyses chromatographiques (GC-FID et SEC). L'analyse de ces fractions adhésives principalement pectiques, nous a conduit à tester d'autres extraits commerciaux dont les pectines de citron possédant différent degrés de méthylestérifications.

## **MATERIEL ET METHODES**

# I Matériel végétal et Tests biologiques

## 1-1- Culture des plantes

Les travaux ont été menés sur trois espèces végétales, une Brassicacée (*Arabidopsis thaliana*) et deux Solanacées (*Nicotiana tabacum* et *Solanum lycopersicum*).

- ✓ *Arabidopsis thaliana* (Arabette des dames), écotype Columbia (Col-0). Des plantes sauvages (wt), ainsi que plusieurs lignées génétiquement modifiées ont été utilisées : une première lignée *pLAT52::lifeact-mEGFP*, fournie par Pr. Shanjin Huang (Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China), possède la construction *pTH-Ubi-Lifeact-mEGFP* (Vidali *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2013). Cette construction permet l'expression de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) fusionnée à l'ABP-140 (*actin-binding protein*) sous le contrôle du promoteur LAT52, pollen spécifique (Twell *et al.*, 1990). Le promoteur LAT52 permet une expression forte, restreinte au pollen et au tube pollinique. Cette construction a permis d'observer aisément les filaments d'actine marqués à la GFP dans le tube pollinique. Une seconde lignée, CRIB4-GFP, fournie par Pr. Zhenbiao Yang (Center for Plant Cell Biology, University of California, Riverside, USA) possède la construction *pCL-CRIB4-GFP*. Cette construction va permettre l'expression de la GFP fusionnée au domaine CRIB (*Cdc42/Rac interactive binding domain*) de RIC4 (ROP INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN 4) développée récemment comme marqueur de l'activité ROP (Rho GTPases from plants) dans les tubes polliniques transgéniques (Rong *et al.*, 2016).
- ✓ *Nicotiana tabacum* (tabac)
- ✓ *Solanum lycopersicum* (tomate) Mill. var. *cerasiformae* cv. West Virginia 106 (WVA106).

### ***Arabidopsis thaliana* :**

Les graines d'*A. thaliana* conservées à 4°C sont semées sur de la terre stérilisée par autoclavage (25 min à 1 bar). La culture se fait dans des phytotrons avec une photopériode de 16h jour/ 8h nuit. La température est respectivement de 20°C et 16°C avec une hygrométrie relative ambiante maintenue à 60%. L'arrosage est effectué manuellement en fonction du stade de développement des plantes.



## **Tabac et tomate :**

Les graines sont semées en surface pour le tabac et à 1 cm de profondeur pour les tomates sur de la terre stérilisée par autoclavage (25 min à 1 bar). Les cultures se font dans des phytotrons avec une photopériode de 16 h jour/ 8h nuit, et la température est réglée respectivement à 25°C et 20°C avec une hygrométrie relative ambiante de 60%. L'arrosage est effectué manuellement en fonction du stade de développement des plantes.

## **1-2- Récolte des fleurs et culture du pollen**

Les fleurs d'*A. thaliana* sont récoltées le matin avec une pince, et regroupées par 40 dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL contenant 1 mL de milieu de germination (MG). Ce milieu, optimisé par Boavida et McCormick (2007), est composé de 0,01% (p/v)  $H_3BO_3$ , 5 mM  $CaCl_2$ , 5 mM KCl, 1 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  et 10% (p/v) de saccharose. Le pH est très précisément ajusté à 7,5. Les tubes sont vortexés et agités manuellement durant 10 à 15 min pour libérer le pollen dans le milieu. Les fleurs et les débris sont écartés à l'aide d'une pince et les tubes sont centrifugés pendant 7 min à 3200 g. Le culot est repris dans 250  $\mu$ L de MG. La germination et la croissance des tubes se fait sans agitation à 22°C durant 6 h et à l'obscurité, en plaques 96-puits pour les observations au microscope inversé à épifluorescence (Leica DMI 6000B, caméra DCF 600C) ou sur des lames  $\mu$ -slide 18 puits (Ibidi®) pour les observations au microscope confocal inversé (Leica TCS SP2).

Pour les fleurs de tomates et de tabac, le milieu de germination utilisé est le milieu BK (Brewbaker et Kwack, 1963) contenant pour 100 mL: 10 mg  $H_3BO_3$ , 30 mg  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , 20 mg  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 10 mg  $KNO_3$  et 10 g saccharose.

Les fleurs de tomates sont récoltées à l'anthèse par groupe de cinq et débarrassées de leurs pétales et sépales. Les étamines soudées sur le pistil sont alors séparées et placées dans 5 mL de milieu BK. La germination et la croissance du pollen se déroule à température ambiante, dans des flacons en verre, sous agitations et à l'obscurité. Les observations sont faites sur des lames de microscope.

Les fleurs de tabac sont récoltées à l'anthèse. Les 5 anthères provenant de 3 fleurs sont déposées dans 5 mL de milieu BK. La culture se déroule à 22°C sans agitation durant 6 h à l'obscurité. Les observations sont effectuées dans des plaques 24 puits.

Les calculs de pourcentages de germination, de phénotypage des tubes, et les mesures de longueur de tubes sont effectués à l'aide du logiciel ImageJ (Abramoff et al., 2004).

### 1-3- Le test d'adhésion des tubes polliniques

Afin de déterminer les polysaccharides impliqués dans l'adhésion des tubes polliniques sur la paroi des tissus femelles, un test d'adhésion *in vitro* avait été développé dans des plaques 96-puits (Dardelle, 2011) en utilisant une matrice artificielle constituée d'extraits de paroi (cf. méthodes préparatives et analytiques de la matrice d'adhésion) de fleurs ou de feuilles d'*A. thaliana*. Ces extraits sont repris dans de l'eau milliQ à une concentration de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Les tubes sont centrifugés 5 min à 2000 g pour éliminer le matériel insoluble. Un volume de 500 µL du surnageant, appelé matrice, est placé dans des tubes Eppendorff de 1,5 mL et stocké à -20°C. Les aliquots décongelés sont stockés par la suite à 4°C et utilisés dans les 48 h.

La matrice est déposée dans les puits à une concentration de 70 µg dans 70 µL d'eau milliQ. La plaque est ensuite placée à 22°C durant 36 h jusqu'à évaporation complète de l'eau, laissant une fine couche de matrice. Le pollen issu de 5 fleurs d'*A. thaliana* repris dans 200 µL de MG est placé sans agitation dans chacun des puits. La plaque est fermée et scellée avec du parafilm pour éviter l'évaporation et incubée à 22°C pendant 6 h afin de laisser le temps au pollen de germer et aux tubes de croître.

Après 6 h, deux observations sont faites : la première en présence du MG ; quatre photographies sont prises au centre de chaque puits afin de dénombrer les tubes présents au niveau de la matrice. Les puits sont alors vidés par renversements, chaque puits est alors copieusement mais délicatement rincé deux fois sous l'eau du robinet en maintenant un angle de 45° entre les puits de la plaque et le filet d'eau. Entre chaque rinçage, la plaque est retournée et ardemment égouttée sur un papier absorbant afin de vider les puits de l'eau qu'ils contiennent.

Ces étapes ont pour objectif de ne conserver que les tubes adhérents au fond de chaque puits. Une seconde série de quatre photographies est alors effectuée au centre du puits au niveau de la matrice, et le dénombrement des tubes adhérents *vs* non adhérents peut être effectué à l'aide du logiciel ImageJ.

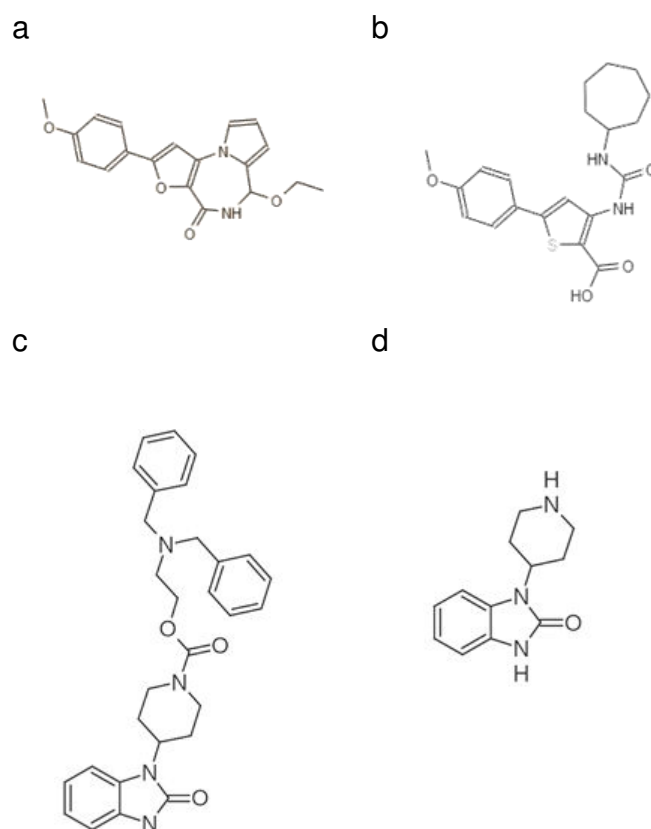
Plusieurs matrices ont été testées et sont consignées dans la partie méthodes préparatives et analytiques de la matrice d'adhésion.

### 1-4- La chimiothèque et le traitement des tubes polliniques

Les résultats préliminaires obtenus lors du criblage de 250 molécules de la chimiothèque du CERMN (Centre d'Etude et de Recherche du Médicament de Normandie, Université de Caen) (Dardelle, 2011) représentant des chefs de famille ont permis de trouver 2 composés

capables de perturber la croissance polarisée des tubes polliniques. Ces 2 molécules ont été testées plus en détail, ainsi que la galvestine-1 (Fig. 23) (fournie par Denis Falconet, INRA, Institut National de la Recherche Agronomique - Univ Grenoble 1, UMR 5168, Physiologie Cellulaire Végétale, CEA, Grenoble, France) qui avait montré un effet sur l'élongation des tubes polliniques (Botté et al., 2011).

Toutes les molécules sont solubilisées dans du DMSO anhydre de façon à obtenir des solutions mères à une concentration de 10 mM. Des solutions filles de 500  $\mu$ M sont obtenues en diluant à l'aide d'eau milliQ. C'est à partir des solutions filles que sont effectués les essais. Le criblage primaire est effectué à une concentration de 20  $\mu$ M en utilisant le DMSO à la concentration finale de 0,2% comme contrôle négatif. Pour les molécules sélectionnées, plusieurs concentrations sont testées, de 0,5 à 30  $\mu$ M, en utilisant le DMSO à la concentration finale de 0,3% comme contrôle négatif.



**Figure 23** : Structure des molécules isolées lors du criblage (a) M1. (b) M2. (c) Galvestine-1 et (d) le contrôle négatif de la galvestine-1 : G0.

Les molécules sont homogénéisées avec du DMSO 0,5% (Tableau 1). 3  $\mu\text{L}$  de cette solution sont déposés dans un puits avec 37  $\mu\text{L}$  de MG et 10  $\mu\text{L}$  de MG contenant du pollen (le pollen de 40 fleurs repris dans 250  $\mu\text{L}$ ). Chaque puits contiendra un volume final de 50  $\mu\text{L}$  contenant le pollen de 8 fleurs, 0,3% de DMSO en concentration finale et la concentration correspondante de molécule.

**Tableau 1 :** Volumes appliqués lors des traitements des tubes polliniques avec les molécules de la chimiothèque

Concentration finale de la molécule ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1	2,5	5	10	20	30
Volume prélevé de la solution fille ( $\mu\text{L}$ )	0,2	0,4	1	2	4	8	12
Volume prélevé du DMSO 0,5% ( $\mu\text{L}$ )	11,8	11,6	11	10	8	4	0
Volume prélevé de cette solution (en $\mu\text{L}$ dans un volume final de 50 $\mu\text{L}$ )	3 $\mu\text{L}$						

## II- Méthodes d'imagerie cellulaire

### 2-1- Coloration cytochimique de la callose à l'aniline bleue décolorée

Après 6 h de culture, une solution de 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1% d'aniline bleue pH 12 est ajoutée dans le milieu de germination pour une concentration finale de 0,1%. L'incubation se fait à température ambiante, durant 2 h et à l'obscurité. Les tubes polliniques sont ensuite centrifugés durant 7 min à 3200 g et le culot est déposé entre lame et lamelle. L'observation se fait à l'aide d'un microscope inversé (Leica DMI 6000B, caméra DCF 600C) avec une longueur d'onde d'excitation de 405 nm et une longueur d'onde d'émission de 523 nm. Les photographies sont traitées avec le logiciel ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). La taille des tubes polliniques et le nombre de bouchons de callose sont déterminés

### 2-2- Immunomarquages des tubes polliniques

Après 6 h de culture, les tubes polliniques sont fixés par l'ajout (v/v) d'un tampon PIPES 100 mM, 4 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM EGTA, 10% (w/v) saccharose et 5% (v/v) de paraformaldéhyde pH 7,5 sur la nuit à 4°C. Les tubes polliniques fixés sont centrifugés à 4000 g durant 7 min. Le culot est suspendu dans du tampon Phosphate Buffer Saline (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2), puis déposé dans des  $\mu\text{-Slide VI}^{0.4}$  Poly-L-lysine (Ibidi®) et incubé sur la nuit à température ambiante afin de fixer les

tubes polliniques sur la matrice en poly-L-lysine. Les tubes polliniques sont rincés trois fois avec du PBS avant d'être incubés 30 min dans du PBS contenant 3% de lait écrémé à température ambiante. Trois rinçages au PBS sont effectués et un anticorps primaire, dirigé contre des épitopes associés à une catégorie de polysaccharides de la paroi (Tableau 2) dilué au 1/5 est ajouté et l'incubation se fait sur la nuit à 4°C. L'anticorps primaire est éliminé par trois rinçages au PBS. L'anticorps secondaire anti-rat couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC, Sigma®), dilué au 1/50, est ajouté et l'incubation se fait pendant 3 h à 30°C. Trois lavages au PBS sont effectués et un mélange citifluor/PBS (v/v) est ajouté aux  $\mu$ -plaques.

L'observation se fait au microscope à épifluorescence inversé (Leica DMI 6000B, caméra DCF 600C) avec une longueur d'onde d'excitation comprise entre 460–500 nm et une longueur d'onde d'émission située entre 512–542 nm. Le contrôle négatif est incubé uniquement avec l'anticorps secondaire.

**Tableau 2 :** Liste des anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes pariétaux de leurs organismes de production et des principaux épitopes reconnus

Anticorps primaire	Organisme de production	Épitope reconnu	Référence
LM2	Rat	$\beta$ -GlcA de glycanes d'AGP	(Yates <i>et al.</i> , 1996)
LM6	Rat	Pentasaccharide de (1-5)- $\alpha$ -L-arabinane	(Willats <i>et al.</i> , 1998)
LM13	Rat	Longues chaînes de (1,5)- $\alpha$ -L-arabinane	(Moller <i>et al.</i> , 2008)
LM16	Rat	(1,5)- $\alpha$ -L-arabinane potentiellement associé à des résidus galactosyl	(Verhertbruggen <i>et al.</i> , 2009)
LM19	Rat	HG faiblement méthylestérifiés	(Verhertbruggen <i>et al.</i> , 2009)

AGP: Arabinogalactanes protéines. HG : homogalacturonanes. LM : Leeds Monoclonal Antibodies.

#### **Coloration des ROS au NBT (Nitro Blue Tetrazolium) et au CM-H<sub>2</sub>DCFDA (chloromethyl derivative of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)**

Le NBT est préparé dans du MG à 7 mM. Cette solution est déposée dans le milieu de germination contenant les tubes polliniques à une concentration finale de 1,2 mM. L'incubation se fait à température ambiante et à l'obscurité durant 20 min. L'observation se fait au microscope en lumière transmise : le NBT est oxydé par les anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et le résultat de cette oxydation produit un dépôt de formazan visible sous microscope en lumière transmise (Beyer et Fridovich, 1987).

Le CM-H<sub>2</sub>DCFDA est dissout dans du DMSO 100% à une concentration de 8,6 mM, puis dilué dans du MG à 20 µM et utilisé à une concentration finale de 0,4 µM. Après diffusion passive de la sonde, les groupements acétates sont clivés par des estérases intracellulaires. Le chlorométhyle, réactif aux thiols, réagit avec le glutathion intracellulaire et avec d'autres thiols, produisant l'H<sub>2</sub>DCF non fluorescent. Ce dernier est converti en dichlorofluorescéine (DCF) hautement fluorescent sous l'action oxydante des ROS. Les tubes polliniques, incubés avec le CM-H<sub>2</sub>DCFDA, sont observés au microscope confocal Leica TCS SP2 inversé avec une longueur d'onde d'absorption à 488 nm et d'émission entre 500-535 nm. L'acquisition se fait par time-lapse imaging dès l'apparition de la fluorescence durant 10 min avec une acquisition toutes les 2,915 secondes.

### 2-3- Observations au microscope confocal inversé des tubes polliniques d'*A. thaliana* *pLAT52::lifeact-mEGFP* et *CRIB4-GFP*.

Les observations sont réalisées au microscope confocal Leica TCS SP2 inversé en lumière transmise, ou à l'aide d'une lampe dont la longueur d'onde d'excitation est 488 nm. La longueur d'onde d'émission de la mEGFP (construction : *pLAT52::lifeact-mEGFP*) est de 505-545 nm avec un gain de 544, et celle de la GFP (construction : *pCL-CRIB4-GFP*) est de 498-560 nm avec un gain de 492. L'observation se fait après 2, 4 et 6 h de traitement. L'acquisition des photographies a été réalisée par time-lapse imaging durant 5 min avec un intervalle de 2,915 secondes entre chaque prise de vue.

## III - Méthodes préparatives et analytiques de la matrice d'adhésion

### 3-1- Obtention de la paroi brute

Les rosettes d'*A. thaliana* sont récoltées avant l'émergence de l'inflorescence (~5 semaines) et conservées dans l'éthanol 70% à 4°C jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante (environ 100 g). Les fleurs d'*A. thaliana* sont également conservées dans de l'éthanol 70% après extraction du pollen. L'éthanol est alors éliminé par filtration, les feuilles sont broyées grossièrement dans de l'éthanol 70% au polytron, puis plus finement à l'aide d'un pilon dans un potter en verre. Les fleurs sont uniquement broyées dans un potter de verre. Le broyat est centrifugé 10 min à 3200 g afin d'éliminer le surnageant. Le culot est soumis à plusieurs lavages

à l'éthanol 70% à 70°C jusqu'à décoloration totale du surnageant. Après élimination du dernier bain d'éthanol, le culot est incubé une nuit sous agitation à température ambiante dans un mélange chloroforme/méthanol (v/v). Les lavages au chloroforme/méthanol sont répétés jusqu'à l'absence de coloration du surnageant.

Le culot est enfin lavé avec de l'acétone 100% sur la nuit à température ambiante sous agitation. Les lavages à l'acétone 100% sont répétés une nouvelle fois jusqu'à l'absence de coloration du surnageant. Après centrifugation, le culot est séché sous une hotte chimique afin d'évaporer l'acétone. Au final, la fraction obtenue se compose de la paroi brute appelée résidu insoluble à l'alcool (AIR = *Alcohol Insoluble Residue*) (100 g de feuilles fraîches permettent d'obtenir environ 4 g d'AIR).

## 3-2- Extraction de fractions enrichies en pectines

### 3-2-1- Imidazole-HCl

Les fractions enrichies en pectines sont extraites à partir de l'AIR par un traitement à l'imidazole-HCl : 100 mg d'AIR sont immergés dans 20 mL d'une solution d'imidazole-HCl 500 mM pH 7. Après agitation pendant 24 h à température ambiante, la solution est centrifugée 10 min à 3200 g. Le surnageant est récupéré et le culot est traité une seconde fois avec la solution d'imidazole-HCl pendant 24 h. Les deux surnageants sont regroupés, dialysés (3.5 kDa) contre de l'eau milliRO puis lyophilisés. Quatre grammes d'AIR de feuilles permet d'obtenir 340 mg de fraction enrichie en pectines.

### 3-2-2- Oxalate d'ammonium

Quelques milligrammes d'AIR sont traités par de l'oxalate d'ammonium 100 mM en chauffant le mélange à 100°C pendant 1 h, puis en centrifugeant à 5000 g pendant 15 min. Le surnageant est alors dialysé puis lyophilisé.

Outre les pectines extraites des feuilles ou des fleurs d'*A. thaliana*, des pectines commerciales ont aussi été utilisées. Ces pectines de citron (Sigma) possèdent différents degrés de méthylestérifications : 85%, 67%, 62%, et 8,6%. Du RG-II purifié de vigne a également été fourni par Marie-Christine Ralet (INRA, Biopolymères-Interactions-Assemblages, Nantes, France).

### 3-3- Extraction de fractions enrichies en hémicelluloses

Le culot issu de l'extraction des fractions enrichies en pectines est placé dans du KOH 4 M contenant 20 mM de NaBH<sub>4</sub> durant 12h à température ambiante. Le pH est ensuite ramené à 5,5 à l'aide d'acide acétique glacial. Une centrifugation de 15 min à 5000 g permet de récupérer d'une part le culot (enrichi en cellulose) et d'autre part le surnageant enrichi en hémicelluloses. Après dialyse contre de l'eau milliRO (3,5 kDa), le surnageant enrichi en hémicellulose est lyophilisé. La partie insoluble, enrichie en cellulose, est rincée abondamment à l'eau milliQ et séchée par évaporation sous hotte chimique.

### 3-4- Extraction du mucilage de graines d'*A. thaliana*

Le mucilage a été extrait en suivant la méthode décrite par Macquet *et al.* (2007). Cinq cents milligrammes de graines sont mélangés avec 5 mL d'eau milliQ et agités au carrousel durant 16 h à 4°C. La suspension est alors vortexée puis centrifugée 3 min à 8000 g. Le surnageant est collecté et les graines sont rincées deux fois avec 5 mL d'eau milliQ.

Le surnageant et l'eau des lavages sont regroupés et filtrés à travers un filtre PVDF de 2,7 µm. La solution filtrée est dialysée contre de l'eau milliRO (3,5 kDa) puis lyophilisée.

### 3-5- Traitements enzymatiques des fractions enrichies en pectines

L'ensemble des traitements enzymatiques effectués sur les extraits pariétaux sont regroupés dans le Tableau 3. Cinq milligrammes de fractions enrichies en pectines extraites de feuilles ou les pectines commerciales de citron sont placés dans un tube en présence de 5 mL du tampon correspondant à l'enzyme utilisée.

Afin de déterminer si l'amidon présent en quantité variable dans les fractions enrichies en pectines n'est pas responsable de l'adhésion, les AIR ont subi différents traitements. Deux traitements successifs dans 90% DMSO sont effectués pendant 24 h chacun à température ambiante. Après ces deux traitements, les AIR sont centrifugés et dialysés afin d'éliminer le DMSO résiduel. L'autre traitement a consisté à ajouter à ces traitements au DMSO, une digestion enzymatique avec une  $\alpha$ -amylase (Tableau 3)

5 U d'enzymes sont ajoutés aux fractions enrichies en pectines et l'incubation se fait sous une agitation de 180 rpm à 40°C sur la nuit. L'inactivation de l'enzyme se fait en chauffant



l'échantillon dans un bain marie à 95°C durant 10 min, et le tampon est éliminé par dialyse contre de l'eau milliRO (3,5 kDa). Les polysaccharides traités sont ensuite lyophilisés.

**Tableau 3 :** Liste des enzymes (Megazyme®, Irlande), des organismes dont elles sont issues et des conditions d'utilisations

Enzyme	Organisme de production et classification	Tampon et condition d'hydrolyse
<i>endo-<math>\alpha</math>-(1,4) polygalacturonase</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i> EC 3.2.1.15	Acétate de sodium 10 mM, pH 4. 1 nuit, 40°C, 180 rpm.
<i>endo-(1,5)-<math>\alpha</math>-L-arabinanase</i>	<i>Aspergillus Niger</i> EC 3.2.1.99	Acétate de sodium 10 mM, pH 4. 1 nuit, 40°C, 180 rpm.
<i>endo-(1,4)-<math>\beta</math>-galactanase</i>	<i>Aspergillus Niger</i> EC 3.2.1.89	Acétate de sodium 10 mM, pH 4. 1 nuit, 40°C, 180 rpm.
$\beta$ -galactosidase	<i>Aspergillus Niger</i> EC 3.2.1.23	Acétate de sodium 10 mM, pH 4. 1 nuit, 40°C, 180 rpm.
$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	<i>Aspergillus Niger</i> EC 3.2.1.55	Acétate de sodium 10 mM, pH 4. 1 nuit, 40°C, 180 rpm.
$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus oryzae</i> EC 3.2.1.1	Acétate de sodium 100 mM, CaCl <sub>2</sub> 5 mM, pH 5. 1 nuit, 40°C, 180 rpm.

### 3-6- Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La séparation des composés pectiques en fonction de leurs tailles est réalisée par une chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sur colonne (2,5 x 90 cm) en utilisant le gel Sepharose CL-6B, qui possède une limite de fractionnement comprise entre  $4 \times 10^6$  et  $1 \times 10^4$  Da. Le tampon utilisé pour l'élution est une solution de formate d'ammonium 50 mM pH 6,5 filtrée à 0,45  $\mu$ m et dégazée.

La fraction enrichie en pectines est reprise dans le tampon et centrifugée pendant 5 min à 2000 g. Le surnageant est injecté dans la colonne par une boucle d'injection de 100  $\mu$ L. Le débit de la colonne est réglé à 1 mL.min<sup>-1</sup> par une pompe (UltiMate 3000 LC Systems, Thermo Fisher). Le volume mort, le volume total ainsi que la taille des fractions sont estimés à l'aide d'une solution contenant du bleu de dextran ( $2 \times 10^3$  kDa) (Pharmacia Fine Chemicals®), des dextrans de différentes tailles ( $5 \times 10^2$  et 10 kDa) et de l'acide galacturonique. L'élution de la colonne est contrôlée par un réfractomètre (IOTA 2) réglé sur une atténuation de 1/4 et une polarité positive. Les données sont collectées avec le logiciel (Chromeleon 7.2 Chromatography Data System) puis exportées sur Excel. Des fractions de 10 mL sont collectées grâce à un

collecteur de fraction automatique (Pharmacia Biotech) du début de l'injection jusqu'à 160 min. Les tubes sont regroupés selon le profil d'éluion et les fractions sont dialysées (3,5 kDa) et lyophilisées.

### 3-7- Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)

#### 3-7-1- Préparation des échantillons

Six cents microlitres d'extrait préparé à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  sont placés dans des flacons adaptés au passeur automatique d'échantillons (8400 Varian). Deux cents microlitres de TFA à 8 M sont ajoutés pour obtenir une concentration finale à 2 M. Les flacons sont incubés 2 h à  $110^\circ\text{C}$  afin d'hydrolyser les polysaccharides. Après refroidissement des flacons, 50  $\mu\text{L}$  d'une solution d'inositol 2 mM sont ajoutés à chaque échantillon comme témoin interne. Les échantillons sont séchés à  $37^\circ\text{C}$  sous une rampe à air. Cinq cents microlitres de méthanol-HCl (Supelco) sont ajoutés, et les flacons incubés 16 h à  $80^\circ\text{C}$  afin de transformer les monosaccharides en méthylglycosides libres. Les échantillons sont lavés deux fois au méthanol pour éliminer l'HCl. Les fractions sont alors silylées en ajoutant 200  $\mu\text{L}$  d'un mélange hexaméthylidisializane/triméthylchlorosilane/ pyridine (3:1:9, Supelco). Les tubes sont incubés à  $110^\circ\text{C}$  pendant 20 min, afin de dériver les méthylglycosides en triméthyl-silyl glycosides. L'agent de silylation est ensuite évaporé doucement sous rampe à air. Après l'évaporation et deux lavages avec 1 mL de cyclohexane, les dérivés sont solubilisés dans 1 mL de cyclohexane.

#### 3-7-2- Analyse

Un volume de 1  $\mu\text{L}$  d'échantillon est prélevé par le passeur d'échantillon (équipé d'une seringue Hamilton de 10  $\mu\text{L}$ ) et injecté dans la colonne de chromatographie gazeuse pour l'analyse de son contenu en monosaccharide. Le chromatographe en phase gazeuse est un appareil Varian 3800, équipé d'une colonne capillaire en silice fondu CP-SIL 5 CB (25 m x 0,25 mm). L'hélium, gaz vecteur de la chromatographie est réglé à 1,40 bars ( $1,7 \text{ mL.min}^{-1}$ ). L'injecteur et le détecteur à ionisation de flamme (FID) sont chauffés respectivement à  $250^\circ\text{C}$  et  $280^\circ\text{C}$ . La pression de l'hélium est réglée à 20 psi (équivalent à 1,37 bars environ). Après l'injection, la température de la colonne augmente graduellement de  $10^\circ\text{C.min}^{-1}$  jusqu'à  $160^\circ\text{C}$ , puis de  $1,5^\circ\text{C.min}^{-1}$  jusqu'à  $220^\circ\text{C}$ , et enfin de  $20^\circ\text{C.min}^{-1}$  jusqu'à  $280^\circ\text{C}$ . La colonne est stabilisée 3 min à  $280^\circ\text{C}$  en fin de cycle puis refroidie à  $120^\circ\text{C}$ . Chaque monosaccharide possède un temps de rétention spécifique attribué par comparaison au temps de rétention des monosaccharides contenus dans l'échantillon standard (rhamnose, galactose, fructose, xylose, arabinose,

mannose, glucose, acide galacturonique, acide glucuronique en concentration à  $0,1 \text{ nmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). L'aire obtenue pour chaque monosaccharide est intégrée (STAR work station Varian 5.52) et quantifiée en  $\text{nmole} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  par rapport au témoin interne, l'inositol. Les résultats obtenus pour chaque ose sont exprimés en pourcentage molaire par rapport à l'ensemble des monosaccharides présents.

### 3-8- Analyse de Polysaccharides par Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Communément appelée PACE (*Polysaccharide Analysis using Carbohydrate gel Electrophoresis*), cette méthode consiste à séparer des mono/oligosaccharides de tailles différentes sur un gel électrophorèse. L'observation est possible grâce à la dérivation des mono/oligosaccharides par un fluorophore visible sous UV. Afin de pouvoir observer les différents monosaccharides et les degrés de polymérisation des oligosaccharides, des monosaccharides témoins (glucose, maltose, arabinose, galactose, rhamnose et acide galacturonique) et un marqueur de taille sont utilisés : un dextran (10 kDa) hydrolysé durant 2 h avec du TFA 2 M à  $80^\circ\text{C}$ .

La dérivation des mono/oligosaccharides se fait avec un fluorophore l'ANTS (8-AminoNaphthalène-1,3,6 Tri Sulfonicacid, Sigma®) par une réaction d'amination réductrice. Cinq microlitres d'ANTS et  $5 \mu\text{L}$  de cyanoborohydrure de sodium sont ajoutés à 1 mg d'échantillon lyophilisé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. L'ANTS est préparé à 0,1 M et dissout dans un mélange acide acétique/eau (3:17), et le cyanoborohydrure de sodium est préparé à 1 M et dissout dans du DMSO anhydre.

Les tubes sont centrifugés à 1500 g durant 1 min puis incubés 5 h dans un bain marie à  $37^\circ\text{C}$ , avant d'être lyophilisés 1 h au Speed Vac. L'échantillon est repris dans  $100 \mu\text{L}$  d'urée à 6 M et conservé à  $-20^\circ\text{C}$  pour une durée maximale de 6 mois.

L'électrophorèse se fait sur un gel acrylamide composé d'un gel de migration dont la composition est donnée dans le Tableau 4. Un gel de concentration est coulé sur le gel de migration (Tableau 5).

**Tableau 4 :** Composition du gel de migration PACE (30% d'acrylamide) pour un volume de 5 mL

Réactif	Volume
Tampon tris-borate 1 M pH 8,2	0,166 mL
Eau mQ	1,084 mL
Solution d'acrylamide (40% p/v)	3,75 mL
Ammonium PerSulfate (APS) (10% p/v)	25 $\mu$ L
TEMED	7 $\mu$ L

**Tableau 5 :** Composition du gel de concentration PACE (8% d'acrylamide) pour un volume de 2 mL

Réactif	Volume
Tampon tris-borate 1M pH 8,2	0,058 mL
Eau mQ	1,42 mL
Solution d'acrylamide (40% p/v)	0,4 mL
Ammonium PerSulfate (APS) (10% p/v)	20 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L

Après avoir déposé 5  $\mu$ L d'échantillon par puits, l'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration tris-borate pH 8,2 (0,1 M) sous une tension de 100 V pendant 2 h. Les gels sont alors délicatement démoulés, exposés sous une lampe UV dans l'appareil Imager Appligène et les photographies des gels sont prises avec le logiciel Biocapt (Vilbert lourmat).

### 3-9- Détermination du degré de méthylesterification des pectines

Le degré de méthylestérification est déterminé par le dosage du méthanol libéré lors de l'hydrolyse des groupements méthylesters fixés sur les acides galacturoniques en se référant à une courbe étalon (Klavons et Bennet, 1986).

La courbe étalon (Tableau 6) est obtenue à l'aide d'une solution de méthanol 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> obtenue à partir d'une solution mère 1000X diluée dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,5. Différents volumes de la solution à 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> correspondant aux différentes concentrations de méthanol sont prélevés et placés dans un tube. Une U.mL<sup>-1</sup> d'alcool déshydrogénase est ajoutée et le mélange est incubé à 25°C pendant 20 min. Le dosage colorimétrique est réalisé après incubation pendant 15 min à 60°C avec 20 mM de 2,4-pentanedione qui réagit avec le formaldéhyde formé et donne un composé jaune détectable à 412 nm.

**Tableau 6 : Préparation de la courbe étalon**

Volume de méthanol 0,01mg/mL ( $\mu$ L)	10	12,5	25	50	100	200
Masse du méthanol ( $\mu$ g)	0,1	0,125	0,25	0,5	1	2
Méthanol ( $\mu$ mole)	0,00312	0,00390	0,00781	0,01562	0,03125	0,0625
Volumes du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 ( $\mu$ L)	240	237,5	225	200	150	50
Volume de l'AO à 1U/mL ( $\mu$ L)	250 (incubation 20 min à 25°C)					
Volume de 2, 4 pentanedione ( $\mu$ L)	500 (15 min à 60°C)					

Le degré de méthylesterification des pectines est réalisé de la manière suivante : l'échantillon à analyser est préparé à 0,7; 0,4 et 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Dans 4 mL de chacune de ces solutions, 4 mL de KOH 1 M sont ajoutés et incubés à température ambiante durant 1h. Cette réaction a pour but de libérer les groupements méthyls sous forme de méthanol dans le milieu de réaction. Le KOH est neutralisé par ajout de 910  $\mu$ L d'acide phosphorique 1 M jusqu'à obtenir un pH de 7,4. Le volume est ensuite complété à 16 mL en rajoutant de l'eau mQ. Deux cents cinquante microlitres de cette solution sont prélevés et le méthanol est dosé comme décrit précédemment.

Le degré de méthylesterification est obtenu en divisant la concentration molaire du méthanol par celle de l'acide galacturonique obtenue par GC-FID.

### 3-10- Dot-blot

Les échantillons d'extraits pariétaux (2,5 ; 5 ou 10  $\mu$ g) sont déposés sur une membrane de nitrocellulose. Après avoir séché la membrane, celle-ci est saturée sur la nuit dans du PBS-lait 3%, puis incubée 2 h à température ambiante avec un anticorps primaire dirigé contre des épitopes associés aux polysaccharides pariétaux (Tableau 1 ; cf. méthodes d'imagerie cellulaire) dilué au 1/20 dans du PBS-lait 3%. Après 3 rinçages de 10 min au PBS-lait 3%, la membrane est incubée pendant 2 h avec l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/1000 dans du PBS-lait 3%. Après 3 rinçages de 10 min au PBS-lait 3% et un rinçage final dans du PBS, les épitopes sont révélés en présence du mélange BCIP/NBT (Promega). Ce

mélange est rajouté goutte à goutte progressivement sur la membrane jusqu'à obtention d'une coloration. La réaction est ensuite stoppée en plongeant la membrane dans de l'eau milliQ.

## **RESULTATS**

## **Partie 1 (article): Deux nouvelles petites molécules isolées par criblage affectent la germination des grains de pollen et la croissance et le développement des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana***

Le criblage d'une chimiothèque de 258 composés (Thèse de Flavien Dardelle), provenant du CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie), a permis d'isoler 2 molécules, M1 et M2, qui perturbent la croissance et le développement des tubes polliniques d'*A. thaliana*, de la tomate et du tabac. Afin d'identifier et de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires perturbés par ces traitements, une étude approfondie a été menée sur ces deux molécules ainsi que sur la galvestine-1. Ce dernier composé, identifié grâce à un criblage pharmacologique, est un inhibiteur de monogalactosyldiacylglycerol synthases (Botté et al., 2011). Toutes les molécules induisent un effet dose-réponse sur le phénotype et la croissance des tubes polliniques. Seules les molécules M1 et M2 inhibent partiellement ou fortement selon la dose la germination du pollen et la croissance des tubes polliniques. Les molécules affectent également la distribution des polymères de la paroi des tubes polliniques, augmentent la production des FAO totales mais sembleraient induire une diminution de la production de l'anion superoxyde. Elles perturbent également la dynamique des filaments d'actine et de RIC4 (ROP-interacting protein CRIB 4), un effecteur de la protéine ROP1 (Rho-GTPases from Plant1), spécifique du pollen. Ceci suggère que ces composés perturberaient également le trafic des vésicules golgiennes dans la zone apicale. Ces molécules pourraient donc être un bon outil pour étudier la croissance polarisée.



## **Chemical screen isolated two new small compounds that affect *Arabidopsis thaliana* pollen tube growth**

Ferdousse Laggoun<sup>1</sup>, Flavien Dardelle<sup>1,\*</sup>, Jérémy Dehors<sup>1</sup>, Denis Falconet<sup>2</sup>, Aurélien Lesnard<sup>3</sup>, Sylvain Rault<sup>3</sup>, Azeddine Driouich<sup>1</sup>, Patrice Lerouge<sup>1</sup>, Arnaud Lehner<sup>1</sup> and Jean-Claude Mollet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, Glyco-MEV, SFR NORVEGE, 76000, Rouen, France

<sup>2</sup>Physiologie Cellulaire & Végétale (PCV), UMR 5168 - CEA - CNRS - INRA - Université Joseph Fourier Grenoble Alpes, 38054, Grenoble, cedex 9, France

<sup>3</sup>Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, CNRS 3038 INC3M, 14032, Caen, France

\*Present address: LPS-BioSciences, Bâtiment 409, Université Paris-Sud, 91400 Orsay, France

**Key words:** pollen tubes, chemical screen, callose, ROS, tip-polarized growth, RIC4, actin dynamics.

### **ABSTRACT:**

During sexual reproduction, pollen grains land on the stigma, rehydrate and produce pollen tubes that grow through the female transmitting-tract tissue. Pollen tubes expand by tip-polarized growth and are a good model to study growth dynamics. Using a chemical screen approach, two small compounds among 258 were isolated. They disrupted *in vitro* pollen tube growth of tobacco, tomato and *Arabidopsis thaliana*. A chemical inhibitor of monogalactosyldiacylglycerol synthases, galvestine-1, was also further investigated. We show that these 3 compounds reduced pollen tube length and induced abnormal phenotypes in a dose dependent manner. Pollen germination was significantly reduced with the two compounds isolated from the screen. They also affected cell wall material arrangement in pollen tubes. The compounds increased the overall ROS production, decreased anion superoxide accumulation and disorganized actin filament and RIC4 dynamics suggesting that they may perturb vesicle trafficking at the pollen tube tip. These molecules may then represent good tools to further study cellular dynamic during polarized-cell growth.

## **INTRODUCTION:**

During sexual reproduction, pollen grains land on the stigma, rehydrate and produce pollen tubes that grow through the female transmitting-tract tissue allowing a proper delivery of the two sperm cells to the ovule (Palanivelu and Preuss, 2000). During this journey, pollen tube perceives different signals promoting its growth, adhesion and guidance (Mollet et al., 2000, 2007; Okuda et al., 2009; Chae and Lord, 2011; Higashiyama and Takeuchi, 2015).

Pollen tube growth is one of the fastest tip-growing cells. They can reach growth rate from 58 to 400 nm.sec<sup>-1</sup>, depending on the species (Cheung and Wu, 2008). This implies an extremely efficient system for delivering and modifying membrane and cell wall material at the tip which is in the case of pollen tube growth highly coordinated as its growth is by oscillation (Feijo et al., 2000; Hepler et al., 2001). Oscillatory growth is followed by an intracellular tip-high gradient of calcium. In addition, calcium is an important second messenger that plays a key role in the regulation of pollen tube elongation and guidance (Holdaway-Clarke et al, 1997; Messerli et al., 2000; Steinhorst and Kudla, 2013). A pH gradient is maintained by H<sup>+</sup>-ATPase transporters, forming an acidic zone at the tip (Obermeyer et al., 1992; Feijo et al., 1999). pH is known to regulate numerous biochemical events such as enzyme activity (Guern et al., 1991), phosphorylation (Blowers and Trewavas, 1989), cytoskeleton structure and activity (Yonezawa et al., 1985; Suprenant, 1991; Andersland and Parthasarathy, 1993; Edmonds et al., 1995), endocytosis and exocytosis (Gluck et al., 1982; Cosson et al., 1989) and protein synthesis and cell division (Dube et al., 1991; Grandin et al., 1991). ROS (reactive oxygen species) are also involved in pollen tube initiation, polarized-growth and elongation. Despite their toxicities, ROS act as a second messenger and are localized at the pollen tube tip (Potocky et al., 2007; Speranza et al., 2012 ; Lassig et al., 2014). ROS production is partially associated with RBOH (respiratory burst oxydase homologs) a family of NADP(H) oxidases localized at the plasma membrane (Potocky et al., 2007; Boisson-Dernier et al., 2013).

During pollen tube growth, cytoskeleton, mainly composed of actin microfilaments and microtubules, maintains the cytoplasm movements inside the pollen tube as the so-called “reverse fountain streaming”. Microtubules are involved in the MGU (male germ unit) movement but actin microfilaments are implicated in organelles and vesicles trafficking and pollen tube growth (Cheung and Wu, 2008). The characterization of actin cytoskeleton in pollen tubes of different species was first observed after chemical fixation and immunostaining with anti-actin antibodies or staining with the fluorescent phalloidin (Rutten and Derksen, 1990; Gibbon et al., 1999; Geitmann et al., 2000; Li et al., 2001; Ye et al., 2009). However,

understanding the distribution of actin filaments in the apical region was challenging because of artefactual observations due to the chemical fixation (Derksen et al., 1995; Miller et al., 1996). The use of live-cell actin markers such as Lifeact-EGFP definitely confirmed the involvement and the spatial distribution of actin cable during pollen tube growth (Fu et al., 2001; Qu et al., 2013). In the shank of pollen tubes, actin filaments follow an axial arrangement which allows organelles and vesicles transport to the tip. At the tip, actin filaments form a regular structure usually called actin fringe (Gibbon et al., 1999; Fu et al., 2001; Vidali et al., 2001; Lovy-Wheeler et al., 2005; Staiger et al., 2010). Rounds et al. (2014) suggested that the actin fringe contributes to the pectin focused secretion in the apical cell wall by moving vesicles to the preferred sites of fusion at the extreme tube apex and contributing to the polarized growth of pollen tubes.

At the center of this process, ROP, a unique sub-family of Rho-GTPases in plants, is known to regulate tip-growth and polar cell expansion in different cell types, particularly the pollen-specific ROP1, is an essential regulator for pollen tip-growth (Kost et al., 1999; Li et al., 1999; Molendijk et al., 2001; Fu et al., 2002; Jones et al., 2002). ROP1 is localized in the plasma membrane of the pollen tube tip, and has an oscillatory interaction with two downstream targets that are CRIB motif-containing ROP-interacting proteins (RIC3 and RIC4) (Fu et al., 2001; Gu et al., 2005). These two proteins have two distinct functionalities and control two different pathways downstream of ROP1: the formation of a tip-focused calcium gradient and the assembly of the actin fringe, respectively (Gu et al., 2003; 2005).

Exocytosis of vesicles, charged with cell wall materials, are transported by the reverse fountain streaming (Lord and Russell, 2002). In *A. thaliana*, pollen tubes possess a specific cell wall organization compared to somatic cells. In the shank, it is composed of an inner cell wall layer enriched in  $\beta$ -glucan (mostly callose and little cellulose) and an outer layer composed of cellulose, hemicellulose (mostly xyloglucan) and pectins (Dardelle et al., 2010; Chebli et al., 2012). Callose is not only present in the inner cell wall layer but also in plugs that allow the vegetative cell to conserve a regular volume during pollen tube elongation (Lord, 2000; Cai et al., 2011). The mode and pattern of callose plug deposition vary among the species (Mogami et al., 2006; Qin et al., 2012). At the tip, only one cell wall layer can be observed and is enriched in methylesterified pectins, AGPs (arabinogalactan proteins), xyloglucan and a little amount of cellulose (Dardelle et al., 2010; Chebli et al., 2012).

Despite the fundamental role of pollen tubes in sexual plant reproduction, this tip-growing cell represents also a very good model for studying polarized growth and cell wall

synthesis and remodeling (Hepler et al., 2001; Parre and Geitmann, 2005b; Geitmann and Steer, 2006; Chebli and Geitmann, 2007; Qin and Yang, 2011; Chebli et al., 2012; Mollet et al., 2013).

For many years, different approaches were used to understand the complex processes involved in pollen tube growth and cell wall remodeling including functional genomic, enzyme and pharmaceutical treatments (Malho'et al., 1995; Parre and Geitmann, 2005a; Klahre and Kost, 2006; Aouar et al., 2010). Chemical screen of small compounds found recent applications in plant cell biology, particularly to understanding hormone signaling and cross-talk such as auxin, brassinosteroid or strigolactone (Choe et al., 1998; Asami et al., 2001; Armstrong et al., 2004; Kombrink and Kaiser, 2016), but also in plant-pathogen interactions (Knoth et al., 2009; Noutoshi et al., 2012). Few studies were focused on pollen. Robert et al. (2008) developed an automated image-based screen for compounds that inhibited pollen germination *in vitro* or affected polar growth. Pollen tubes were also used to understand plant growth and development (Chuprov–Netochin et al., 2016) or cellular processes as endomembrane trafficking (Ung et al., 2013).

In this work, we screened 258 compounds from the CERMN chemical library, part of la Chimiothèque Nationale (<http://chimiotheque-nationale.cn.cnrs.fr/>) on *A. thaliana* pollen. Two compounds M1 and M2 were isolated. Together with galvestine-1, previously reported to impact pollen tube growth (Botté et al., 2011), these molecules were able to inhibit pollen germination and perturb the polarized growth of the tube depending on the concentrations by modulating actin dynamics and ROS accumulation. Cell wall materials, such as callose, pectin and AGPs were also impacted by the treatments suggesting that the compounds may directly or indirectly perturb vesicle trafficking at the pollen tube tip. Their dose-dependent effects points out the potential benefits of these compounds as new tools to study polarized growth.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Plant growth conditions***

Seeds of *A. thaliana* Col-0 (stored at 4°C) were spread on the surface of sterilized soil and cultivated in growth chambers in long-day photoperiod (16 h light/8 h dark at 20°C/16°C, respectively) and 60% relative humidity. Seeds containing the *pLAT52::lifeact-mEGFP* (Vidali et al., 2009 ; Qu et al., 2013) or *pCL-CRIB4-GFP* (Rong et al., 2016) constructions were a gift of Pr. Shanjin Huang (Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China) and Pr. Zhenbiao Yang (Center for Plant Cell Biology, University of California, Riverside, USA), respectively.

*Nicotiana tabacum* seeds were spread on the surface of sterilized soil. Plants were grown with a photoperiod of a 16 h light/8 h dark cycle at 25 and 22 °C during the light and dark period, respectively. Relative humidity was maintained at 60%, and plants were watered every 2 d.

*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘West Virginia 106’ (wva106) seeds were sown 1 cm under the surface of sterilized soil and cultured in a growth chamber. Plants were grown with a photoperiod of a 16 h light/8 h dark cycle at 25 and 22 °C during the light and dark period, respectively. Relative humidity was maintained at 60%, and plants were watered every 2 d.

### ***Pollen tube culture***

Pollen grains of *A. thaliana* were germinated in liquid germination medium (GM) containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.01% (w/v) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, and 10% (w/v) sucrose, pH 7.5 as described by Boavida and McCormick (2007). Briefly, 40 flowers (in 1.5 mL Eppendorf<sup>®</sup> plastic tube) were submerged in 1 mL of GM. Tubes were shaken with a vortex to release the pollen grains from the anthers. Flowers were removed with a pair of tweezers and pollen suspension was then centrifuged at 4000 g for 7 min. New GM was added to the pellet and pollen were transferred in 1.5 mL plastic tube (Eppendorf<sup>®</sup>), 96-well-plates (ThermoFisher<sup>®</sup>) or in  $\mu$ -slides 18-well (Ibidi<sup>®</sup>) depending on the experiment and grown at 22°C in the dark.

Pollen grains were collected from freshly dehisced anthers, and the stamens of three flowers (tobacco) or five flowers (tomato) were submerged in 5mL of BK medium [1.62 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.25 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 2.97 mM KNO<sub>3</sub> and 1.65 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O] (Brewbaker and Kwack, 1963) containing 15% sucrose. Pollen grains were suspended in the liquid medium by vortex, and the stamens were removed with tweezers. Tomato pollen tubes were grown in glass vials at 22°C in the dark for 6 h under agitation. Tobacco pollen tubes were grown in 24-well-plates (ThermoFisher<sup>®</sup>), without agitation at 22°C in the dark.

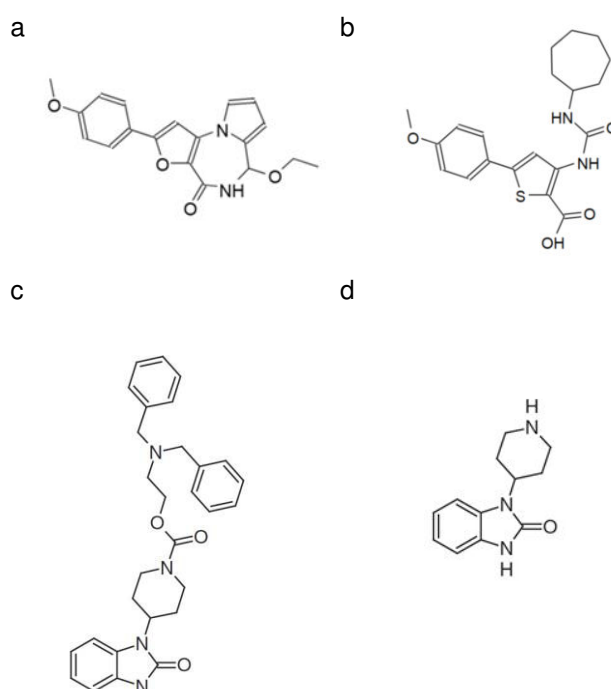
### ***Chemical screen***

A chemical library from the CERMN (Centre d’Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, UniCaen, France) containing 258 diverse compounds solubilized in DMSO was screened at the concentration of 20  $\mu$ M based on their abilities to disturb pollen

tube phenotype. For the primary screen, the negative control was 0.1% DMSO. Molecule screening and the dose-response effects were performed in 96-well-plates.

Two compounds were then selected: M1 (Fig. 24a) and M2 (Fig. 24b). M1 and M2 have two different structures with only one analogy: a terminal anisole group. M1 contains a furan, amide, ethoxy and pyrrole groups (Fig. 24a) and M2 has thiophen, carbamide and cycloheptane groups (Fig. 24b). Another compound (galvestine-1) was added to the study (Fig. 24c). Galvestine-1 is known to reduce pollen tube length *in vitro* (Botté et al., 2011). The negative control of galvestine-1 was G0. G0 possess a galvestine-1 structure modification that leads to the loss of bioactivity (Fig. 24d) (Botté et al., 2011).

The dose-effects of the compounds were tested on pollen grains in 96-well-plates with concentration ranging from 0.5, 1, 5, 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$ , with a final concentration of DMSO at 0.3%. Compounds were prepared in 100% DMSO at 10 mM and then diluted in distilled water to reach 500  $\mu\text{M}$ . The solution of DMSO 5% and the compounds at 500  $\mu\text{M}$  were mixed to have the same DMSO concentration (0.3%) for all the treatments.



**Figure 24 :** Structure of the compounds selected during the chemical screen and further investigated in the present study (a) M1. (b) M2. (c) Galvestine-1 and (d) the negative control of galvestine-1: G0.

### ***Cytochemical staining***

- Callose staining

Decolorized aniline blue in 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1% pH 12 was used to localize callose (Johnson-Brousseau and McCormick, 2004). Decolorized aniline blue was directly added to the medium after 6 h of culture at a final concentration of 0.1%. The observation was performed after 2 h of incubation in the dark at room temperature.

- ROS detection

ROS were detected with nitro blue tetrazolium (NBT; Alfa Aesar®) and the fluorescent ROS indicator 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes). NBT solution was prepared in GM at 7 mM and incubated for 20 min with pollen tubes at a final concentration of 1.2 mM. CM-H<sub>2</sub>DCFDA was initially dissolved in 100% DMSO at 8.6 mM and diluted in fresh GM at 20 μM and used at a final concentration of 0.4 μM. After incubation with CM-H<sub>2</sub>DCFDA, pollen tubes were observed under the microscope and the time-laps acquisition started as soon as the fluorescence appeared.

### ***Immunolocalization of Arabidopsis pollen tube cell wall epitopes***

Two primary antibodies (LM19 and LM2, PlantProbes) were used. LM19 recognizes epitopes associated with weakly methylesterified homogalacturonan (HG) domain of pectin (Verhertbruggen et al., 2009) whereas LM2 was generated against rice arabinogalactan proteins (AGPs) (Yates et al., 1996) and recognizes a carbohydrate epitope containing a β-linked glucuronic acid.

After 6 h of culture, a fixation medium containing PIPES 100 mM, 4 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 4 mM EGTA, 10% (w/v) sucrose and 5% (v/v) of paraformaldehyde pH 7.5 was added to the GM and incubated overnight at 4°C. Pollen tubes were centrifuged at 4000 g for 7 minutes. The pellet was resuspended in 200 μL of Phosphate Buffer Saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2) and then deposited on a μ-Slide VI<sup>0.4</sup> Poly-L-lysine (Ibidi®), incubated overnight at room temperature to fix the pollen tubes on the lysine matrix and then rinsed 3 times with PBS before being incubated with PBS 3% fat-free milk for 30 min at room temperature. Pollen tubes were then rinsed 3 times with PBS. Primary antibodies were diluted at 1:5 with PBS and incubated overnight at 4 °C in the dark. Pollen tubes were rinsed 3 times with PBS and the secondary anti-rat antibody combined with fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma) diluted at 1:50 with PBS was incubated for 3 h at

30°C. Controls were carried out by incubation of pollen tubes with the secondary antibody only. Before observation, pollen tubes were rinsed three times with PBS and resuspended in a mix of citifluor/PBS (v/v).

### ***Microscopes and image acquisition***

A confocal inverted microscope Leica SP2 was used to observe pollen tubes expressing *pLAT52::lifeact-mEGFP*, *pCL-CRIB4-GFP* and CM-H<sub>2</sub>DCFDA treated pollen tubes using a  $\mu$ -slide 18-wells (Ibidi®). Images were acquired every 2 sec 915 msec for 5 min for pollen tubes expressing *pLAT52::lifeact-mEGFP* and *pCL-CRIB4-GFP* and for 10 min for pollen tubes treated with CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Different filter sets were used, *pLAT52::lifeact-mEGFP* (absorption 488 nm, emission 505-545 nm); *pCL-CRIB4-GFP* (absorption 488 nm, emission 498-560 nm) and CM-H<sub>2</sub>DCFDA (absorption 488 nm, emission 500-535 nm).

An inverted microscope Leica DMI 6000B was used to observe phenotypes under bright field, aniline blue and FITC under epi-fluorescence with different filter sets (absorption, 405 nm; emission, 523 nm or absorption, 460–500 nm; emission, respectively).

The program ImageJ (Abramoff et al., 2004) was used to measure pollen tube germination rate and pollen tube length. Fluorescence intensity was expressed as the mean pixel intensity and was measured in the surface area starting at the pollen tube tip up to 30  $\mu$ m back from the tip.

### ***Statistical analyses***

Data were treated with R software (R Development Core Team, 2008) and represent the mean  $\pm$  SEM. Pairwise comparison were performed with the Dunnett's test or with Wilcoxon's test analysis with Holm adjustment according to parametric and non-parametric batch of dataset. Significant differences were \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

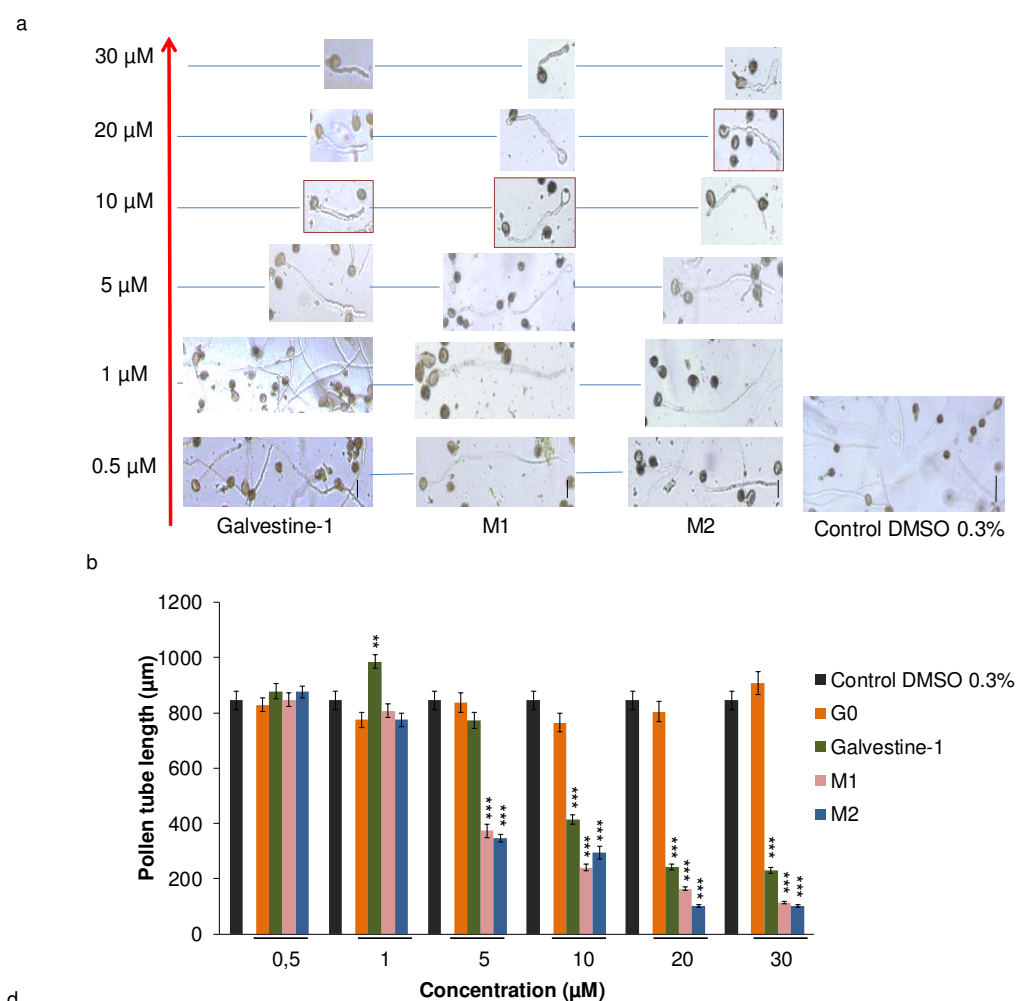
## **RESULTS**

### ***Effects of the compounds on pollen germination and pollen tube growth***

The effect of the selected compounds on pollen germination and pollen tube growth was investigated in 96-well plates with pollen grains incubated for 6 h with the compounds at different concentrations. Pollen tubes treated with 0.3% DMSO (control) have an average length of 845.6  $\mu$ m  $\pm$  33.6 (Figure 25a-b). Similar results were obtained with different concentrations of the galvestine control (G0). Both the DMSO control and G0 did not show any



changes on pollen germination nor on the shape and/or the length of the pollen tubes (Fig. 25a, b and c).



	Non-germinated pollen grains (%)	Normal pollen tubes (%)	Early burst pollen tubes (%)	Lately burst pollen tubes (%)	Pollen tubes with a phenotype (%)
Control DMSO	44.3 ± 3.2	29.5 ± 1.3	21.9 ± 2.4	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.2
G0 10 μm	48.6 ± 4.3	22.3 ± 1.4	23.8 ± 4.6	3.1 ± 0.6	2.2 ± 0.2
Galvestine-1 10 μm	48.1 ± 5.2	17.9 ± 0.9***	17.3 ± 3.1	3.9 ± 0.7	12.8 ± 0.9 ***
M1 10 μm	69.3 ± 3.6 ***	2.8 ± 0.6 ***	18.8 ± 6.2	2.5 ± 0.5	6.6 ± 0.7
M2 20 μm	68.2 ± 6.9 ***	4.8 ± 1.2 ***	12.1 ± 1.4 ***	5.6 ± 0.8	9.2 ± 0.9

**Figure 25:** Dose-response effect of the compounds on *Arabidopsis thaliana* pollen tube (a) phenotypes and (b) length after 6 h of culture. Data represent the mean of ( $34 \leq n \leq 76$  pollen tubes) from two biological replicates  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean). Asterisks indicate significant differences (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ) from the control DMSO 0.3% according to pairwise comparison using Dunnett's test analysis with R software.(c) Effect of

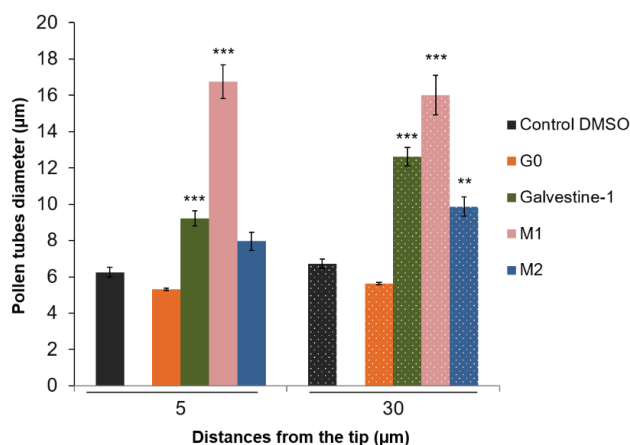
the selected concentrations of the compounds on pollen germination and phenotype rates. Data represent the mean of ( $665 \leq n \leq 1249$ ) pollen from two biological replicates  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences ( $*** P < 0.001$ ,  $** P < 0.01$  and  $* P < 0.05$ ) from the control DMSO 0.3% according to pairwise comparison using Dunnett's test analysis with R software. In (a), the red framed images point out the selected concentrations of the compound. Scale bar = 40  $\mu$ m.

In fact, the rates of normal pollen tubes ranged between  $29.5 \% \pm 1.3$  to  $22.3 \% \pm 1.4$  in the control or G0, respectively and only 2% of pollen tubes displayed abnormal shape (Fig. 25c). M1, M2 and galvestine-1 have a dose-dependent effect on pollen tube length (Fig. 25a). After 6 h, pollen tubes treated with M1 were shorter (Fig. 25b) and displayed a swollen tip for concentrations higher than 5  $\mu$ M (Fig. 25a). The tubes reached only 400  $\mu$ m after 6 h, half the length of the control (Fig. 25b). In the presence of M2, pollen tubes were also shorter for concentrations higher than 5  $\mu$ M (Fig. 25b). At 20  $\mu$ M, pollen tubes were misshaped at the tip. Galvestine-1 also shortened the pollen tubes significantly at 10  $\mu$ M (Fig. 25b) but did not induce any strong deformation (Fig. 25a). Similar effects were observed on *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* pollen tubes (Supplemental Figure S1). A critical reduction of the pollen tube length (shorter than 300  $\mu$ m) was observed at 30  $\mu$ M with the 3 compounds (Fig. 25b). To investigate further the compounds, one concentration was selected, for each compound, based on the ratio between germination rates and the frequency of phenotypes. Thus, the concentrations were selected to avoid drastic effects (ungerminated, non-growing or dead pollen tubes) but to have living and growing tubes with a phenotype. The selected concentrations were 10  $\mu$ M for M1 and galvestine-1 and 20  $\mu$ M for M2 (Fig. 25).

The early burst pollen tubes (*i.e.* pollen tubes bursting just after germination) did not change dramatically (22-24% in the controls and 17-19% with galvestin-1 and M1 except for M2 (12%) (Fig. 25c). Treatment with 10  $\mu$ M galvestine-1 resulted in shortened pollen tube (12.8%) and a significant increase of the percentage of lately burst pollen tubes (*i.e.* burst of pollen tubes with a length equal to the pollen grain diameter  $\sim$  20  $\mu$ m) (3.9%) compared to the control G0. Treatments with M1 (10  $\mu$ M) and M2 (20  $\mu$ M) affected pollen tube germination. The rates of non-germinated pollen grains were  $69.3 \% \pm 3.6$  with M1 and  $68.2 \% \pm 6.9$  with M2 significantly higher than in the control ( $44.3 \% \pm 3.2$ ). Similarly, the rates of normal pollen tubes with M1 and M2 were  $2.8 \% \pm 0.6$  and  $4.8 \% \pm 1.2$ , respectively and significantly lower than in the control ( $29.5 \% \pm 1.3$ ) (Fig. 25c).

Finally, all the compounds have a significant effect on the pollen tube diameter. The diameters of the tubes were measured at 5 and 30  $\mu$ m back from the tip (Fig. 26). The pollen

tube diameters in the controls were between 5 and 7  $\mu\text{m}$  (Fig. 26). After 6 h of incubation with galvestine-1, pollen tube diameters increased significantly at 5  $\mu\text{m}$  and 30  $\mu\text{m}$  from the tip, reaching  $9.2 \mu\text{m} \pm 0.4$  and  $12.6 \mu\text{m} \pm 0.5$ , respectively. M2 treatment induced also a significant increase of the pollen tube diameters but only at 30  $\mu\text{m}$  from the tip ( $9.9 \mu\text{m} \pm 0.5$ ). M1 has the most important effect on the diameters of pollen tubes reaching around 16  $\mu\text{m}$  at 5 and 30  $\mu\text{m}$  back from the tip (Fig. 26), due to the swelling of the tip (Fig. 25).



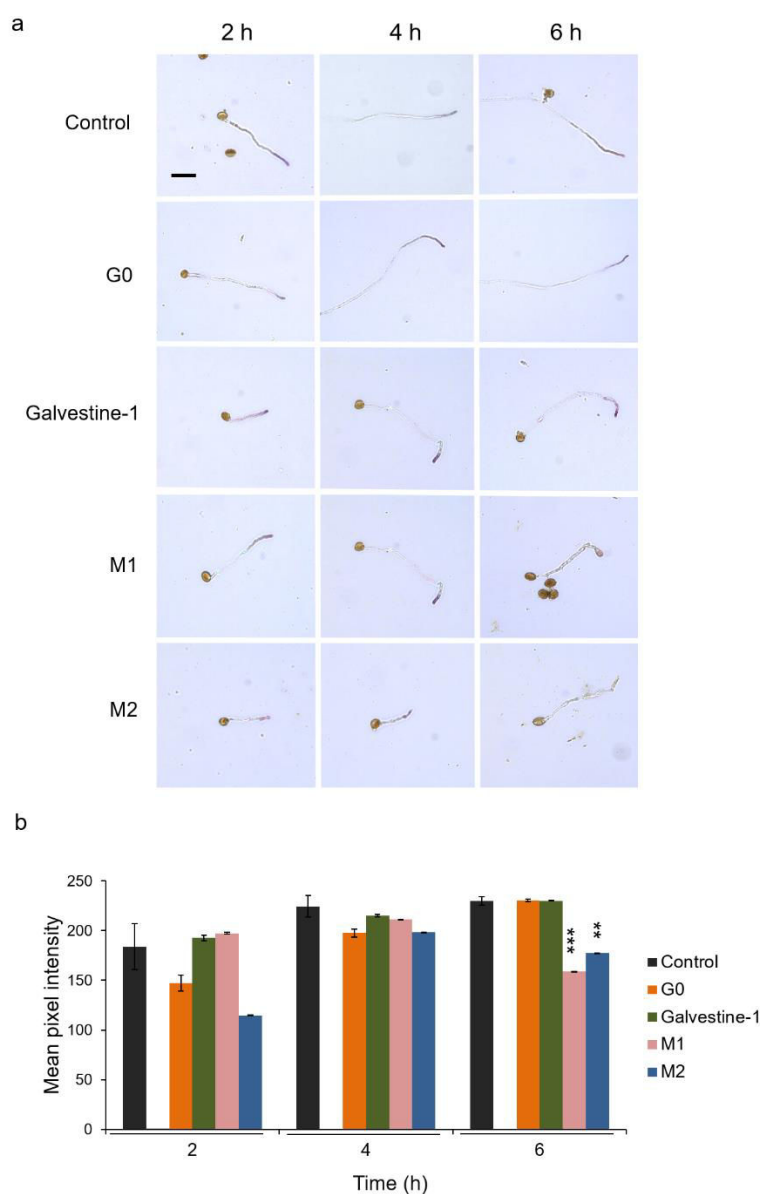
**Figure 26 :** Effect of the selected concentrations of the compounds on pollen tube diameters at 5  $\mu\text{m}$  and 30  $\mu\text{m}$  from the tip. Data represent the mean of 15 pollen tubes from two biological replicates  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences (\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$ ) from the control DMSO 0.3% according to Dunnett's test analysis with R software.

### *Effect of the compounds on ROS production*

To determine the effect of the compounds on ROS production, two different techniques were used: NBT staining and the fluorescent ROS indicator CM-H<sub>2</sub>DCFDA.

NBT allows to detect only superoxide anion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) after 20 min of incubation with the reagent (Fig. 27a). NBT staining was quantified using Image J software as the mean pixel intensity in the pollen tube tip (Fig. 27b). With the two control conditions (DMSO and G0), the accumulation of superoxide regularly increased after 2, 4 and 6 h (Fig 27a) and the pixel mean intensity slightly increased over time: 184, 224 and 230 after 2, 4 and 6 h respectively for the DMSO and 150, 197 and 230 after 2, 4 and 6 h respectively for G0 (Fig. 27b). Galvestine-1 induced the same increase with no significant difference compared to the control (Fig. 27a and b). Treatments with M1 and M2 showed no significant differences after 2 and 4 h when compared to the DMSO (Fig. 27b). However, after 6 h, the anion superoxide production was

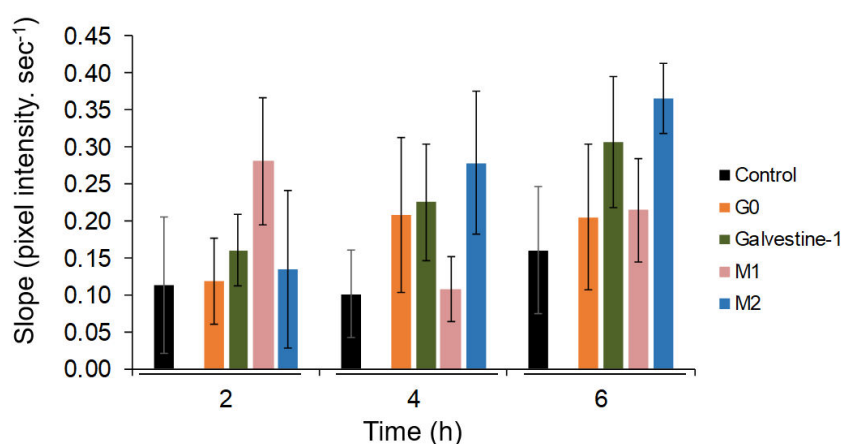
significantly lower in the treated samples ( $158.7 \pm 0.12$  for M1,  $177.5 \pm 0.04$  for M2) than in the DMSO ( $229.89 \pm 4.29$ ) (Fig. 27b).



**Figure 27** : Effect of the compounds on anion superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) production. (a) Staining of pollen tubes with NBT. (b) Mean pixel intensity of NBT staining after 2, 4 and 6 h of treatment. Data represent the mean of ( $6 \leq n \leq 14$  pollen tubes)  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences (\*\*\*)  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$ ) from the control DMSO 0.3% according to pairwise comparison using Dunnett's test analysis (for 2 h and 4 h) and according to pairwise comparison using Wilcoxon's test analysis with Holm adjustment (for 6 h) with R software according to parametric and non-parametric batch of time dataset. Scale bar = 40  $\mu$ m.

CM-H<sub>2</sub>DCFDA allows the detection of ROS, by converting this probe to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). DCF fluorescence was monitored by a time-laps

confocal microscopy for 10 min. Calculation of fluorescence intensity was carried out with ImageJ and results are expressed as the slope of the mean pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$ . With the control, the speed of ROS production did not change between 2 and 4 h of culture with a speed of  $0.11 \pm 0.09$  pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$  and increased slightly ( $0.16 \pm 0.1$ ) after 6 h (Fig. 28). After 2 h of G0 treatment, the speed of ROS production was  $0.11 \pm 0.06$  pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$  and increased after 4 h of treatment to reach a speed of  $0.21 \pm 0.11$  pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$  and then remained stable after 6 h (Fig. 28). Treatment with galvestine-1, induced a progressive increase of the speed of ROS production between 2 and 6 h ranging from  $0.16 \pm 0.05$  to  $0.32 \pm 0.1$  pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$ . With M1 treatment, ROS production was faster than the control and reached  $0.28 \pm 0.09$  pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$  after 2 h of treatment, decreased at 4 h to  $0.11 \pm 0.04$  pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$  and increased again at 6 h ( $0.22 \pm 0.06$  pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$ ). The speed of ROS production induced by M2 was similar than the control after 2 h of treatment but increased after 4 and 6 h of treatment.



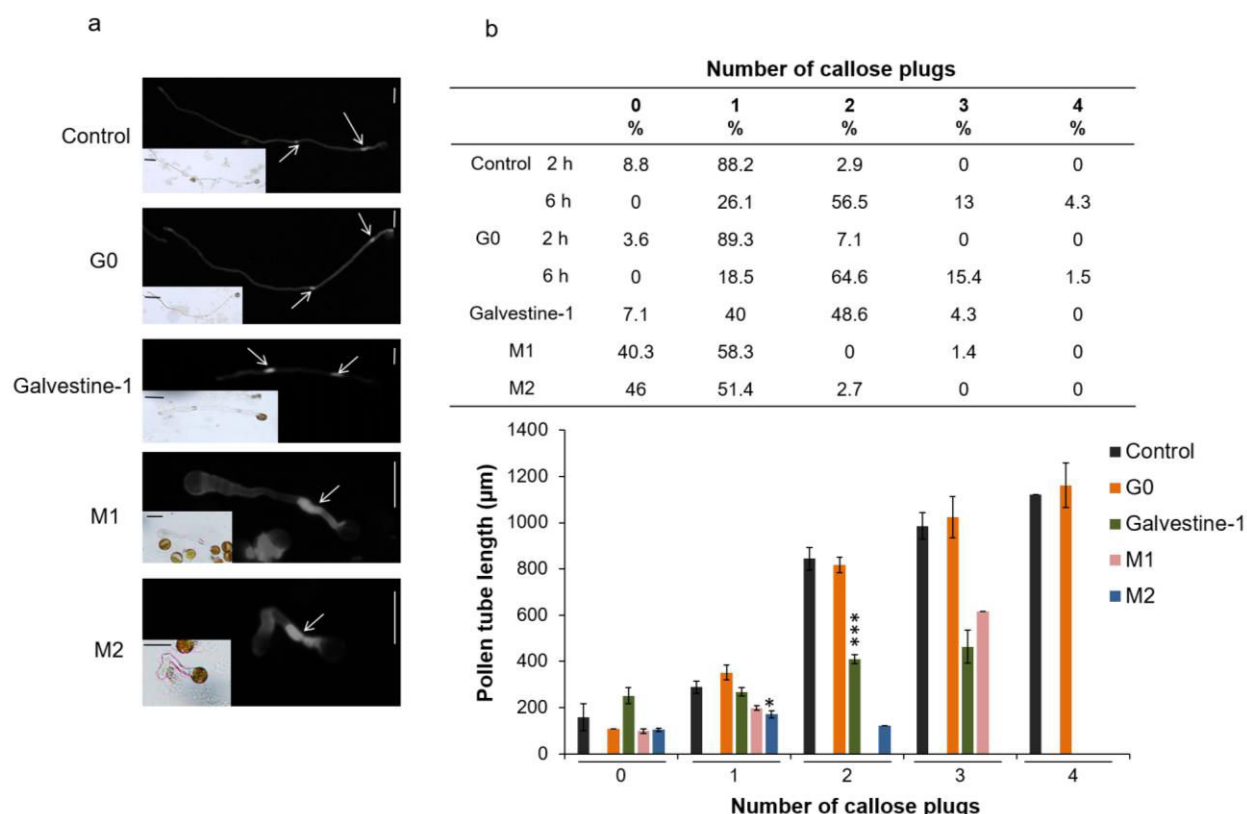
**Figure 28 :** Effect of the compounds on the time-course of ROS production using CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  staining after 2, 4 and 6 h of treatment. Data represent the increase of ROS speed intensity expressed in pixel intensity. $\text{sec}^{-1}$  measured with ImageJ.

### ***Effect of the compounds on cell wall deposition***

To investigate the effect of the compounds on the number of callose plugs and callose deposition in the cell wall, we used decolorized aniline blue (DAB) (Fig. 29a). It is important to note that pollen tubes grown for 2 h in the control conditions (DMSO and G0) were added to the data set (*i.e.* 6 h of growth for treated samples) in order to be able to compare the number of callose plugs in short tubes. Pollen tubes grown for 2h with DMSO and G0 were less than  $500 \mu\text{m}$  long and for most of them ( $\sim 90\%$ ), they produced 1 callose plug (Fig. 29b). After 6 h, control pollen tubes showed normal callose plugs (most of them contained 2 plugs, the

remaining pollen tubes had 1 or 3 callose plugs and only few < 5% had 4 callose plugs) (Fig. 29b) and deposition in the cell wall. The first callose plug was close to the pollen grain (Fig. 29a), the other ones were regularly deposited and their numbers increased with the gain of pollen tube length (Fig. 29b).

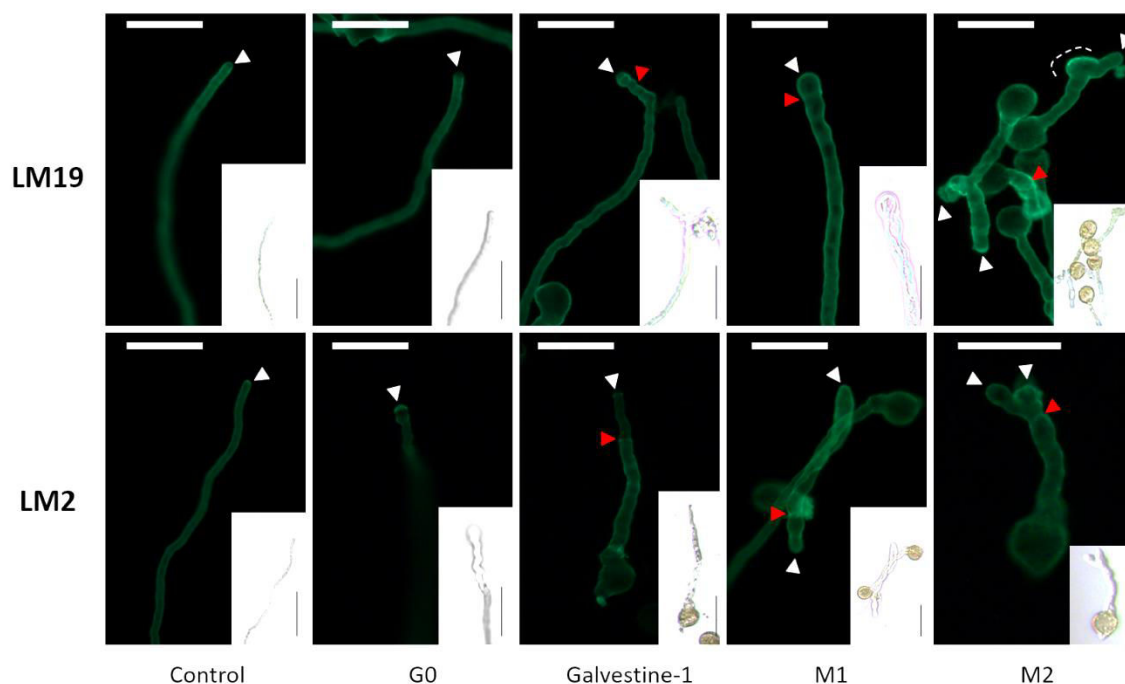
When pollen tubes were treated with M1, the length of pollen tubes ranged from 48.2 to 579.2  $\mu\text{m}$  and contained 0-1 callose plug for 98.6% of them (Fig. 29b). Treatment with M2 induced a decrease of the pollen tube length (200  $\mu\text{m}$  maximum) but the tubes still contained up to 1 callose plug (Fig. 29b). It is important to note that, in certain cases, galvestine-1, M1 and M2 treatments induced also callose deposition in the cell wall at the tips of the tubes for 0.7, 7.5 and 2.7%, respectively. This kind of deposition was absent in the controls. Results obtained with galvestine-1 were similar to those obtained with M1 and M2. Pollen tubes were shorter than in G0 but still contained a high number of callose plugs between 1 and 3 for tubes reaching 200 and 400  $\mu\text{m}$  (Fig. 29b), respectively. For the same average length ( $\sim 400 \mu\text{m}$ ), pollen tubes treated with galvestine-1 contained 2 for most of them or 3 plugs.



**Figure 29 :** Effect of the compounds on callose plug deposition after 6 h of treatment. (a) Cytochemical staining of callose with DAB showing the callose plugs (white arrows). (b) Distribution (%) of the number of callose plugs in treated pollen tubes and its relation with the mean length of pollen tubes. Data represent the mean ( $40 \leq n \leq 98$  pollen tubes) from two biological replicates  $\pm$  SEM. For the controls (DMSO and G0), data are a combination of pollen tubes grown for 6 h and 2 h, in order to get shorter pollen tubes. Asterisks indicate

significant differences (\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.01$  and \* $P < 0.05$ ) from the control DMSO 0.3% according to pairwise comparison using Wilcoxon's test analysis with Holm adjustment with R software. Scale bar = 40  $\mu\text{m}$ .

Immunolabelling of pollen tubes with LM19 antibody (Fig. 30), which recognizes partially methylesterified HGs, revealed that this epitope was mostly detected in the shank of pollen tubes in the control conditions (DMSO and G0). The treated pollen tubes showed different distributions of this epitope. 85% of pollen tubes treated with galvestine-1 showed a localization at the tip, compared to the control (14%). For 100% of them treated with M1, the epitopes recognized by LM19 were located in the entire pollen tube cell wall and 92% for the pollen tubes treated with M2. A brighter labelling was also observed in pollen tube distortion zones which originally were the expanding tip that stopped to grow leading to the emergence of a new tip. With all the treatments, brighter ring-like deposits were also observed, in the swollen tips of pollen tubes treated with M1 and in all the treated pollen tubes suggesting an accumulation of cell wall material during the slow growth phases.



**Figure 30 :** Cell surface immuno-labeling of epitopes associated with weakly methylesterified homogalacturonan and arabinogalactan proteins using LM19 and LM2, respectively on pollen tubes treated with the compounds for 6 h. White arrow head = pollen tube tip, red arrow head = ring-like deposit and dashed white line = pollen tube deformation. Scale bar = 40  $\mu\text{m}$ .

Immunolabelling with LM2 antibody, which recognizes epitopes associated with AGPs, revealed that this epitope was more brightly labelled at the tip of control pollen tubes (DMSO and G0). 93.7% of pollen tubes treated with galvestine-1 and 100% of pollen tubes treated with M1 did not show a localization of LM2 epitope at the tip, compared to the control (20%). All the treatments also induced brighter ring-like deposits as observed with LM19.

### ***Effect of the compounds on actin dynamics and RIC4, a tip-polarized marker***

To investigate if the miss-localization of the cell wall polymers and the growth defect were due to a perturbation of the intracellular trafficking, actin filament dynamics was followed using pollen tubes expressing *pLAT52::lifeact-mEGFP*. In the controls (DMSO and G0), after 2, 4 and 6 h of incubation, actin dynamics was normal with long cables observed in the shank region of the pollen tube and the actin fringe at the tip (Fig. 31; Supplemental Fig. S2). These structures remained highly dynamics and pollen tubes were expanding normally overtime (Supplemental Fig. S2). After 4 h and 6 h of treatment with M1, vacuoles that are normally located in the back of the pollen tube were clearly detectable in the tip region (Fig. 31, Supplemental Fig. S2) and the actin fringe begun to disappear with the apparition of the swollen tip and was totally absent after 6 h of incubation (Fig. 31). At this time, pollen tubes were not expanding anymore but actin cables were still moving (Supplemental Fig. S2). After 2, 4 and 6 h of incubation with M2, the actin fringe and the spatial organization of actin filaments also looked abnormal (Fig. 31). However, after 6 h, pollen tubes were still expanding but more slowly than the control (Supplemental Fig. S2; Supplemental Fig. S3) and no vacuoles were detectable at the tip (Fig. 31; Supplemental Fig. S2). After 2 h and 4 h of incubation with galvestine-1, pollen tubes were also expanding but after 6 h, the growth was reduced (Supplemental Fig. S2; Supplemental Fig. S3). After 4h, the shape of the actin fringe changed with the increasing size of the pollen tube diameter. It was located in the subapical region and at the beginning of the shank region. After 6 h of treatment, the actin fringe was more detectable in the apex and disappeared from the shank region and the subapical region (Fig. 31). Small punctates of actin foci were also observed in the shank close to the apical region only in pollen tubes treated with galvestine-1. M1 and galvestine-1 treatments induced the apparition of actin rings after 4 and 6 h of incubation in the shank region. Actin rings were also observed in pollen grains treated with M2. Actin rings were not observed in the pollen tubes of the control and G0 (Fig. 31).

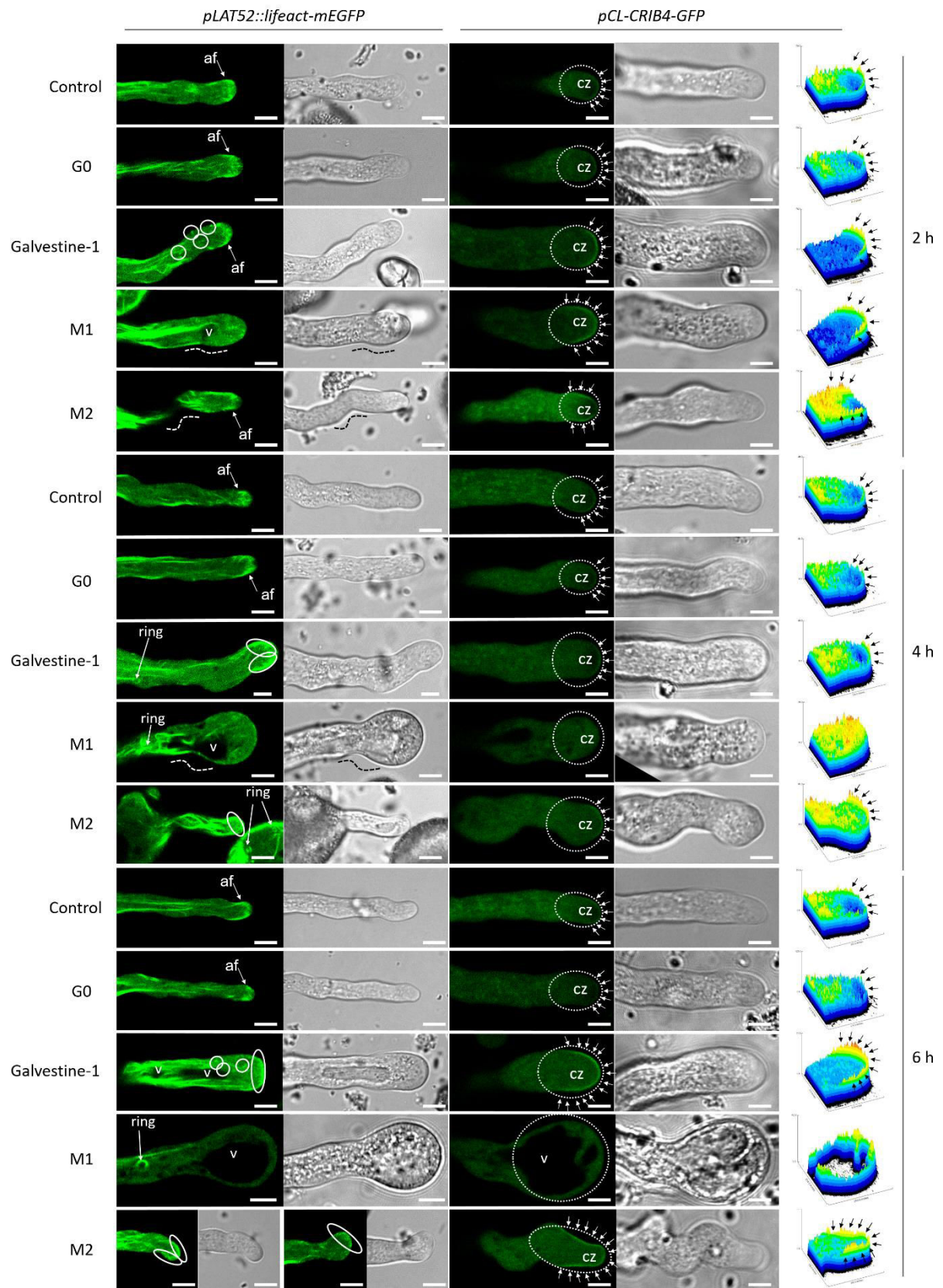
The effect of the compounds on ROP1, an apical growth marker, was assessed by following the location of RIC4, an effector protein of ROP1 using *pCL-CRIB4-GFP*. In the



controls (DMSO and G0), RIC4 localization remained normal after 2, 4 and 6 h of growth (Fig. 31) with pulsatile apparition/disappearance at the plasma membrane in the apical dome (Supplemental Fig. S3). In all conditions and in all pollen tubes, GFP was detected in the cytoplasm.

After 2 h of treatment with M1, a perturbation of RIC4 dynamics was observed. RIC4 was not only localized at the apical dome but also in the subapical region and sometimes this location was persisting (Fig. 31; Supplemental Fig. S3). After 4 h of incubation, RIC4 localization disappeared from the apical plasma membrane and GFP was only located in the cytoplasm (Fig. 31). RIC4 localization at the tip of pollen tubes treated with M2 was extremely versatile and depended on the pollen tube shape. RIC4 was localized in the subapical region and then moved from one side to the other side of the apical dome of the pollen tube. This was associated with a slow growth and multiple changes of the tip growth direction (Fig. 31 and Supplemental Fig. S4).

After 2 and 4 h of treatment with galvestine 1, RIC4 was located, as in DMSO and G0 conditions, in the apical region (Fig. 31). The location was expanded to the subapical region after 6 h of treatment with galvestine-1 (Fig. 31).



**Figure 31:** Effect of the compounds on actin filament and RIC4 dynamics using pollen tubes expressing *Lifeact-mEGFP* and *CRIB4-GFP* after 2, 4 and 6 h of growth. On the right: 3D construction (pixel intensity) of RIC4 distribution in the pollen tube tip.  
af = actin fringe, CZ = clear zone, v = vacuole. Dashed white circle = pollen tube tip, dashed white line = pollen tube deformation, oval white circle = actin fringe accumulation, small arrow = RIC4 location at the plasma membrane and white circle = small punctate actin foci.  
Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSION

### *The compounds disrupt actin dynamics and ROP signaling: two central mechanisms in pollen tube tip-growth*

The actin cytoskeleton has a crucial role in pollen tube and polar growth (Vidali et al., 2001) and the treatments with galvestine-1, M1 and M2 were able to disrupt actin cytoskeleton dynamics. Treatment with M1 induces a progressive disappearance of the actin fringe which completely disappears after 6 h and the apparition of the phenotype and pollen tube growth reduction. Similar effects were observed with the membrane traffic inhibitor Brefeldin A (BFA) or with the electron transport chain inhibitor potassium cyanide (KCN) (Zhang et al., 2010; Rounds et al., 2014). The treatments with M2 and galvestine-1 did not induce the disappearance of the actin fringe but led to a disruption of the structure. The instability of the actin fringe with M2 treatment may explain the twisted shape of the pollen tube. Indeed, it was shown that the turnover of actin filaments (polymerization/depolymerization) was an early event for pollen tube directional growth changes (Qu et al., 2017).

All the treatments are inducing ring-shaped actin structures in the shank of pollen tubes. These structures that represent a circular conformation of actin filaments were observed in most pollen tubes and were already described in several studies using either staining techniques or expressing fluorescent protein-tagged actin-binding domains (Tiwari and Polito, 1988; Thomas et al., 2006; Wilsen et al., 2006; Chaidee et al., 2008; Papuga et al., 2010; Smertenko et al., 2010). Even if the high level of Lifeact expression can induce artefact due to the competition with native actin binding proteins (Wilsen et al., 2006; van der Honing et al., 2011), it is possible that the ring-shaped actin structures in treated pollen tubes indicate a certain physiological state in the cell such as heat stress, calcium availability and extracellular pH changes (Vogler and Sprunck, 2015, Chaidee et al., 2008).

All treatments disturb RIC4 location and oscillation compared to the control. With pollen tubes treated with M1, RIC4 completely disappears from the apical region and this observation is accompanied by the disappearance of the actin fringe. These results are correlated with the fact that RIC4 pathway promotes the assembly of the actin fringe at the tip (Gu et al., 2005). The disruption of RIC4 location with M2 and galvestine-1 treatments is also accompanied with the disorganization of the actin fringe. RIC4 oscillates from the tip to the sub-apical tip region and its location predicts pollen tube directional growth suggesting that the abnormal localization of RIC4 in the apical region explains the multi-directional growth of

pollen tubes (Gu et al., 2005). Although, it remains unclear whether RIC4 directly or indirectly interacts with actin filaments by regulating actin polymerization factors (Guan et al., 2013), our results showed that disruption of RIC4 dynamics is closely related to the formation of the actin fringe and confirmed that apical filamentous actin dynamics and concentrations are influenced by ROP-GTPases (Burkart et al., 2015).

Galvestine-1 is an inhibitor of the biosynthesis of galactolipids. These galactolipids are critical for the biogenesis of photosynthetic membranes, and they act as a source of polyunsaturated fatty acids for the whole cell in phosphate shortage (Botté et al., 2011). Kobayashi et al. (2004) showed that the expression of genes coding for galactolipid synthesis is strongly activated during pollen development and germination, which suggests their importance during pollen maturation and pollen tube growth. Galactolipids are present all along the membrane of pollen tubes (Botté et al., 2011) and that inhibiting the biosynthesis of galactolipids may affect the plasma membrane ROP signaling/location. Interestingly, small and rare punctate actin foci are observed with galvestine-1 treatment. These structures are unusual and poorly described in the literature. Nevertheless, it appears that actin foci are induced during self-incompatibility (SI) response in *papaver* (Poulter et al., 2010) and are able to change the intracellular location of two actin-binding proteins, cyclase-associated protein and actin-depolymerizing factor (Poulter et al., 2011). Thus, we may hypothesize that the lipid homeostasis changes at the plasma membrane orchestrated by galvestine-1 treatment, altered ROP1 dynamics and influences the actin dynamic (Kost et al., 1999; Li et al., 1999; Molendijk et al., 2001; Fu et al., 2002; Jones et al., 2002).

Actin binding proteins (ABPs) play a crucial role in actin polymerization and depolymerization. The construction of actin structures requires several ABPs (Thomas et al., 2006) such as formin, an actin-nucleating protein, that plays a role in establishing the subapical actin in pollen tubes (Cheung et al., 2010) or villin, a bundling factors, that has a major role in actin filament stabilization (Zhang et al., 2010). Thus, the disruption of actin filaments and dynamics by the treatments may result from an inhibition or an activation of ABPs.

### ***The compounds disturb cell wall distribution and lead to a modification of pollen tube morphology***

The number of callose plugs is generally correlated with the length of pollen tubes (Snow and Spira, 1991; Qin et al., 2012). Treatment with LatB (Latrunculin B), an inhibitor of actin

polymerization, affects callose plugs deposition in pollen tubes and induces callose deposits at the tip. From the location of the callose, Chen et al. (2007) have postulated that LatB triggers a stimuli response that enhance callose synthesis and eventually activate callose synthase located at the tip. In our cases, when pollen tubes are treated with galvestine-1, M1 or M2, the pollen tube length is not correlated with the number of callose plugs. In fact, the pollen tube length decreases but the number of callose plugs remained stable, suggesting that callose plugs are not pollen tube length-dependent but are synthesized in a time-dependent manner. But this needs further investigation. Even if actin filaments are critical for the distribution of callose synthase (Cai et al., 2011) and that previous studies have documented that a disorganized cellulose synthase enzyme complex in the plasma membrane may be capable of catalyzing the synthesis of both cellulose and callose (Delmer, 1987; Somerville, 2006), it is difficult to link the effect of our molecules with callose plugs formation or deposition. The synthesis of callose at the tip may be a protective way of the pollen tube to recover from the treatment as shown with the emergence of new tip on treated pollen.

The apparition of the phenotype, especially with M1 and M2 treatments, and the inhibition/reduction of the elongation suggest that the cell wall deposition was affected by the treatments. In untreated pollen tubes, weakly methylesterified HGs are mostly present in the shank but not at the tip, but arabinogalactans proteins are more detectable at the tip. These results are in agreement with previous studies (Mollet et al., 2002; Dardelle et al., 2010; Chebli et al., 2012; Nguema-Ona et al., 2012). Pectin are secreted as highly methylesterified at the extreme apex, and are then de-esterified through the activity of pectin methylesterases (Geitmann, 1999). This tight regulation is thought to regulate the stiffness of the cell wall between the tip (extensibility) and the shank (rigidity) to sustain the cylindrical shape of the tube (Taylor and Hepler, 1997; O'Neill et al., 2004). All the treatments show an abnormal tip localization of LM19 antibody binding. Pectin remodeling might thus be affected by the treatments impacting the capacity of the pollen tube cell wall extension (Stepka et al., 2000; Parre and Geitmann, 2005b; Chen et al., 2007). The absence of tip-localized labelling of AGPs with M1 and galvestine-1 confirmed that cell wall material delivery was disturbed as AGPs are known to be involved in the deposition of new cell-wall material during pollen-tube growth (Mollet et al., 2002; Nguema-Ona et al., 2012). As actin filaments have an important role on vesicle trafficking, the modification of the cell wall polymers distribution can be due to the perturbation of vesicle trafficking by the disruption of polarized exocytosis of cell wall materials and loosening enzymes (Vidali et al., 2010; Rojas et al., 2011; Bibeau et al., 2017).

Blocking AGPs at the plasma membrane surface of pollen tubes by treatment with the Yariv phenylglucoside also induced callose deposition at the tip, mislocation of AGPs and pectins and growth arrest (Roy et al., 1998; Mollet et al., 2002). Interestingly, the effect was reversible upon removal of the reagent and a new emerging tip could be produced back from the original tip that was blocked (Mollet et al., 2002) as it is observed with M2. Thus, it would be interesting to verify if the pollen tubes treated with the compounds can recover and resume their tip-growth when they are removed from the culture medium.

Besides their role as second messenger in countless physiological processes often associated with cytotoxicity (Foyer and Noctor, 2005; Mittler et al., 2011; Wrzaczek et al., 2013; Baxter et al., 2014), ROS are also known to act on wall plasticity (Fry et al., 1998) and are implicated during pollen tube growth (Potocky et al., 2007; Speranza et al., 2012). During this study, total ROS production was assessed using CM-H2DCFDA probe. This probe is known to react slowly with both  $H_2O_2$  and  $O_2^{\bullet-}$  but to react rapidly with hydroxyl radical ( $OH^{\bullet}$ ) and peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) (Setsukinai et al., 2003).  $ONOO^-$  results from  $O_2^{\bullet-}$  and nitric oxide (NO) reaction (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek, 2011). As the production of  $O_2^{\bullet-}$  decreased with M1 and M2 (Fig. 27), we may hypothesize that NO production could be affected by these molecules. NO as well as  $O_2^{\bullet-}$  play a role in pollen tube growth and reorientation (Prado, 2004, Potocky et al., 2007) and changes in NO production might explain the abnormal polarized growth of pollen tubes. On the other hand, total ROS production gradually increased with M2 and Galvestine-1 whereas it increased rapidly with M1 (after 2 h) and then remained close to the control at 4 and 6 h (Fig. 5), which was correlated with the fact that M1 inhibits more rapidly pollen tube growth. Potocky et al., (2012) showed that active GTP-bound Rac/Rop promotes the elevation of ROS levels. Then, the rapid increase of ROS with M1 can be due to the activation of ROP1 by RIC4 but beyond the apical zone. Wilkins et al., (2011) suggested that ROS may also play a role in influencing actin polymerization dynamics in plant cells. We can hypothesize that the disruption of the ROS production by all the compounds can then induce actin dynamics disruption. The compounds used in this study affect more clearly the actin-fringe. As with KCN, the fringe is among the first components to degrade together with the loss of the clear zone and the inhibition of growth, but with a continuation of cytoplasmic streaming (Rounds et al., 2014). As CM-H2DCFDA probe strongly reacts with  $OH^{\bullet}$ ,  $OH^{\bullet}$  production might be enhanced by the treatments.  $OH^{\bullet}$  has a physiological role in cell wall loosening and the cleavage of polysaccharide polymers (Fry, 1998; Schweikert et al., 2000). In regards to the modification of LM19 pattern during treatments, we cannot

exclude that OH<sup>\*</sup> participated by inducing cell wall loosening. However, the links between modification of polarized growth, remodeling of cell wall polymers and actin dynamic remain unclear and need further investigation.

### ***Other possible targets for M1 and M2***

The targets of M1 and M2 are unknown. M1 and M2 are two synthetic compounds from the CERMN. “La Chimiothèque Nationale” provides computational information of molecular properties. The two compounds are weak proton donors and receptors but only M1 is predicted to have kinase-like and NR-like (nucleus receptor-like) binding properties. The *Arabidopsis thaliana* genome contains more than 600 members of RLKs (ReceptorLike Kinases) (Shiu and Bleecker, 2003). These proteins play important roles in plant growth, development and defense responses (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Becraft, 2002). Receptor-Like Kinase1-like (CrRLK1L: named after the first member characterized in *Catharanthus roseus* cell cultures) family contains 17 RLKs that have been implicated in a variety of signaling pathways in *Arabidopsis*, ranging from pollen tube reception and tip growth to hormonal responses (Schulze-Muth et al., 1996; Nissen et al., 2016). For example, FER (FERONIA) and ANX1/2 (ANXUR1/2) perform seemingly opposite functions during pollination. FER controls the behavior of the pollen tube to achieve fertilization (Escobar-Restrepo et al., 2007) and ANX1/2 is required to maintain the cell wall integrity in the growing pollen tube (Boisson-Dernier et al., 2013). Other members of the RLKs family, the Cell-wall associated kinases (WAKs) are membrane-localized proteins tightly bound to the cell wall (He et al., 1996) and evidence is emerging that they can serve as pectin signaling receptors, for both short oligogalacturonic acid fragments and larger pectins resident in the cell wall. WAKs play a potential role in cell expansion (Kohorn and Kohorn, 2012). In emerging pollen tubes, WAKs are only detected at the tip, but their relationships with pectin deposition and tip-growth need to be more explored (Kohorn and Kohorn, 2012). We cannot exclude that our molecules, M1 and M2 perturb RLKs signaling during pollen tube growth and that modification of plasma membrane composition and structure with Galvestine-1 prevent the correct targeting of RLK at the tip of the tube.

Evidently, the characterization of the targets of the two compounds are required to further investigate their direct and indirect effects on the tip-growth machinery.



## LIST OF SUPPLEMENTAL DATA

**Supplemental Figure S1.** Dose-response effect of the compounds on (a) *Solanum lycopersicum* and (b) *Nicotiana tabacum* pollen tubes after 6 h of culture.

**Supplemental Figure S2.** Time-lapse observations of actin dynamic in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes treated for 2, 4 and 6 h.

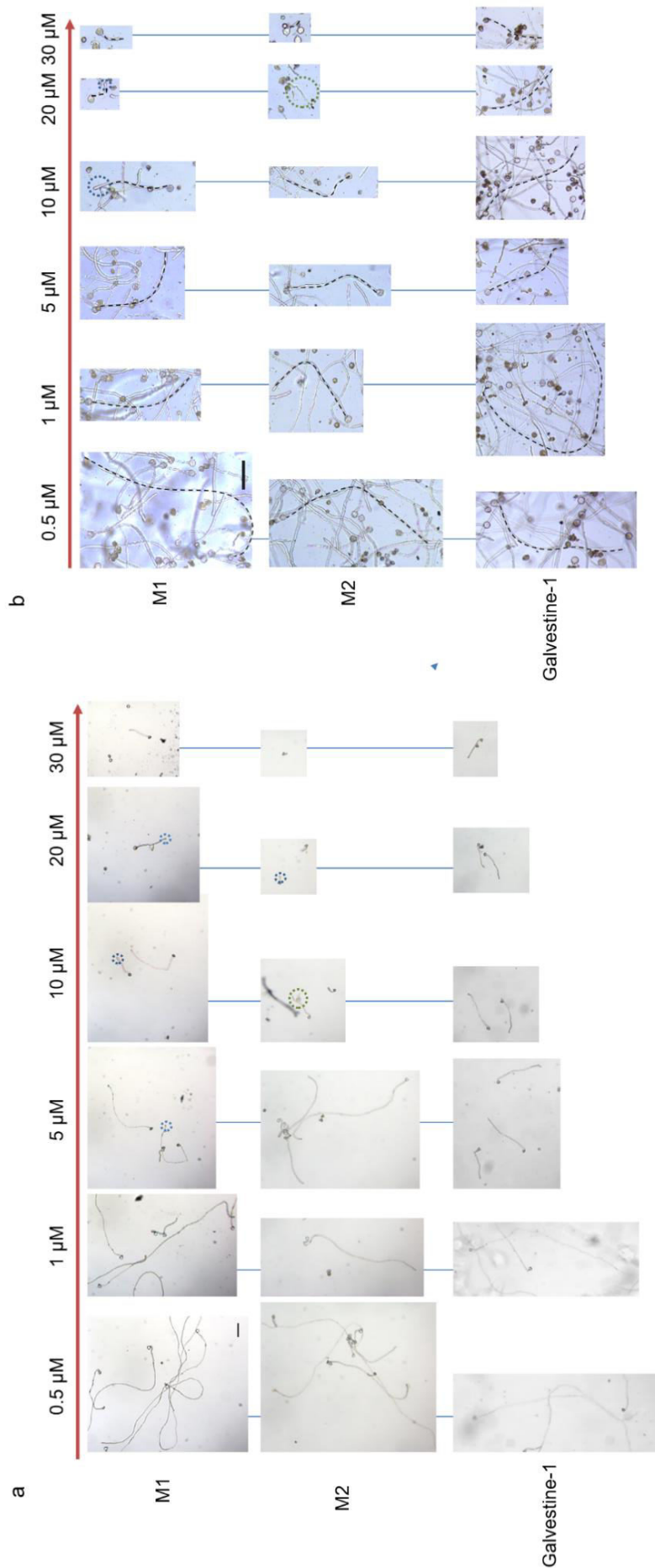
**Supplemental Figure S3.** Time-lapse observations of RIC4 dynamic in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes treated for 2, 4 and 6 h.

**Supplemental Figure S4.** Time-lapse observation of RIC4 dynamic in *Arabidopsis thaliana* pollen tube treated with M2 for 6 h.

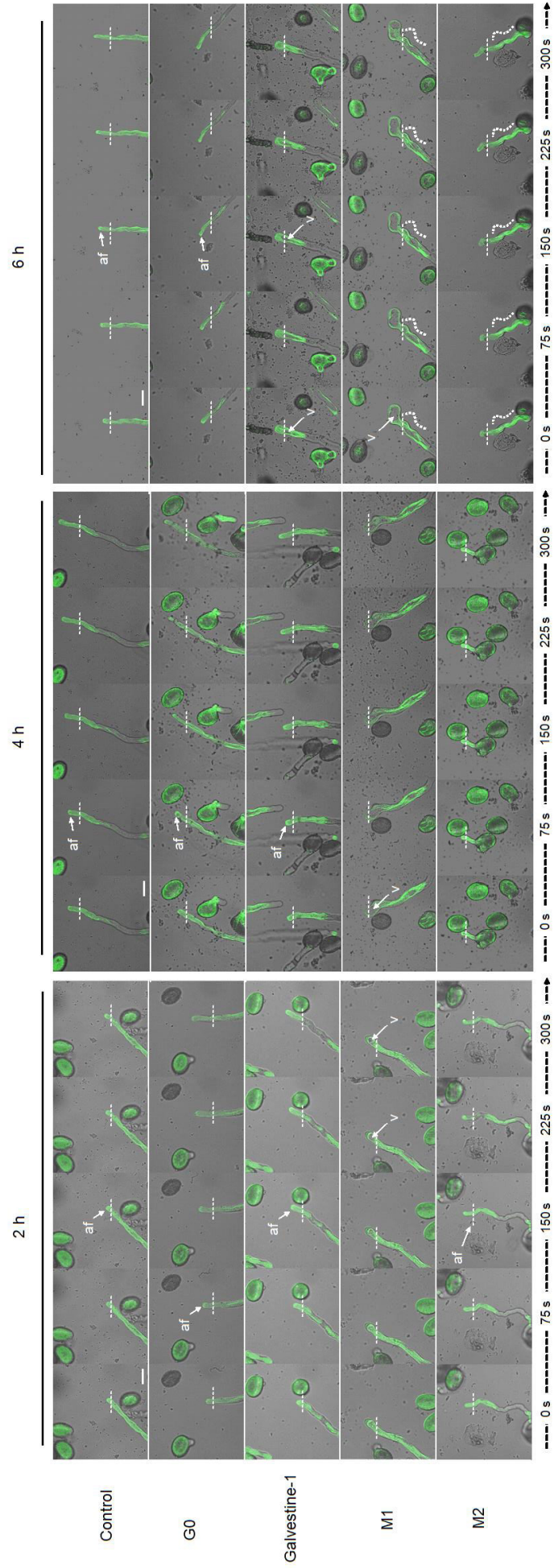
## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors want to thanks the Cell Imaging Platform of Université de Rouen Normandie PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>). We are grateful to Pr. Shanjin Huang (Chinese Academy of Sciences, Beijing, China) and Zhenbiao Yang (University of California, Riverside, USA) for the kind gift of the transformed seeds.

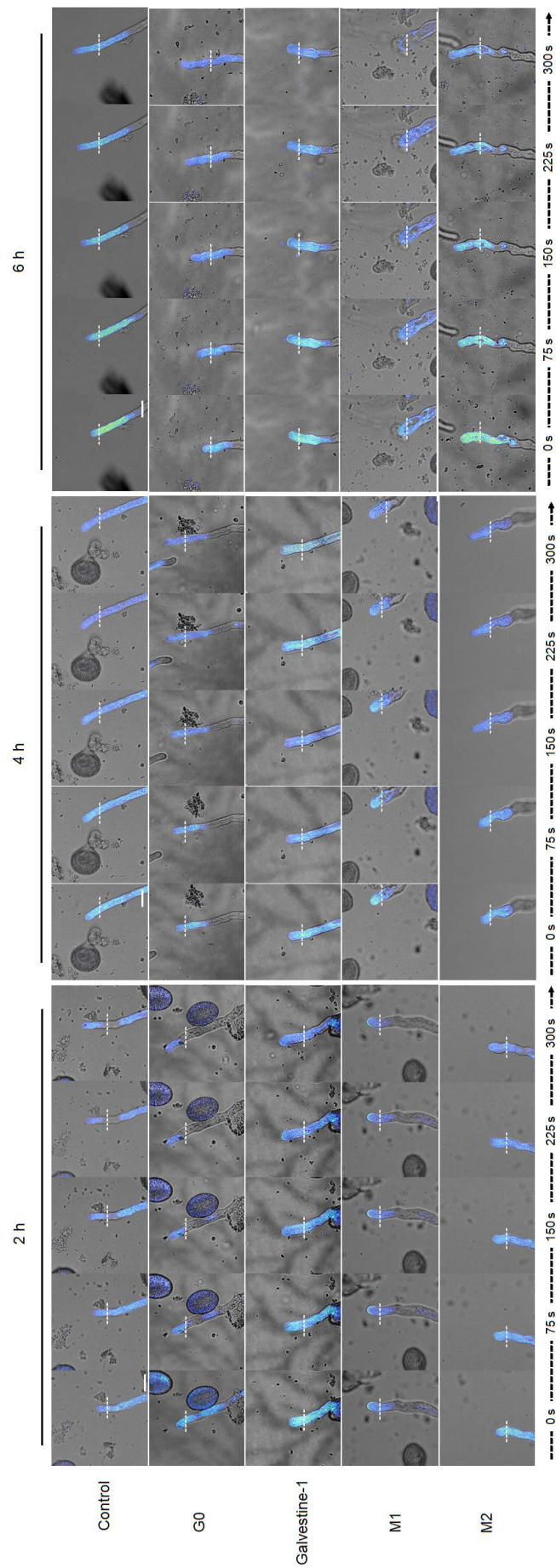
## **SUPPLEMENTAL INFORMATIONS**



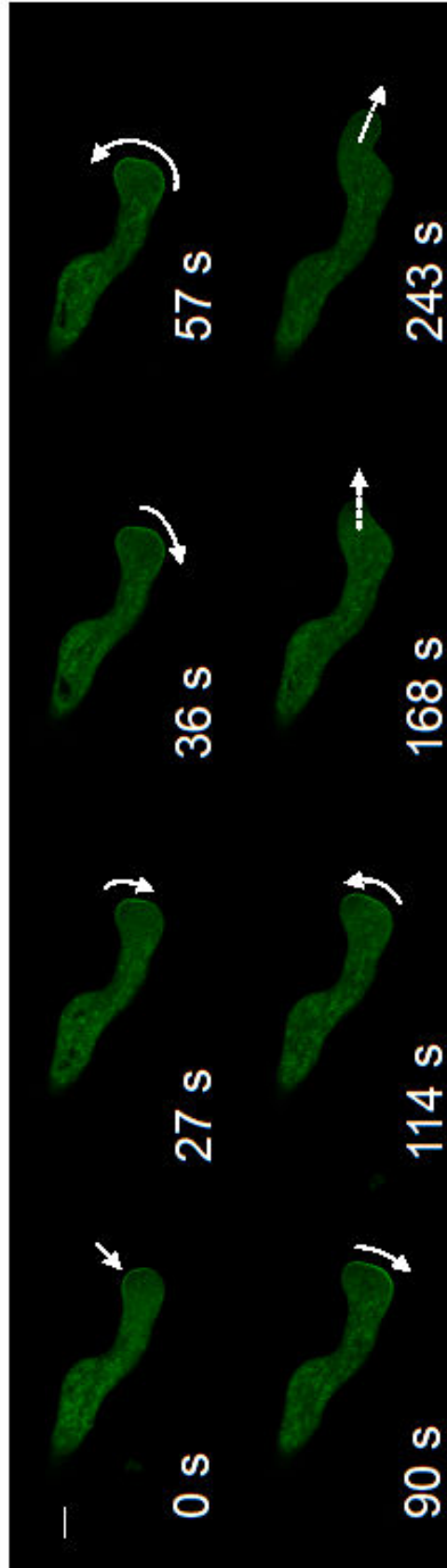
**Supplemental Figure S1** : Dose-response effect of the compounds on (a) *Solanum lycopersicum* and (b) *Nicotiana tabacum* pollen tubes after 6 h of culture. Dashed black line = swollen tip. Dashed blue circle = swollen tip. Dashed green circle = pollen tube deformation. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .



**Supplemental Figure S2 :** Time-lapse observations of actin dynamic in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes treated for 2, 4 and 6 h. af = actin fringe, v = vacuole. Dotted lines indicate pollen tube tip position at 0 sec. Scale bar = 10 μm.



**Supplemental Figure S3:** Time-lapse observations of RIC4 dynamic in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes treated for 2, 4 and 6 h. Dotted lines indicate pollen tube tip position at 0 sec. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .



**Supplemental Figure S4:** Time-lapse observation of RIC4 dynamic of a pollen tube treated with M2 for 2 h. Arrow indicates RIC4 localization and movement. Dashed arrow indicates pollen tube growth direction. Scale bar = 5  $\mu$ m.

## REFERENCES

- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36–42.
- Andersland JM, Parthasarathy MV (1993) Conditions affecting depolymerization of actin in plant homogenates. *Journal of Cell Science* 104: 1273–1279.
- Aouar L, Chebli Y, Geitmann A (2010) Morphogenesis of complex plant cell shapes: the mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction* 23: 15–27.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J (2011) Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells? From physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* 72: 681–688.
- Armstrong JI, Yuan S, Dale JM, Tanner VN, Theologis A (2004) Identification of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 101: 14978–14983.
- Asami T, Min YK, Nagata N, Yamagishi K, Takatsuto S, Fujioka S, Murofushi N, Yamaguchi I, Yoshida S (2001) Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiology* 123: 93–100.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65: 1229–1240.
- Becraft PW (2002) Receptor Kinase Signaling in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18: 163–192.
- Bibeau JP, Kingsley JL, Furt F, Tuzel E, Vidali L (2017) F-Actin mediated focusing of vesicles at the cell tip is essential for polarized growth. *Plant Physiology* DOI:10.1104/pp.17.00753.
- Blowers DP, Trewavas AJ (1989) Rapid cycling of autophosphorylation of a ca-calmodulin regulated plasma membrane located protein kinase from pea. *Plant Physiology* 90:1279–1285.
- Boavida LC, McCormick S (2007) Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 52: 570–582
- Boisson-Dernier A, Lituiev DS, Nestorova A, Franck CM, Thirugnanarajah S, Grossniklaus U (2013) ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.1001719.
- Botté CY, Deligny M, Rocchia A, Bonneau AL, Saïdani N, Hardré H, Aci S, Yamaro-Botté Y, Jouhet J, Dubots E, Loizeau K, Bastien O, Bréhélin L, Joyard J, Cintrat JC, Falconet D, Block MA, Rousseau B, Lopez R, Maréchal E (2011) Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology* 7: 834–842.
- Brewbaker JL, Kwak BH (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50: 859–865.

- Burkart GM, Baskin TI, Bezanilla M (2015) A family of ROP proteins that suppresses actin dynamics, and is essential for polarized growth and cell adhesion. *Journal of Cell Science* 128: 2553–2564.
- Cai G, Faleri C, Del Casino C, Emons AMC, Cresti M (2011) Distribution of callose synthase, cellulose synthase, and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules. *Plant Physiology* 155: 1169–1190.
- Chae K, Lord EM (2011) Pollen Tube Growth and Guidance: Roles of Small, Secreted Proteins. *Annals of Botany* 108: 627–636.
- Chaidee A, Foissner I, Pfeiffer W (2008) Cell-specific association of heat shock-induced proton flux with actin ring formation in chenopodium cells: comparison of auto- and heterotroph cultures. *Protoplasma* 234: 33–50.
- Chebli Y, Geitmann A (2007) Mechanical principles governing pollen tube growth *Functional Plant Science and Biotechnology* 1: 232-245.
- Chebli Y, Kaneda M, Zerzour R, Geitmann A (2012) The cell wall of the arabidopsis pollen tube-spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides. *Plant Physiology* 160: 1940–1955.
- Chen T, Teng N, Wu X, Wang Y, Tang W, Šamaj J, Baluška F, Lin J (2007) Disruption of actin filaments by latrunculin b affects cell wall construction in *Picea meyeri* pollen tube by disturbing vesicle trafficking. *Plant and Cell Physiology* 48: 19–30.
- Cheung AY, Wu HM (2008) Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annual Review of Plant Biology* 59: 547–572.
- Cheung AY, Niroomand S, Zou Y, Wu HM (2010) A Transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 : 16390–16395.
- Choe S, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA (1998) The *DWF4* gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* 10: 231–243.
- Chuprov-Netochin R, Neskorodov Y, Marusich E, Mishutkina Y, Volynchuk P, Leonov S, Skryabin K, Ivashenko A, Palme K, Touraev A (2016) Novel small molecule modulators of plant growth and development identified by high-content screening with plant pollen. *BMC Plant Biology* 16: 192.
- Cosson P, De Curtis I, Pouysse'gur J, Griffiths G, Davoust J (1989) Low cytoplasmic pH inhibits endocytosis and transport from the trans-Golgi network to the cell surface. *Journal of Cell Biology* 108: 377-387.
- Dardelle F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC (2010) Biochemical and immunocytological characterizations of Arabidopsis pollen tube cell wall. *Plant Physiology* 153: 1563–1576.
- Delmer DP (1987) Cellulose biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 38:259-290.



- Derksen J, Rutten T, Van Amstel T, De Win A, Doris F, Steer M (1995) Regulation of pollen tube growth. *Acta Botanica Neerlandica* 44: 93–119.
- Dube F, Dufresne L, Coutu L, Clotteau G (1991) Protein phosphorylation during activation of surf clam oocytes. *Developmental Biology* 146: 473–482.
- Edmonds BT, Murray J, Condeelis J (1995) pH regulation of the F-actin binding properties of Dictyostelium elongation factor 1. *Journal of Cell Biology* 270:15222–15230.
- Escobar-Restrepo JM, Huck N, Kessler S, Gagliardini V, Gheyselinck J, Yang WC, Grossniklaus U (2007) The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science* 317: 656–660.
- Feijó JA, Sainhas J, Hackett GR, Kunkel JG, Hepler PK (1999) Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *The Journal of Cell Biology* 144: 483–496.
- Feijó JA, Sainhas J, Holdaway-Clarke T, Cordeiro MS, Kunkel JG, Hepler PK (2000) Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube paradigm. *BioEssays* 23: 86–94.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28: 1056–1071.
- Fry SC (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal* 332: 507.
- Fu Y, Wu G, Yang Z (2001) Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *Journal of Cell Biology* 152: 1019–1032.
- Fu Y, Li H, Yang Z (2002) The ROP2 gtpase controls the formation of cortical fine f-actin and the early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis. *The Plant Cell* 14: 777–794.
- Geitmann A, Steer M (2006) The architecture and properties of the pollen tube cell wall. In *The Pollen Tube*, edited by Malhó R, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp 177–200.
- Geitmann A (1999) The rheological properties of the pollen tube cell wall. In *Fertilization in Higher Plants*, edited by Cresti M, Cai G, Moscatelli A, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 283–302.
- Geitmann A, Snowman BN, Emons AMC, Franklin-Tong VE (2000). Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *The Plant Cell* 12: 1239–1251.
- Gibbon BC, Kovar DR, Staiger CJ (1999) Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *The Plant Cell* 11: 2349–2363.
- Gluck S, Cannon C, Al-Awqati Q (1982) Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of H<sup>+</sup> pumps into the luminal membrane. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 79: 4327–4331.
- Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* 5: 1003–1011.

- Grandin N, Rolland JP, Charbonneau M (1991) Changes in intracellular pH following egg activation and during the early cell cycle of the amphibian *Pleurodeles waltlii*, coincide with changes in MPF activity. *Biology of the Cell* 72: 259–267.
- Gu Y, Vernoud V, Fu Y, Yang Z (2003) ROP GTPase Regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-Actin. *Journal of Experimental Botany* 54: 93–101.
- Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S, Yang Z (2005) A Rho Family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *The Journal of Cell Biology* 169: 127–138.
- Guan Y, Guo J, Li H, Yang Z (2013) Signaling in pollen tube growth: crosstalk, feedback, and missing links. *Molecular Plant* 6: 1053–1064.
- Guern J, Felle H, Mathieu Y, Kurkdjian A (1991) Regulation of intracellular pH in plant cells. *International Review of Cytology* 127: 111–173.
- He ZH, Fujiki M, Kohorn BD (1996) A Cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271: 19789–19793.
- Hepler PK, Vidali L, Cheung AY (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 159–187.
- Higashiyama T, Takeuchi H (2015) The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annual Review of Plant Biology* 66: 393–413.
- Holdaway-Clarke TL, Feijó JA, Hackett GR, Kunkel JG, Hepler PK (1997) pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *The Plant Cell* 9: 1999–2010.
- Johnson-Brousseau SA, McCormick S (2004) A compendium of methods useful for characterizing Arabidopsis pollen mutants and gametophytically- expressed genes. *The Plant Journal* 39: 761–775.
- Jones MA, Shen JJ, Fu Y, Li H, Yang Z, Grierson CS (2002) The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *The Plant Cell* 14: 763-776.
- Klahre U, Kost B (2006) Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of tobacco pollen tubes. *The Plant Cell* 18: 3033–3046.
- Knoth C, Salus MS, Girke T, Eulgem T (2009) The synthetic elicitor 3,5-dichloroanthranilic acid induces NPR1-dependent and NPR1-independent mechanisms of disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 150: 333–347.
- Kobayashi K, Awai K, Takamiya K, Ohta H (2004) Arabidopsis type b monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiology* 134: 640-648.
- Kohorn BD, Kohorn SL (2012) The Cell Wall-Associated Kinases, WAKs, as pectin receptors. *Frontiers in Plant Science* 3.
- Kombrink E, Kaiser M (2016) Editorial: when chemistry meets biology – generating innovative concepts, methods and tools for scientific discovery in the plant sciences. *Frontiers in Plant Science* 7.

Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, Hong Y, Tolias K, Carpenter C, Chua NH (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *Journal of Cell Biology* 145: 317–330.

Lassig R, Gutermuth T, Bey TD, Konrad KR, Romeis T (2014) Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *The Plant Journal* 78: 94–106.

Li Y, Zee SY, Liu Y M, Huang BQ, Yen LF (2001) Circular F-actin bundles and a G-actin gradient in pollen and pollen tubes of *Lilium davidii*. *Planta* 213: 722–730.

Li H, Lin Y, Heath RM, Zhu MX, Yang Z (1999) Control of pollen tube tip growth by a rgtase dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *The Plant Cell* 11: 1731–1742.

Lord EM, Russell SD (2002) The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18: 81–105.

Lord E (2000) adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends in Plant Science* 5: 368–373.

Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Baskin TI, Hepler PK (2005) Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta* 221: 95–104.

Malho R, Read ND, Trewavas AJ, Pais MS (1995) Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *The Plant Cell* 8: 1173–84.

Messerli MA, Créton R, Jaffe LF, Robinson KR (2000) Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during pollen tube growth. *Developmental Biology* 222: 84–98.

Miller DD, Lancelle SA, Hepler PK (1996) Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium Longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma* 195: 123–32.

Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16: 300–309.

Mogami N, Miyamoto M, Onozuka M, Nakamura N (2006) Comparison of callose plug structure between dicotyledon and monocotyledon pollen germinated in vitro. *Grana* 45: 249–256.

Molendijk AJ, Bischoff F, Rajendrakumar CSV, Friml J, Braun M, Gilroy S, Palme K (2001) *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *The EMBO Journal* 20: 2779–2788.

Mollet JC, Faugeron C, Morvan H (2007) Cell adhesion, separation and guidance in compatible plant reproduction. *Annual Plant Review* 25: 69–90.

Mollet JC, Kim S, Jauh GY, Lord EM (2002) Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects. *Protoplasma* 219: 89–98.

Mollet JC, Leroux C, Dardelle F, Lehner A (2013) Cell wall composition, biosynthesis and remodeling during pollen tube growth. *Plants* 2: 107-147.

- Mollet JC, Park SY, Nothnagel EA, Lord EM (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *The Plant Cell* 12: 1737–50.
- Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicre-Gibouin M, Mollet JC, Driouich A (2012) Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* 110: 383–404.
- Nissen KS, Willats WGT, Malinovsky FG (2016) Understanding CrRLK1L Function: Cell Walls and Growth Control. *Trends Plant Science* 21: 516–527.
- Noutoshi Y, Okazaki M, Kida T, Nishina Y, Morishita Y, Ogawa T, Suzuki H, Jikumaru Y, Hanada A, Kamiya Y, Shirasu K (2012) Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24: 3795–3804.
- Obermeyer G, Lutzelschwab M, Heumann HG, Weisenseel MH (1992) Immunolocalization of H<sup>+</sup>-ATPases in the plasma membrane of pollen grains and pollen tubes of *Lilium Longiflorum*. *Protoplasma* 171: 55–63.
- O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review in Plant Biology* 55: 109–139.
- Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, Sprunck S, Takeuchi H, Yui R, Kasahara RD, Hamamura Y, Mizukami A, Susaki D, Kawano N, Sakakibara T, Namiki S, Itoh K, Otsuka K, Matsuzaki M, Nozaki H, Kuroiwa T, Nakano A, Kanaoka MM, Dresselhaus T, Sasaki N, Higashiyama T (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458 : 357 - 361.
- Palanivelu R, Preuss D (2000) Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends in Cell Biology* 10: 517–524.
- Papuga J, Hoffmann C, Dieterle M, Moes D, Moreau F, Tholl S, Steinmetz A, Thomas C (2010) *Arabidopsis* LIM proteins: a family of actin bundlers with distinct expression patterns and modes of regulation. *The Plant Cell* 22: 3034–52.
- Parre E, Geitmann A (2005a) More Than a Leak Sealant. The mechanical Properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiology* 137: 274–86.
- Parre E, Geitmann A (2005b) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta* 220: 582–592.
- Potocký M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnov N, Žárský V (2007) Reactive Oxygen Species produced by NADPH Oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist* 174: 742–51.
- Potocký M, Pejchar P, Gutkowska M, Jiménez-Quesada MJ, Potocká A, Alché JdD, Kost B, Žárský V (2012) NADPH Oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *Journal of Plant Physiology* 169: 1654–63.
- Poulter NS, Staiger CJ, Rappoport JZ, Franklin-Tong VE (2010) Actin-Binding Proteins implicated in the formation of the punctate actin foci stimulated by the self-incompatibility response in *Papaver*. *Plant Physiology* 152: 1274–1283.

- Poulter NS, Bosch M, Franklin-Tong VE (2011) Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of *Papaver* pollen. *Annals of Botany* 108: 659–675.
- Prado AM (2004) Nitric Oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2707–2714.
- Qin P, Ting D, Shieh A, McCormick S (2012) Callose plug deposition patterns vary in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana* ecotypes and tomato species. *BMC Plant Biology* 12, 178.
- Qin Y, Yang Z (2011) Rapid tip growth: insights from pollen tubes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22: 816–824.
- Qu X, Zhang H, Xie Y, Wang J, Chen N, Huang S (2013) *Arabidopsis* Villins promote actin turnover at pollen tube tips and facilitate the construction of actin collars. *The Plant Cell* 25: 1803–17.
- Qu X, Zhang R, Zhang M, Diao M, Xue Y, Huang S (2017) Organizational innovation of apical actin filaments drives rapid pollen tube growth and turning. *Molecular Plant* 10: 930–47.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Robert S, Chary SN, Drakakaki G, Li S, Yang Z, Raikhel NV, Hicks GR (2008) Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor bri1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 8464–8469.
- Rojas ER, Hotton S, Dumais J (2011) Chemically mediated mechanical expansion of the pollen tube cell wall. *Biophysical Journal* 101: 1844–53.
- Rong D, Luo N, Mollet JC, Liu X, Yang Z (2016) Salicylic acid regulates pollen tip growth through an NPR3/NPR4-independent pathway. *Molecular Plant* 9: 1478–1491.
- Rounds CM, Hepler PK, Winship LJ (2014) The apical actin fringe contributes to localized cell wall deposition and polarized growth in the Lily pollen tube. *Plant Physiology* 166: 139–51.
- Roy S, Jauh GY, Hepler PK, Lord EM (1998) Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. *Planta* 204: 450–458.
- Rutten TL, Derksen J (1990) Organization of actin filaments in regenerating and outgrowing subprotoplasts from pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 180: 471–479.
- Schulze-Muth P, Irmeler S, Schroder G, Schroder J (1996) Novel type of receptor-like protein kinase from a higher plant (*Catharanthus roseus*)-cDNA, gene intramolecular autophosphorylation and identification of a threonine important for auto- and substrate phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 26684–26689.
- Schweikert C, Liskay A, Schopfer P (2000) Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry*. 53: 565–570.

- Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *Journal of Biological Chemistry* 278: 3170–3175.
- Shiu SH, Bleecker AB (2003) Expansion of the Receptor-like Kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in arabidopsis. *Plant Physiology* 132: 530–543.
- Smertenko AP, Deeks MJ, Hussey PJ (2010) Strategies of actin reorganisation in plant cells. *Journal of Cell Science* 123: 3019–3028.
- Snow AA, Spira TP (1991) Differential pollen-tube growth rates and nonrandom fertilization in *Hibiscus Moscheutos* (Malvaceae). *American Journal of Botany* 78: 1419-1426.
- Somerville C (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 53–78.
- Speranza A, Crinelli R, Scoccianti V, Geitmann A (2012) Reactive Oxygen Species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit. *Plant Biology* 14: 64-76.
- Staiger CJ, Poulter NS, Henty JL, Franklin-Tong VE, Blanchoin L (2010) Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen. *Journal of Experimental Botany* 61: 1969–86.
- Steinhorst L, Kudla J (2013) Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiology* 163: 471–485.
- Stepka M, Ciampolini F, Charzynska M, Cresti M (2000) Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. Does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? *Planta* 210: 630–635.
- Suprenant KA (1991) Unidirectional microtubule assembly in cell-free extracts of *Spisula solidissima* oocytes is regulated by subtle changes in pH. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 19: 207–220.
- Taylor LP, Hepler PK (1997) Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Biology* 48: 461-491.
- Thomas SG, Huang S, Li S, Staiger CJ, Franklin-Tong VE (2006) Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen. *The Journal of Cell Biology* 174: 221–229.
- Tiwari Suresh C, Polito VS (1988) Spatial and temporal organization of actin during hydration, activation, and germination of pollen in *Pyrus communis* L.: a population study. *Protoplasma* 147: 5–15.
- Ung N, Brown MQ, Hicks GR, Raikhel NV (2013) An approach to quantify endomembrane dynamics in pollen utilizing bioactive chemicals. *Molecular Plant* 6: 1202–1213.
- van der Honing HS, van Bezouwen LS, Emons AM, Ketelaar T (2011) High expression of lifeact in *Arabidopsis thaliana* reduces dynamic reorganization of actin filaments but does not affect plant development. *Cytoskeleton* 68: 578–587.
- Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP (2009) An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research* 344: 1858–1862.

- Vidali L, McKenna ST, Hepler PK (2001) Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Molecular Biology of the Cell* 12: 2534–2545.
- Vidali L, Rounds CM, Hepler PK, Bezanilla M (2009) Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical f-actin network in tip growing plant cells. *PLoS ONE* 4: e5744.
- Vidali, L, Burkart GM, Augustine RC, Kerdavid E, Tüzel E, Bezanilla M (2010) Myosin XI is essential for tip growth in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 22: 1868–1882.
- Vogler F, Sprunck S (2015) F-Actin forms mobile and unwinding ring-shaped structures in germinating Arabidopsis pollen expressing Lifeact. *Plant Signaling & Behavior* 10: e1075684.
- Wilkins KA, Bancroft J, Bosch M, Ings J, Smirnov N, Franklin-Tong VE (2011) Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of papaver. *Plant Physiology* 156: 404–416.
- Wilsen KL, Lovy-Wheeler A, Voigt B, Menzel D, Kunkel JG, Hepler PK (2006) Imaging the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction* 19: 51–62.
- Wrzaczek M, Brosché M, Kangasjärvi J (2013) ROS signaling loops: production, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 575–582.
- Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6: 131–139.
- Ye J, Zheng Y, Yan A, Chen N, Wang Z, Huang S, Yang Z (2009) Arabidopsis Formin3 directs the formation of actin cables and polarized growth in pollen tubes. *The Plant Cell* 21: 3868–3884.
- Yonezawa N, Nishida E, Sakai H (1985) pH control of actin polymerization by cofilin. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 14410–14412.
- Zhang H, Qu X, Bao C, Khurana P, Wang Q, Xie Y, Zheng Y, Chen N, Blanchoin L, Staiger CJ, Huang S (2010) Arabidopsis VILLIN5, an actin filament bundling and severing protein, is necessary for normal pollen tube growth. *The Plant Cell* 22: 2749-2767.
- Zhang Y, He J, Lee D, McCormick S (2010) Interdependence of endomembrane trafficking and actin dynamics during polarized growth of Arabidopsis pollen tubes. *Plant Physiology* 152: 2200–2210.

## **Partie 2: Etude de l'adhésion *in vitro* des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana* par une approche enzymatique de déconstruction d'une matrice enrichie en polysaccharides.**

Cette étude a pour but de comprendre les processus impliqués lors de l'adhésion du tube pollinique d'*Arabidopsis thaliana* dans le tissu de transmission femelle en utilisant un test d'adhésion *in vitro* développé sur des plaques 96 puits. Ainsi plusieurs fractions de paroi cellulaire d'*Arabidopsis thaliana*, extraites séquentiellement, ont été testées pour leur capacité à favoriser l'adhésion des tubes polliniques. Parmi ces fractions, seules les fractions enrichies en pectines, extraites avec de l'imidazole, permettaient l'adhésion significative des tubes polliniques. Les extraits issus de fleurs ou de feuilles ont donné des résultats identiques en termes d'adhésion. Par conséquent, il a été décidé de n'utiliser que des extraits de feuilles afin de pouvoir en obtenir en plus grandes quantités. Suite à des traitements enzymatiques de cette matrice adhésive, nos résultats ont montré que les homogalacturonanes (HG) et les chaînes latérales de rhamnogalacturonane-I (RG-I) et/ou d'arabinogalactane protéine (AGP) pourraient être impliquées dans ces phénomènes. Les données complémentaires suggèrent que les chaînes latérales de galactanes sont importantes pour l'adhésion du tube pollinique et que ni le backbone du RG-I ni le RG-II purifié ne permettent leurs adhésions. De plus, des pectines commerciales de citron sont aussi capables d'induire l'adhésion des tubes. Cette adhésion est perdue lorsque ces pectines de citron, majoritairement composées d'HG sont digérées par une endopolygalacturonase. Des analyses complémentaires de ces extraits (pectines de citron et extraits imidazole de feuilles) digérés après chromatographie d'exclusion stérique ont néanmoins révélé que des fractions de haut poids moléculaires (PM) mais aussi de PM intermédiaires (au minimum 10 kDa) conservaient des propriétés adhésives mais moins importantes que l'extrait de départ suggérant que peut-être plusieurs fractions sont nécessaires pour promouvoir une adhésion optimale.



# Deconstruction of a polysaccharide-enriched matrix promoting *Arabidopsis thaliana* pollen tube adhesion *in vitro* using an enzymatic approach

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, pollen tube, cell adhesion, cell wall, pectin deconstruction

## INTRODUCTION

Cell-cell adhesion is a common mechanism in all biological systems and is promoted by the extracellular matrix (ECM). This ECM is also an interface in cell-cell signalling (Brownlee, 2002). The ECM is present in both animals and plants (Wyatt and Carpita, 1993), the first one is mainly composed of glycoproteins and the second one is mainly composed of polysaccharides (Cassab, 1998; Borner et al., 2003; Albersheim et al., 2010; Lee et al., 2011; Albenne et al., 2013). While the adhesion of animal cells is well described in the literature (Harwood and Coates, 2004), plant cell adhesion remains unclear.

Three different adhesion mechanisms have been described in plant cells: between the cell walls of two cells, between the cell wall and the plasma membrane and a more dynamic adhesion process by the contact *de novo* between two cells. This last one occurs during sexual plant reproduction (Lord et al., 1996).

Polysaccharides (mainly cellulose, hemicellulose and pectins) represent about 90% of the cell wall mass (Albersheim et al., 1996), while the 10% remaining are made of structural and polysaccharide-modifying proteins/glycoproteins (Albersheim et al., 1996). Cell wall polysaccharides are synthesized either at the plasma membrane (cellulose) or in the Golgi apparatus and delivered *via* the secretory pathway (Moore and Staehelin, 1988; Lerouxel et al., 2006; Toyooka et al., 2009; Kang et al., 2011; Worden et al., 2012; Kim and Brandizzi, 2014). In *A. thaliana* leaves, 50% of the cell wall polysaccharides are pectins. Pectin polysaccharides are galacturonic acid (GalA)-enriched polymers and composed of three major motifs or domains: homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG-I), and rhamnogalacturonan-II (RG-II) (Zabackis et al., 1995; Liepman et al., 2010). HG consists of linear chains of  $\alpha$ -(1-4)-D-GalA, which can be methyl- and/or acetyl-esterified. RG-I domain has been described as a large subunit composed of the repeating disaccharide backbone of  $\alpha$ -(1-4)-D-GalA- $\alpha$ -(1,2)-L-rhamnose (Rha) with a wide variety of side chains containing galactosyl (Gal) and arabinosyl (Ara) residues attached to the Rha (O'Neill et al., 1990), while RG-II is composed of an  $\alpha$ -(1-

4)-D-GalA backbone branched with 4-5 complex side chains containing more than 10 different glycosyl residues, including unusual sugars such as aceric acid and Kdo (Mohnen, 1999; Atmodjo et al., 2013; Mohnen, 2008).

In general, plant cells maintain a fixed position attached to their neighbours during their development by sharing a cell wall interface, the middle lamella. The cell wall is built during cell division when a cell plate is formed between two dividing cells resulting from a massive exocytosis of HG-enriched pectin-containing vesicles (Dhonukshe et al., 2006; Reichardt et al., 2007; Miart et al., 2014; Drakakaki, 2015; Daher and Braybrook, 2015). Newly delivered HGs are highly methylesterified which makes them more fluid. The activity of cell wall-modifying enzymes such as pectin methylesterases (PMEs) removes the methyl groups of HG. De-esterified HGs can then be readily cross-linked by calcium leading to a stiffer material or can be digested by HG degrading enzymes, such as polygalacturonase, thus modifying the mechanical properties of the cell wall. Modification of pectins affects its ability to form a gel and act as a glue between cells (Micheli, 2001; Willats, 2001; Peaucelle et al., 2011; Braybrook et al., 2012). The middle lamella is the major physical mediator of cell attachment and separation. HG, in its de-esterified or low esterified form, is found in the middle lamella and in the corners of cell junctions (Bush et al., 2001; Parker et al., 2001; McCartney and Knox, 2002; Guillemain et al., 2005; Daher and Braybrook, 2015) suggesting its role in cell attachment.

The involvement of pectins in cell attachment was highlighted using different mutants altered in pectin biosynthesis. *Quasimodo1* (*qua1*) is dwarf and showed a defect in cell adhesion as well as a reduction of 25% in GalA content compared to the wild-type. *QUA1* encodes a putative galacturonosyltransferase belonging to the GT8 family. In this mutant, the reduction of cell adhesion was observed in hypocotyls, vascular tissues, callus and root border-like cells (Bouton et al., 2002; Leboeuf et al., 2005; Orfila et al., 2005; Durand et al., 2009). *Quasimodo2* (*qua2*), another mutant displaying cell adhesion defect, showed 50% reduction in GalA compared to the wide-type. *QUA2* encodes a putative pectin methyltransferase (Mouille et al., 2007). Another gene, *ESMERALDA1* (*ESMD1*), that encodes a putative *O*-fucosyltransferase, was identified in a suppressor screen of cell adhesion defect. *Esmda1* restored the phenotype of the mutants *qua1* and *qua2* without restoring the GalA content in the cell wall (Verger et al., 2016). *Friable 1* (*frb1*), showed a defect in cell adhesion and was isolated using a screen of T-DNA insertion lines. In *Frb1*, the content of arabinosyl- and galactosyl-containing oligosaccharides in the Golgi was affected and the mutation has pleiotropic effect on the cell wall: alteration of pectin methylesterification, cell wall associated extensins and xyloglucan

microstructure (Neumetzler et al., 2012). Verger et al. (2016) presented a model summarizing the possible role of *qua*, *esmd1* and *frb1* in the control of cell adhesion. The authors concluded that the cell wall adhesion defect in *qua* was not due to the reduction of HG content but that this decrease may produce a signal inducing or suppressing the cell adhesion defect.

HGs have also been implicated in cell adhesion in *emb30* (*embryo defective30*) or *gnom* mutant which showed an easier cell separation than the wild-type mainly due to an abnormal location of weakly methylesterified HG. In this mutant, the weakly methylesterified HGs were mainly located in the interstitial space between cells whereas in the wild-type tissue, the weakly esterified HGs were located in the middle lamella (Shevell et al., 2000; Ridley et al., 2001). Moreover, Arabidopsis plants overexpressing pectin methylesterase inhibitors (PMEI), AtPMEI-1 or AtPMEI-2, or knock out for a Pectin Methyl Esterase (*pme3*), displayed an increased efficiency for isolation of viable mesophyll protoplasts due to the reduction of cell attachment (Lionetti et al., 2015). Finally, The mutant *tumorous shoot development 2* (*tsd2*), coding a putative PME showed also a loss of cell adhesion (Frank et al., 2002; Krupková et al., 2007) suggesting that HG and its remodeling affect directly or indirectly cell attachment.

Another polysaccharide, belonging to the pectin family, namely RG-I, and more precisely the RG-I side chains, have been implicated in cell adhesion. In fact, the mutation in *ECTOPICALLY PARTING CELLS 1* (*ECPI*), a member of the GT64 family, resulted in a reduction of cell-cell adhesion properties in hypocotyls and cotyledons cells and were accompanied by a decrease of the Gal content in the cell wall (Singh et al., 2005). In other mutants with modified arabinogalactan side chains such as *nolac-H14* (*non-organogenic callus with loosely attached cells*) (Iwai et al., 2001) or *cnr* (*coloreless non-ripening*) (Orfila et al., 2001, 2002), a decrease of cell adhesion was also observed.

Another cell wall component has also been implicated in cell-cell adhesion. In fact, Arabinogalactan proteins (AGPs), a class of Hyp-rich glycoproteins highly *O*-glycosylated, containing arabinogalactan type II motifs and attached to the plasma membrane by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Nothnagel, 1997; Gaspar et al., 2001; Showalter, 2001; Schultz et al., 2002) are known to be involved in developmental regulation of plasma membrane in flowers, embryos and roots (Knox et al., 1991; Pennell et al., 1991). Such processes may involve cell-cell interactions in which these plasma membrane-anchored AGPs may act as cell adhesion molecules capable of binding cell wall ligands such as pectins or arabinoxylans (Pennell et al., 1991; Showalter, 2001; Johnson et al., 2003).

During plant sexual reproduction, a *de novo* adhesion occurs between two cells. Pollination begins when the pollen grain lands on the stigma. This interaction depends mainly on the nature of the stigma surface, that can be classified in two categories : wet or dry stigma, depending on the presence or absence of a copious stigmatic exudates (Heslop-Harrison, 2000; Sun et al., 2000; Swanson et al., 2004). Pollen grains can adhere to wet stigmas but it appears to be not specific and more permissive than plants with dry stigmas (Heslop-Harrison, 2000; Swanson et al., 2004). Indeed, specific interactions occur between pollen grains and dry stigma. The initial adhesion step is rapid (30 s) and species-specific involving pollen exine. The nature of the interaction between the exine and the stigma is not known, but may involve hydrophobic interactions (Zinkl et al., 1999). After this first contact on the stigmatic papilla initiated by exine, the pollen coat migrates from the exine surface onto the stigma called ‘pollen coat conversion’ forming an attachment foot. The cell wall glycoproteins of the stigmatic papillae are also involved in this process (Kandasamy et al., 1994; Luu et al., 1999). The maximum adhesion is obtained 30 min after the initial pollen capture and this adhesion is described as “late” (Zinkl et al., 1999; Mollet et al., 2007). This specific interaction can be mimic on leaves. Wolters-Arts et al. (1998) have shown that pollen tubes can grow on and penetrate the cell wall of young leaves in the presence of trilinolein as a substitute for stigma exudate.

Up to date, only few studies on pollen tube adhesion were carried out, mostly on lily, with the development of an *in vitro* adhesion bioassay using a matrix isolated from the style (Jauh et al., 1997). Two molecules were isolated and were shown to be required for pollen tube adhesion: a large pectin polysaccharide composed mainly of weakly methylesterified HG and a small protein of 9 kDa, called stigma/stylar cysteine-rich adhesin (SCA) displaying some similarity with lipid transfer proteins (Park et al., 2000; Mollet et al., 2000; Lord, 2000; Park and Lord, 2003).

In this work, we developed an *in vitro* adhesion bioassay, in 96 well-plates for *A. thaliana* pollen tubes, using different cell wall extracts from *A. thaliana* leaves as a matrix. In order to determine the minimum pectin structure required for pollen tube adhesion, the adhesive imidazole extract and commercial lemon pectins were used and deconstructed with different enzymes. *Endo*-(1,4)- $\alpha$ -polygalacturonase and *endo*-(1,4)- $\beta$ -galactanase treatments of commercial pectins and imidazole extract totally or partially disrupted pollen tube adhesion. These results pointed out that (1) *A. thaliana* pollen tubes are capable of adhering on pectins from diverse origins (species and organs) and (2) suggested that the side chains, especially galactans, and a minimum molecular weight of the polymers are necessary for pollen tube

adhesion. Finally, we cannot exclude that other component may be involved as the adhesive fractions of the imidazole extract before and after size exclusion chromatography showed reduced rate of adhesion, but further investigation are needed to verify this.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant growth conditions**

Seeds of *A. thaliana* Col-0 (stored at 4°C) were spread on the surface of sterilized soil and cultivated in growth chambers in long-day conditions (16 h light/8 h dark at 20°C/16°C, respectively) and 60% relative humidity. Plants were watered every 3 days.

### **Pollen tube culture**

Pollen grains were germinated in liquid germination medium (GM) containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.01% (w/v) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, and 10% (w/v) sucrose, pH 7.5 as described by Boavida and McCormick (2007). Briefly, 40 flowers (in 1.5 mL plastic tube) were submerged in 1 mL of GM. Tubes were shaken with a vortex to release the pollen grains from the anthers. Flowers were removed with a pair of tweezers and pollen suspension was then centrifuged at 4000g for 7 minutes. New GM was added to the pellet and pollen were transferred in 96-well plates (ThermoFisher®) and grown at 22°C in the dark.

### **Adhesion assay and microscope observation**

The cell wall extracts were solubilized in mQ water at 1 mg.mL<sup>-1</sup> and centrifuged for 5 min at 2000 g. Seventy µL of the supernatant were deposited in each well and the plate was placed at 22°C for 36 h for water evaporation, leaving a thin homogenous layer of matrix at the bottom of the wells. Pollen grains from 5 flowers was suspended in 200 µL of GM and deposited in each well. The plate was closed and sealed with a parafilm to avoid evaporation and incubated at 22°C for 6 h for pollen germination and pollen tube growth.

An inverted microscope Leica DMI 6000B was used to observe pollen tube adhesion under bright field. After 6 h, four pictures were acquired in the center of each well containing adherent and non adherent pollen tube on the matrix. Then, the wells were emptied by turning up side down the plate and each wells were rinsed twice under a trickle of water by maintaining a 45° angle between the plate and the water flow and by emptying the plate each time. The plate, containing the adherent pollen tube, was then observed again with an inverted microscope and four picture were acquired in the center of each well.

The program ImageJ (Abràmoff et al., 2004) was used to estimate pollen tube adhesion rates, that represent the percentage of the number of pollen tubes that remained adhered to the matrix after rinsing divided by the number of pollen tubes that were counted on the surface of the matrix before rinsing.

### **Alcohol insoluble residue (AIR) extraction**

*A. thaliana* Col-0 5-week-old leaves or freshly open flowers were submerged in 70% ethanol and stored at 4°C. Ethanol was eliminated by filtration and leaves or flowers were first grind by a handheld homogenizers then with a pestles in a glass potter in ethanol 70%. The mixture was then centrifuged 10 min at 3200 g. The pellet was washed several times with 70% ethanol at 70°C up to the discoloration of the solution. The insoluble material was similarly treated with a mixture of methanol/chloroform (v/v) under agitation and acetone. After centrifugation the pellet (AIR) was dried under a fume hood.

### **Polymer extraction for the preparation of the matrix**

As described by Ray et al., (2004), a pectin-enriched fraction was obtained from the AIR by extraction with boiling ammonium oxalate 0.5% (w/v) for 1 h. After centrifugation, the supernatant was dialyzed (3.5 kDa cut off) against mQ water and freeze dried.

Alternatively, 100 mg of AIR were incubated with 500 mM imidazole-HCl pH 7 overnight under agitation (Mollet et al., 2000). The process was repeated once and the two imidazole-HCl extracts were pooled and dialyzed (3.5 kDa cut off) against mQ water and freeze-dried.

The ammonium oxalate-insoluble or the imidazole-HCl-insoluble residues were treated with 4 M KOH supplemented with 20 mM NaBH<sub>4</sub> at room temperature for 12 h. The alkaline-soluble fraction was acidified to pH 5.5 with glacial acetic acid, dialyzed (3.5 kDa cut off) against mQ water and freeze dried to yield the hemicellulose-enriched fraction and the insoluble remaining material yielded the cellulose-enriched fraction.

Non-adherent mucilage was extracted from *A. thaliana* seeds as described by Macquet et al., (2007). Briefly, 2 g of Col-0 seeds and 20 mL of mQ water were mixed head-over-tail overnight at 4°C. The suspension was vortexed then centrifuged and seeds were rinsed with mQ water. The supernatants and the washes were pooled, filtered, dialyzed (3.5 kDa cut off) then freeze-dried.

Commercial lemon pectin with different degrees of methylesterification (DME): 85, 67, 62 and 8.6% (Sigma®) were also tested.

Purified RG-II from grapes was kindly given by Marie-Christine Ralet (French National Institute of Agronomy, Nantes, France).

### **Removal of starch**

In order to assess the possible implication of the contaminating starch in the adhesion process, 20 mg of AIR were treated twice with 100 mL of DMSO at 90% for 24 h. The treated AIR was recovered by centrifugation, dialyzed (3.5 kDa cut off) against mQ water. The imidazole extract from DMSO-treated AIR was incubated or not with an  $\alpha$ -amylase (5U, *Aspergillus oryzae*, EC 3.2.1.1) prepared in 100 mM sodium acetate buffer, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 5.1. After incubation overnight at 40°C under agitation at 180 rpm, the enzyme was inactivated (10 min at 95°C), dialyzed (3.5 kDa cut off) against mQ water then freeze-dried.

### **Determination of the DME in the imidazole extract**

The DME was determined by quantifying the methanol released after the hydrolysis of methyl groups on GalA of pectins and comparing the results to a standard curve according to Klavons and Bennett (1986) with some modifications. The standard curve was obtained with a solution of methanol 0.01 mg.mL<sup>-1</sup>. Different volumes of this solution corresponding to the different concentrations of methanol were placed in different tubes (Table 7). 1 U.mL<sup>-1</sup> of alcohol oxydase was added, mixed gently and incubated at 25°C for 20 min. The colorimetric determination was carried out after incubation for 15 min at 60°C with 20 mM 2,4-pentanedione, 2 M ammonium acetate and 50 mM acetic acid. Pentanedione reacted with the formaldehyde and formed a yellow compound detectable at 412 nm.

**Table 7 :** Preparation of the standard for the determination of the degree of methylesterification (DME) of the imidazole extract

Methanol 0.01mg.mL <sup>-1</sup> (μL)	10	12.5	25	50	100	200
Methanol (μmole)	0.00312	0.00390	0.00781	0.01562	0.03125	0.0625
Phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 (μL)	240	237.5	225	200	150	50
Alcohol oxydase 1 U.mL <sup>-1</sup> (μL)	250 (20 min at 25°C)					
20 mM 2,4-pentanédione 2 M ammonium acetate and 50 mM acetic acid (μL)	500 (15 min at 60°C)					

Three solutions of imidazole extract were prepared: 0.7, 0.4 et 0.2 mg.mL<sup>-1</sup>. 4 mL of each solution were incubated with 4 mL of KOH 1 M at room temperature during 1 h to release methyl groups by forming methanol. The pectin hydrolysate was neutralized to pH 7.4 by adding 910 μL of phosphoric acid at 1 M. The volume was completed to 16 mL with mQ water. Methanol production of 250 μL of the hydrolyzed pectin were then analyzed as describe above. The percentage of esterification was expressed as the percentage of methylester related to the GalA content determined by GC-FID..

### Enzyme treatments

Imidazole extract or commercial pectins were treated with several enzymes: *endo*-(1,4)- $\alpha$ -polygalacturonase (*Aspergillus aculeatus*, EC 3.2.1.15), *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase (*Aspergillus niger*, EC 3.2.1.99),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (*Aspergillus niger*, EC 3.2.1.55), *endo*-(1,4)- $\beta$ -galactanase (*Aspergillus niger*, EC 3.2.1.89) and  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus niger*, EC 3.2.1.23) (Megazyme, Ireland). Five mg of imidazole extract or lemon pectins were solubilized in 5 mL of sodium acetate buffer (10 mM, pH 4.1) and 5 U of enzyme was added and incubated overnight at 40°C under agitation at 180 rpm. Enzymes were inactivated (10 min at 95°C) and the solution was dialyzed (3.5 kDa cut off) against mQ water and freeze-dried.

### Gas chromatography

Monosaccharide composition was determined according to York et al. (1986) with some modifications using inositol as an internal standard. Briefly, 600 mg of material was treated with 2 M trifluoroacetic acid for 2 h at 110°C to release free monosaccharides and then with 1 M methanol-HCl at 80°C for 16 h to convert free monosaccharides to their methylglycosides.



After silylation at 110°C for 20 min, samples were dried, dissolved in cyclohexane and analyzed using a GC 3800 Varian GC system equipped with a DB1 capillary column and a flame ionization detector. A temperature program optimized for separation of most common cell wall monosaccharides (Ara, Fuc, Gal, GalA, Glc, GlcA, Man, Rha, Xyl) was used. Data were analyzed and integrated using Varian GC Star Workstation software, with the quantity of each monosaccharide corrected according to its response factor.

### **Determination of the level of the different domains**

The estimation of HG and RG-I backbone and side chains that may come from either RG-I and/or AGP was described in (M'sakni et al., 2006; Yapo, 2011; Koffi et al., 2013).

Proportion of HG  $HG (\%) = GalA (\%) - Rha (\%)$

Proportion of RG-I backbone  $RG-I \text{ backbone } (\%) = Rha (\%) \times 2$

Proportion of RG-I/AGPs side chains  $RG-I/AGP \text{ side chains } (\%) = Ara (\%) + Gal (\%)$

### **Immunoblot labeling**

Untreated imidazole extract and imidazole extract treated with *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase were blotted onto nitrocellulose membranes. Immunodot-blotting was processed according to Dardelle et al., (2010). Arabinan from sugar beet (*Beta vulgaris*; Megazyme) was used as a positive control. Monoclonal antibodies used were: LM6, LM13 and LM16 that recognize pentasaccharide in (1-5)- $\alpha$ -L-arabinans, long linear epitopes in (1-5)- $\alpha$ -L-arabinans and an epitope associated with arabinans (that may involve galactosyl residue), respectively (Willats et al., 1998; Moller et al., 2007; Verhertbruggen et al., 2009). Monoclonal antibodies binding was revealed with an anti-rat IgG antibody conjugated with alkaline phosphatase (Sigma) diluted 1:1000 and developed with the nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate kit (Promega).

### **Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis (PACE)**

PACE analysis consists on the derivatization of reducing ends of sugars and/or oligosaccharides with a fluorophore, followed by electrophoresis on polyacrylamide gels. PACE was assessed as described by Goubet et al., (2002) with some modifications. First, sugar derivatization was performed with ANTS (8-AminoNaphthalène-1,3,6 Tri Sulfonic acid, Sigma®), a fluorophore prepared in 0.1 M acetic acid/water (3:17) (v/v). Two ladders were prepared either by hydrolyzing a dextran (10 kDa) with 2 M TFA for 2 h at 80 °C (MAHD) or lemon pectin with 85% DME with 2 M TFA for 2 h at 80°C (MAHLP) and neutralized with NaOH.

1 mg of dried sample/ladder or 0.1  $\mu\text{mole}$  of the control monosaccharides (Glc, Ara, Gal, Rha and GalA) and a disaccharide (Mal = maltose) were dried in a vacuum concentrator. 5  $\mu\text{L}$  of ANTS and 5  $\mu\text{L}$  of  $\text{NaCNBH}_3$  were added.  $\text{NaCNBH}_3$  was prepared in 1 M anhydrous DMSO. All these solutions were freshly made and used immediately. The samples were centrifuged at 1500  $g$  for 1 min then incubated 5 h at 37  $^\circ\text{C}$  and dried in vacuum concentrator for 1 h. The samples were solubilized using 100  $\mu\text{L}$  of 6 M urea.

1.25  $\mu\text{L}$  of bromophenol blue at 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  prepared in water was added to 3.75  $\mu\text{L}$  of sample and deposited in a gel composed of 30% acrylamide (Table 8). Samples were run in a tris-borate buffer pH 8.2 at 100 V during 2 h. Gels were scanned using Imager Appligene under UV light and image acquisition was made with Biocapt (Vilbert lourmat) software.

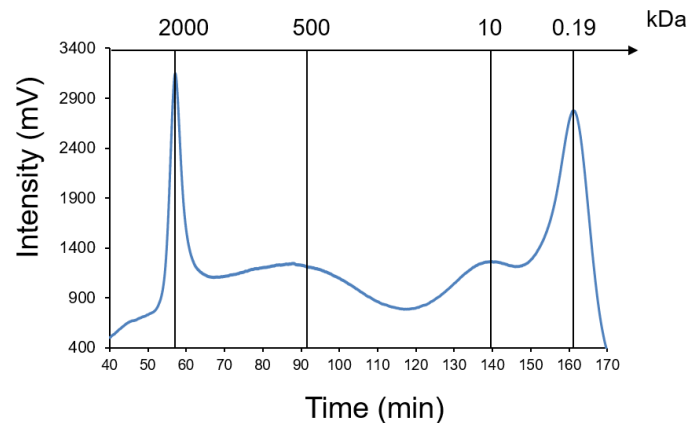
**Table 8 :** Composition of the concentration and migration acrylamide gels for PACE electrophoresis

Composition of the migration gel (30% acrylamide) for a volume of 5 mL	
Reagent	Volume
Tris-borate buffer 1 M pH 8.2	0.166 mL
mQ water	1.084 mL
Acrylamide solution (40% w/v)	3.75 mL
Ammonium PerSulfate (APS) (10% w/v)	25 $\mu\text{L}$
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	7 $\mu\text{L}$
Composition of the concentration gel (8% acrylamide) for a volume of 2 mL	
Reagent	Volume
Tris-borate buffer 1 M pH 8.2	0.058 mL
mQ water	1.42 mL
Acrylamide solution (40% w/v)	0.4 mL
Ammonium PerSulfate (APS) (10% w/v)	20 $\mu\text{L}$
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	10 $\mu\text{L}$

### Size exclusion chromatography (SEC)

Untreated and enzyme-treated extracts were solubilized in 50 mM ammonium formate pH 6.5 at 12.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  for the imidazole extract and 25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  for the lemon pectin and centrifuged at 2000  $g$  for 5 min. 100  $\mu\text{L}$  of supernatant were injected in the column (2.5 x 90 cm) containing a Sepharose CL-6B gel. The flow rate was fixed at 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  with a pump (UltiMate 3000 LC Systems, Thermo Fisher). The eluting fractions were detected with a refractometer (IOTA 2).

The data were collected with a software (Chromeleon 7.2 Chromatography Data System) and analyzed using Microsoft Excel. Fractions (10 mL) were collected (Pharmacia Biotech) for 170 min. The operation was repeated three times with the same sample and the corresponding fractions were pooled, dialyzed and freeze-dried. The column was calibrated with Dextran (2000, 500 and 10 kDa) and GalA (0.19 kDa) (Fig. 32).



**Figure 32 :** Size exclusion chromatography profile of dextrans (2000, 500 and 10 kDa) and GalA (0.19 kDa).

### Statistical analyses

Data were treated with R software (R Development Core Team, 2008) and represent the mean  $\pm$  SEM. Pairwise comparison were performed with the Dunnett's test according to parametric batch of dataset with equal variances or a Welch t-test according to parametric batch of dataset with unequal variances. Significant differences are marked with \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ . No significant differences are marked with NS ( $P > 0.05$ ).

## RESULTS

### *Pectin-enriched fractions are promoting pollen tube adhesion*

Cell wall polymers were first extracted from flowers. Based on the fact that very low amount of cell wall material can be extracted from flowers, leaves were also tested as a source of cell wall materials. Two methods were used to extract pectin-enriched materials (imidazole and ammonium oxalate). The hemicellulose-enriched and the insoluble fractions allowed a very low rate of pollen tube adhesion (2.3%) and only the pectin enriched-fractions were promoting pollen tube adhesion (Fig. 33a). Depending on the extraction method, different adhesion rates were observed. The ammonium oxalate extract induced a low pollen tube adhesion rate (13%)

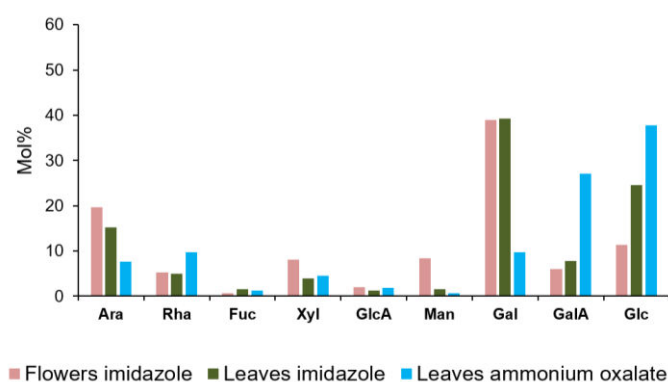
whereas a 2 to 3-fold increase of pollen tube adhesion rate was observed with the imidazole extracts from flowers. Similar results were obtained with the imidazole extract from leaves (31.1%) compared to the imidazole extract from flowers (39.4%).

a

**Adhesion rates of pollen tubes on different cell wall enriched-fractions from different organs**

Organs	Cell wall fraction	Extraction	Adhesion (%)
Flowers	Pectin-enriched	Imidazole	39.4
Leaves	Pectin-enriched	Imidazole	31.1
Leaves	Pectin-enriched	Ammonium oxalate	13.0
Leaves	Hemicellulose-enriched	KOH	2.3
Leaves	Insoluble material	-	2.3

b

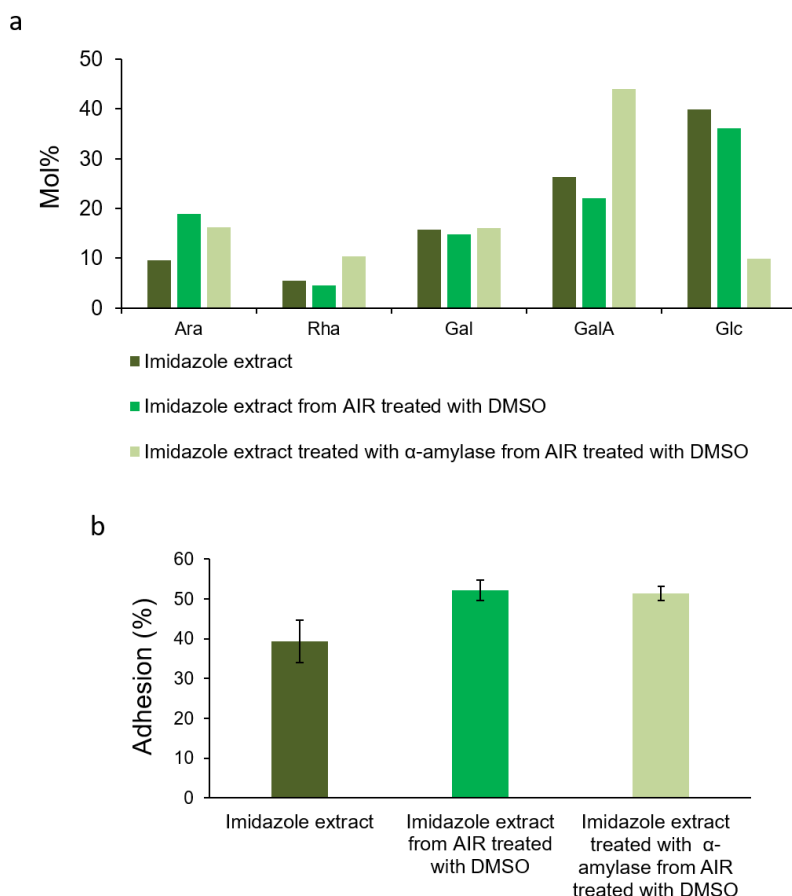


**Figure 33 :** Imidazole extracts are promoting pollen tube adhesion. (a) Adhesion rates of pollen tubes on different cell wall enriched-fractions. (b) Monosaccharide composition of the imidazole and ammonium oxalate extracts from leaves and flowers.

Monosaccharide composition of the imidazole extracts from flowers and leaves were similar (Fig. 33b) and presented higher levels of Gal (38.9 and 39.2 mol%) and Ara (19.6 and 15.2 mol%) than in the ammonium oxalate extract (9.7% and 7.6 mol%, respectively) that may originate from the side chains of RG-I and/or AGPs. In contrast, Rha and GalA levels were much higher in the ammonium oxalate extract (9.7 and 27 mol%, respectively) compared to the imidazole extracts (5.3 and 4.9 mol% for Rha and 6 and 7.8 mol% for GalA). Monosaccharide compositions of the imidazole and ammonium oxalate extracts showed low levels of Xyl, Fuc, GlcA and Man ranging between 0.7 and 8.3 mol% (Fig. 33b). But higher levels of Glc (more than the double) were observed in the imidazole and ammonium oxalate extracts from leaves (24.6 and 37.8 mol%) compared to the imidazole extract from flowers (11.3 mol%).

Glc was assumed to originate from starch and the imidazole extract treated with  $\alpha$ -amylase from DMSO-treated AIR induced a decrease of 30 mol% of Glc content (Fig. 34a). DMSO treatment has no effect on the Glc content in the imidazole extract (Fig. 34a). No

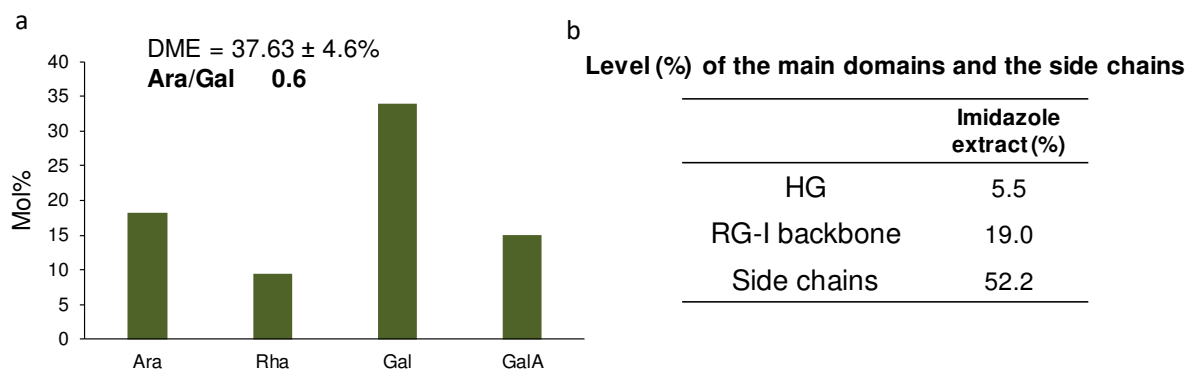
difference on pollen tube adhesion was observed using untreated or treated samples (Fig. 34b), suggesting that the content of starch did not impact pollen tube adhesion. Based on this, untreated AIR was used in the following experiments.



**Figure 34 :** Removal of starch in the AIR and in the imidazole extract did not disrupt the adhesive property of the imidazole extract. (a) Monosaccharide composition of the imidazole extract, imidazole extract from DMSO-treated AIR and imidazole extract treated with  $\alpha$ -amylase from DMSO-treated AIR. For clarity, only the main monosaccharides are shown. (b) Adhesion rates of pollen tubes on the imidazole extract, imidazole extract from DMSO-treated AIR and imidazole extract treated with  $\alpha$ -amylase from DMSO-treated AIR  $\pm$  SEM. AIR = Alcohol Insoluble Residue.

Finally, as imidazole extract from leaves promoted almost equal adhesion levels than the imidazole extract from flowers and larger amount of materials was obtained from the AIR of leaves (8.4% w/w), this fraction was further investigated, named imidazole extract and used as positive control. For clarity, the imidazole extract will represent 100% of pollen tube adhesion and the adhesion rates of the other fractions are expressed as a percentage of this control.

A new pool of imidazole extract was produced from leaves and was composed of Gal (34 mol%), GalA (15 mol%), Ara (18.3 mol%) and Rha (9.5 mol%) with an Ara/Gal 0.6 and a DME of  $37.6 \pm 4.6\%$  (Fig. 35a). This imidazole extract was mostly composed of RG-I and/or AGP side chains at 52.2% (Fig. 35b). This extract was similar to the previous imidazole extract (Fig. 35b) with high levels of Gal and Ara and a low level of Rha.



**Figure 35 :** Monosaccharide composition of (a) the imidazole extract showing the ratio of the Ara/Gal side chains and (b) the level (%) of the main pectin domains and the side chains that may come from either RG-I and/or AGP. DME = degree of methylesterification  $\pm$  SD. For clarity, only the four main sugars are shown.

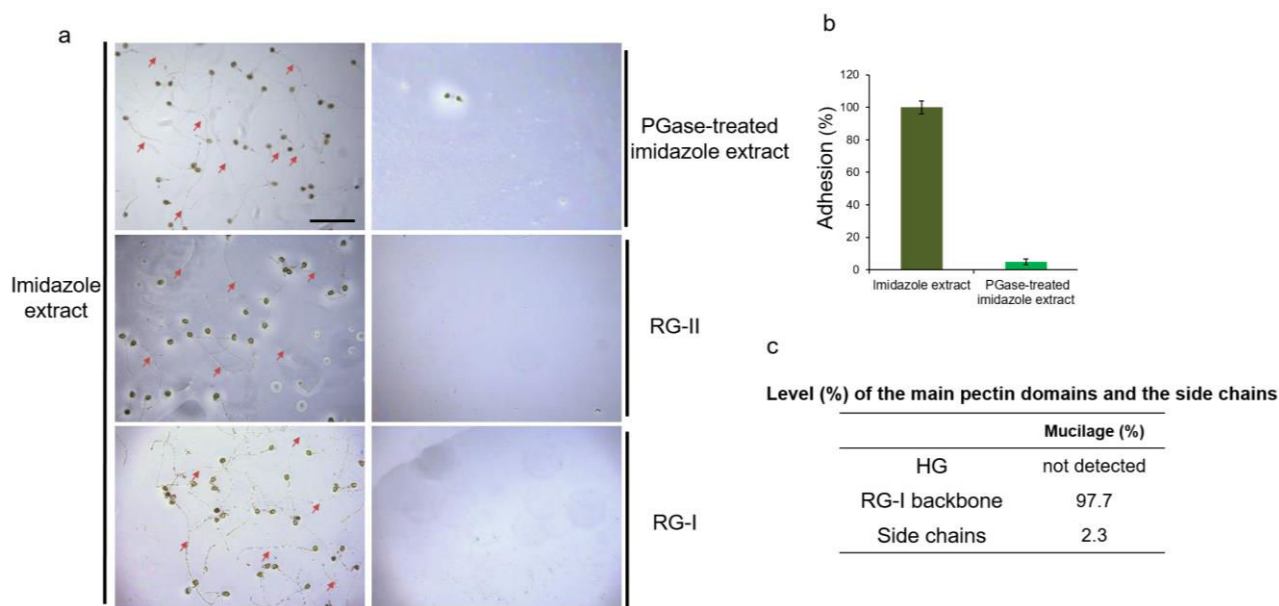
***PGase treatment disrupts pollen tube adhesion and RG-II alone and RG-I backbone do not promote pollen tube adhesion***

In order to assess if pectins were important for pollen tube adhesion, the imidazole extract was treated with PGase that cleaves stretches of de-methylesterified HG. Pollen tube adhesion on the PGase-treated imidazole extract completely vanished compared to the control (Fig. 36a and b).

To check if specific pectic domains may be involved in pollen tube adhesion, the structurally conserved RG-II was also tested on pollen tube adhesion. RG-II from grapes was purified after PGase treatment of pectin. RG-II was not able to promote pollen tube adhesion compared to the control imidazole extract (Fig. 36a) suggesting that RG-II alone cannot promote adhesion.

Another pectin domain was extracted with water from seed mucilage. The non-adherent seed mucilage is known to be composed most exclusively of non-substituted RG-I backbone (Macquet et al., 2007) (Fig. 36c). Size exclusion chromatography of the mucilage showed one major peak at high molecular weight (2000 kDa) (Fig. 37a) eluting at the same time (57 min)

as the adhesive fraction (F1) from the untreated imidazole extract (Fig. 37b). Adhesion assay with this extract did not promote pollen tube adhesion compared to the control (Fig. 36a). This result suggests that non-substituted RG-I backbone, despite its high molecular weight, is not involved in the interaction with pollen tubes in the adhesion process.

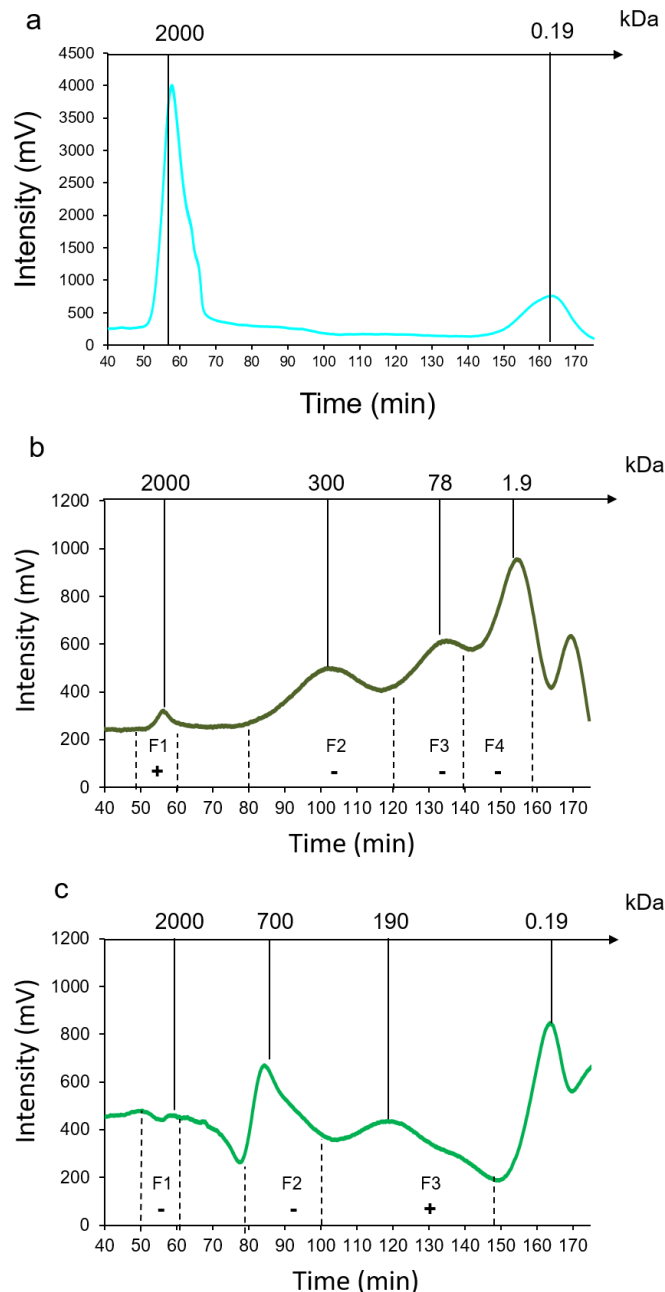


**Figure 36 :** PGase treatment disrupts pollen tube adhesion and RG-I backbone and RG-II alone do not promote pollen tube adhesion. Pollen tube remaining on 70  $\mu\text{g}$  of (a) PGase-treated imidazole extract, RG-II and RG-I backbone compared to their controls (imidazole extract). (b) Adhesion rates of the PGase-treated imidazole extract. (c) Level (%) of the main pectin domains and side chains based on the monosaccharide composition of the seed mucilage. Red arrows show pollen tubes remaining on the matrix. Scale bare = 200  $\mu\text{m}$ .

All these data are suggesting that pectins and more precisely HG domains may be important for pollen tube adhesion. However, we cannot rule out that other domains may be involved and that the PGase treatment has just altered the integrity of the pectin polymers.

Imidazole and PGase-treated imidazole extracts were separated on a Sepharose CL-6B SEC and different fractions were collected. The imidazole extract was separated in four fractions (F1 to F4). A minor F1, with high MW estimated at 2000 kDa and 3 others estimated at 300, 78 and 1.9 kDa. Only the F1 induced pollen tube adhesion (Fig. 37b). It is noteworthy that this adhesive F1, that possessed an adhesion rate estimated between 30 and 60%, was not as adhesive as the starting imidazole-extract (100%) suggesting that a component of unknown nature eluted in the non-adhesive fractions may increase the adhesion of pollen tubes. PGase-treated imidazole extract was separated in 4 fractions, one very minor at 2000 kDa and the

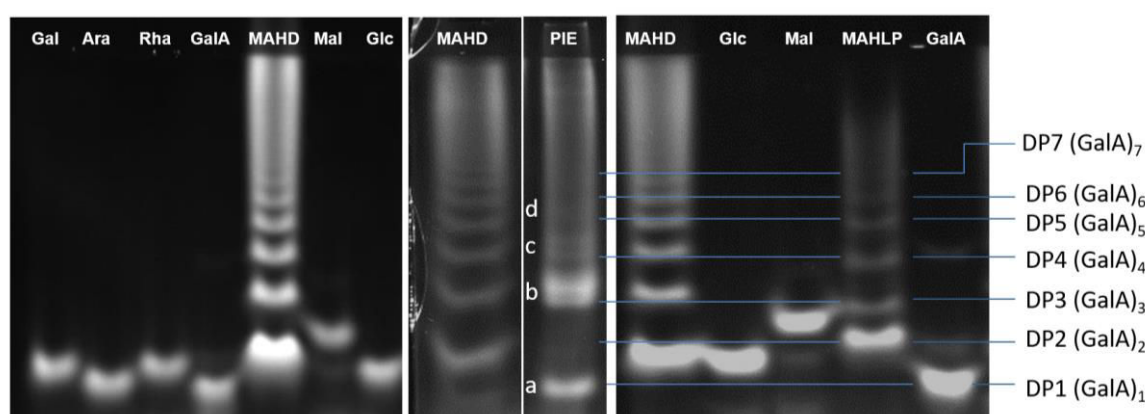
appearance of 3 new peaks revealing a shift with the MW at 700, 190 and 0.19 kDa, the latest corresponding to the MW range of GalA (Fig. 37c). The high MW F1 that was partially adhesive in the untreated sample was no longer after PGase treatment. Instead, F3 with an estimated MW of 190 kDa was partially promoting pollen tube adhesion while the larger fraction F2 was not. This data suggest that the full size of the polymers may not be necessary to induce pollen tube adhesion.



**Figure 37 :** Size exclusion chromatography of (a) *A. thaliana* seed mucilage, (b) untreated imidazole extract and (c) imidazole extract treated with PGase. Collected fractions (F) are separated by two dashed lines. - = adhesion rate estimation (<5%), + = adhesion rate estimation (30<x<60%) and ++ = adhesion rate estimation (80<x<120%).



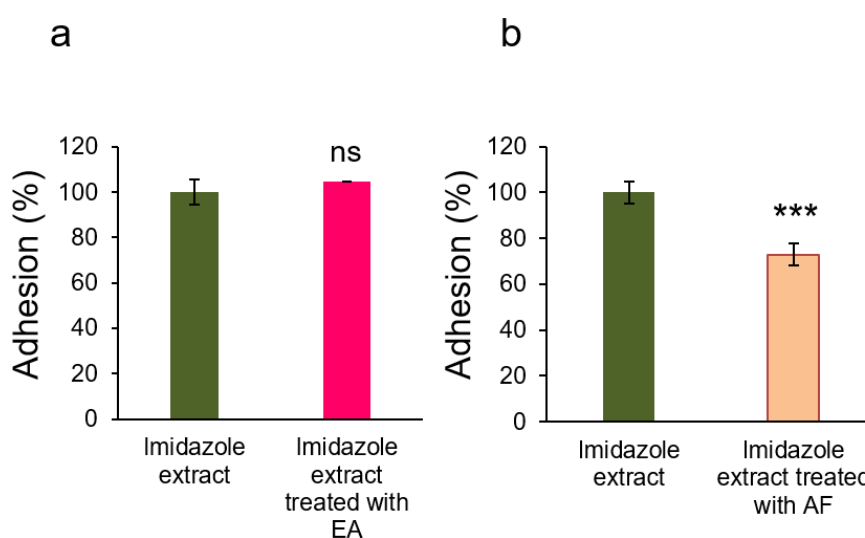
The degradation of the imidazole extract by PGase was further confirmed by PACE. The different standards migrated at distinct positions in the front of the electrophoresis gel with GalA migrating the farthest (Fig. 38). The control lemon pectin with 85% DME hydrolyzed with TFA and neutralized with NaOH showed bands ranging from DP2 to DP7 corresponding to unmethylated oligoGalA, due to the saponification of the hydrolysate with NaOH. The absence of DP1 may be due to the moderate hydrolysis. The different bands observed with the TFA-treated lemon pectin did not correspond to the TFA-hydrolyzed dextran composed of oligoGlc. Indeed, the mono- or oligosaccharide compositions and the DME of the oligoGalA also are influencing the migration in the gel (Goubet et al., 2002, 2003; Barton et al., 2006). In the PGase-treated imidazole extract, distinguishable bands ranging from DP1 (GalA) to DP5 were detected. DP1 and a large band at the level of DP3 of MAHLP were detected. We can assume that DP1 of the PGase-treated imidazole extract is a GalA without methylester group (Fig. 38a). The large band at DP3 appeared to be composed of two not well resolved bands. The lowest one migrates at the same level as the DP3 of MAHLP and may correspond to (GalA)<sub>3</sub> with no methyl group. The highest one that migrates between DP3 and DP4 of MAHLP may corresponds to a (GalA)<sub>3</sub> with methyl group(s) as the presence of this substitution reduces the migration in the gel. Similarly, two weak bands were visible at DP4 (Fig. 38c) and between DP4 and DP5 and two others at DP5 (Fig. 38d) and between DP5 and DP6 suggesting again the presence of (GalA)<sub>4</sub> and (GalA)<sub>5</sub> and the two intermediate bands with methylester groups. To confirm these results other oligosaccharides standard need to be tested, specifically purified oligoGalA with known DP and DME.



**Figure 38** : PACE analysis of the imidazole extract treated with PGase. Separation of standards : monosaccharides (Gal, Ara, Rha, GalA and Glc), a disaccharide Mal (maltose) and ladders (mild acid hydrolysis of dextran= MAHD or mild acid hydrolysis of lemon pectin with 85% DME = MAHLP). Separation of the degradation products of the PGase treated imidazole extract (PIE). DP = degree of polymerization. a, b, c, d represented different bands observed on the gel.

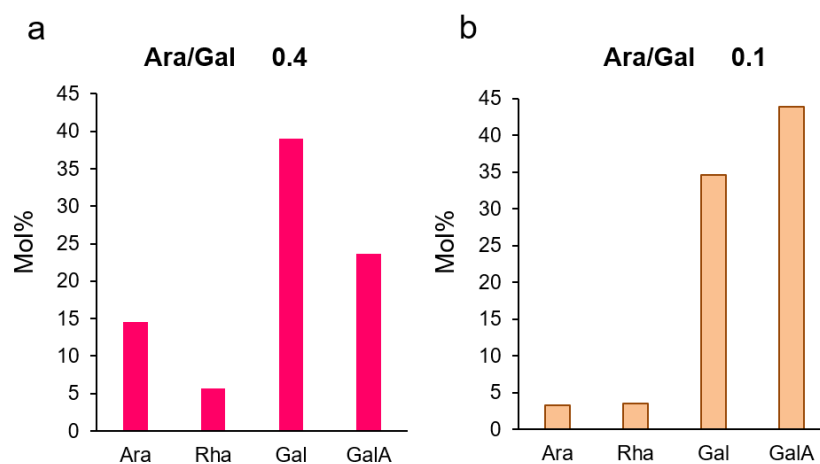
### ***Endo-arabinanase and arabinofuranosidase treatments did not affect pollen tube adhesion***

To determine the role of the side chains that may come from RG-I and/or AGPs, different enzymes were used including the *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase. The adhesion rate of the treated imidazole extract (104%) did not statistically differ from the control (100%) (Fig. 39a). The monosaccharide composition of the untreated control and the imidazole extract treated with arabinanase showed a slight reduction of the Ara level in the treated extract (14.5 mol%) compared to the control (18.3 mol%) and the ratio of Ara/Gal decreased from 0.6 (untreated) (Fig. 35a) to 0.4 (treated) (Fig. 40a).



**Figure 39 :** *Endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase treatment of the imidazole extract did not modified pollen tube adhesion but  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase partially reduces pollen tube adhesion.

Adhesion rates of pollen tubes on the imidazole extract (a) treated with *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase and (b) treated with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Data represent the mean of three biological replicates  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences (\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  and ns (not significant)  $P > 0.05$ ) from the control according to Welsh t-test analysis for EA treatment and pairwise comparison using Dunnet's test analysis for AF treatment with R software. EA = *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase. AF=  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

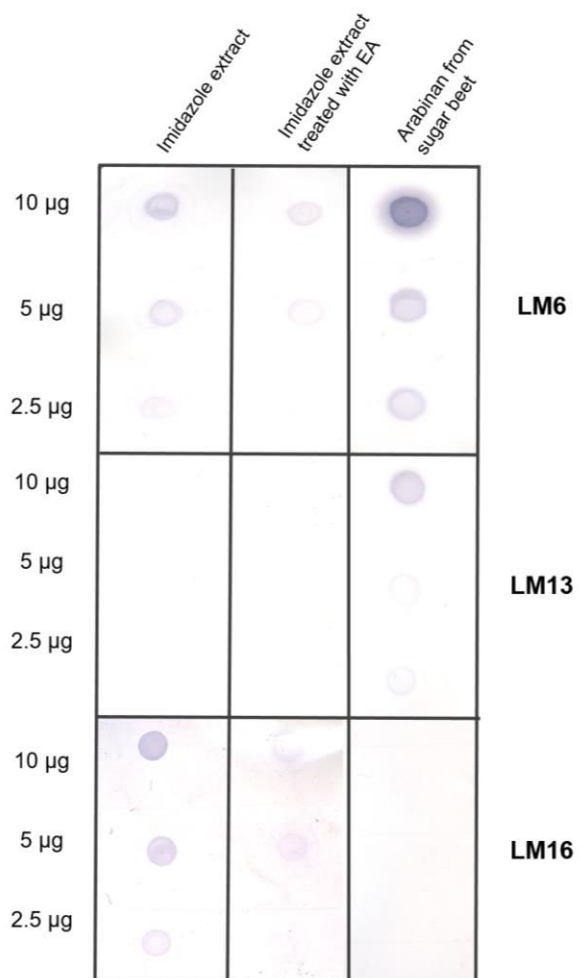


**Figure 40 :** Monosaccharide composition of the imidazole extract (a) treated with *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase and (b) with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase showing the ratio of the Ara/Gal side chains. For clarity, only the four main sugars are shown.

To further investigate the effect of arabinanase treatment on the arabinan side chains, dot-blot assays using LM6, LM13 and LM16 antibodies were performed with three different amounts of treated and untreated extracts (2.5, 5 and 10  $\mu$ g). The dot-blot showed a decrease of the labelling with LM6 and LM16, compared to the untreated extract confirming the partial cleavage of the arabinan side chains (Fig. 41) that recognizes epitopes of arabinans associated with galactosyl residue. With LM13 that recognizes epitopes of long arabinan side chains, no labelling was observed in both treated and untreated extracts. This data suggests that the imidazole extract is composed of short arabinan side chains associated with galactosyl residues.

The arabinan side chains were also hydrolyzed with arabinosidase. The adhesion rates showed a significant but partial decrease between the control and the treated imidazole extract (72.87%) (Fig. 39b). The monosaccharide composition showed a strong decrease in the Ara content in the treated extract (3.3 mol%) compared to the control (18.3 mol%) impacting the Ara/Gal ratio which decreases from 0.6 (Fig. 35a) in the control to 0.1 in the arabinosidase treated sample (Fig. 40b).

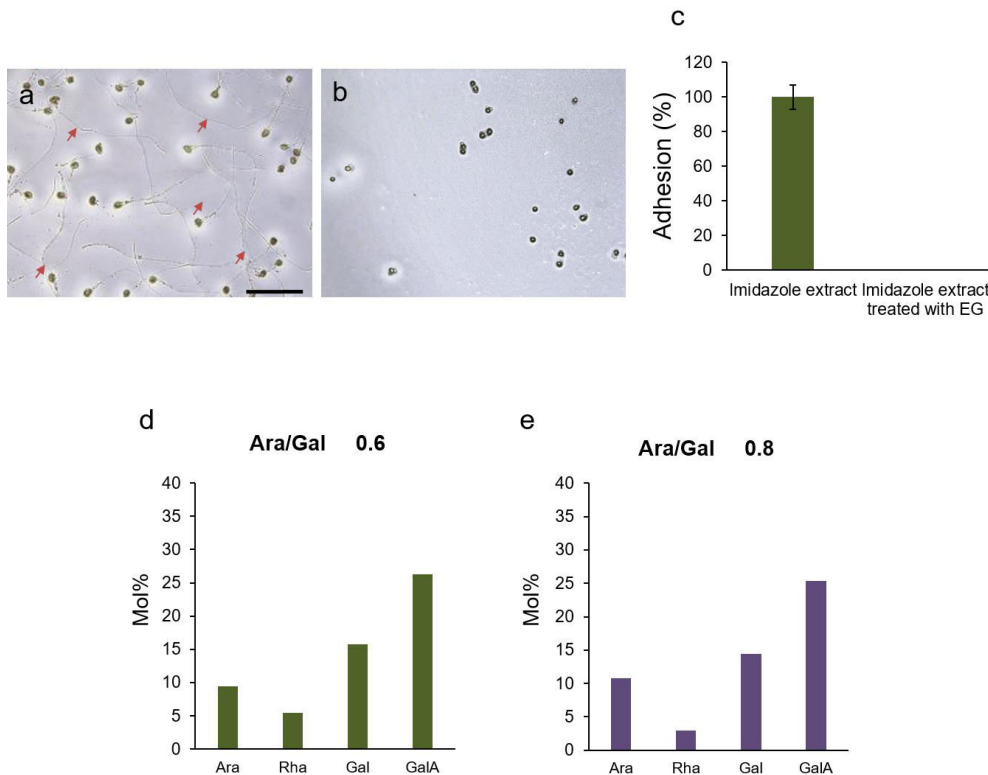
After *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase treatment, the Ara/Gal ratio decreased from 0.6 to 0.4 without affecting pollen tube adhesion. But with arabinosidase, the ratio decreased more drastically to 0.1 with a significant but only partial disruption of pollen tube adhesion. These results taken together may indicate that arabinan side chains are not capitals for the adhesion property of the imidazole extract but may participate in the adhesion process.



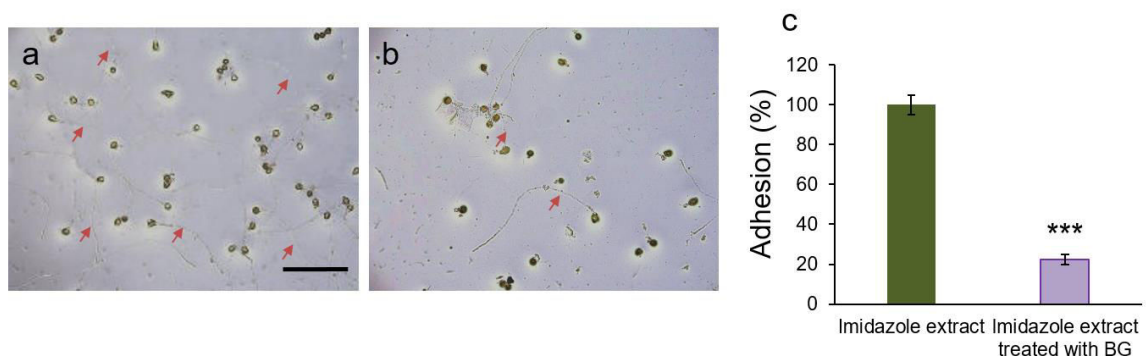
**Figure 41** : Immunoblot labeling of the untreated and treated with *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase imidazole extracts using LM6, LM13 and LM16. EA = *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase.

### ***Endo-galactanase and $\beta$ -galactosidase treatments disturb pollen tube adhesion***

Galactanase treatment of the imidazole extract totally disrupted the pollen tube adhesion compared to the control, with no pollen tube remaining on the matrix (Fig. 42a-c). Gal content slightly decreased (14.4 mol%) compared to the control (15.8 mol%) with an increase of the Ara/Gal ratio to 0.8 compared to the control 0.6 (Fig. 42d and e) indicating that galactosyl residues were cleaved. Galactosidase treatment partially disrupted pollen tube adhesion compared to the control (Fig. 43a and b) and the adhesion rates of treated pectins ( $22.4 \pm 2.5\%$ ) decreased significantly compared to the control (Fig. 43c).



**Figure 42 :** *Endo*-(1,4)- $\beta$ -galactanase treatment of the imidazole extract disrupts pollen tube adhesion. Pollen tube remaining on 70  $\mu$ g of (a) imidazole extract and (b) imidazole extract treated with *endo*-(1,4)- $\beta$ -galactanase. (c) Adhesion rates of pollen tubes on the imidazole extract treated with *endo*-(1,4)- $\beta$ -galactanase compared to the untreated. Monosaccharide composition of (d) imidazole extract and (e) imidazole extract treated with *endo*-(1,4)- $\beta$ -galactanase showing the ratio of the Ara/Gal side chains. EG = *endo*-(1,4)- $\beta$ -galactanase. Red arrows show pollen tubes remaining on the matrix. For clarity, only the four main sugars are shown. Scale bar = 200  $\mu$ m.

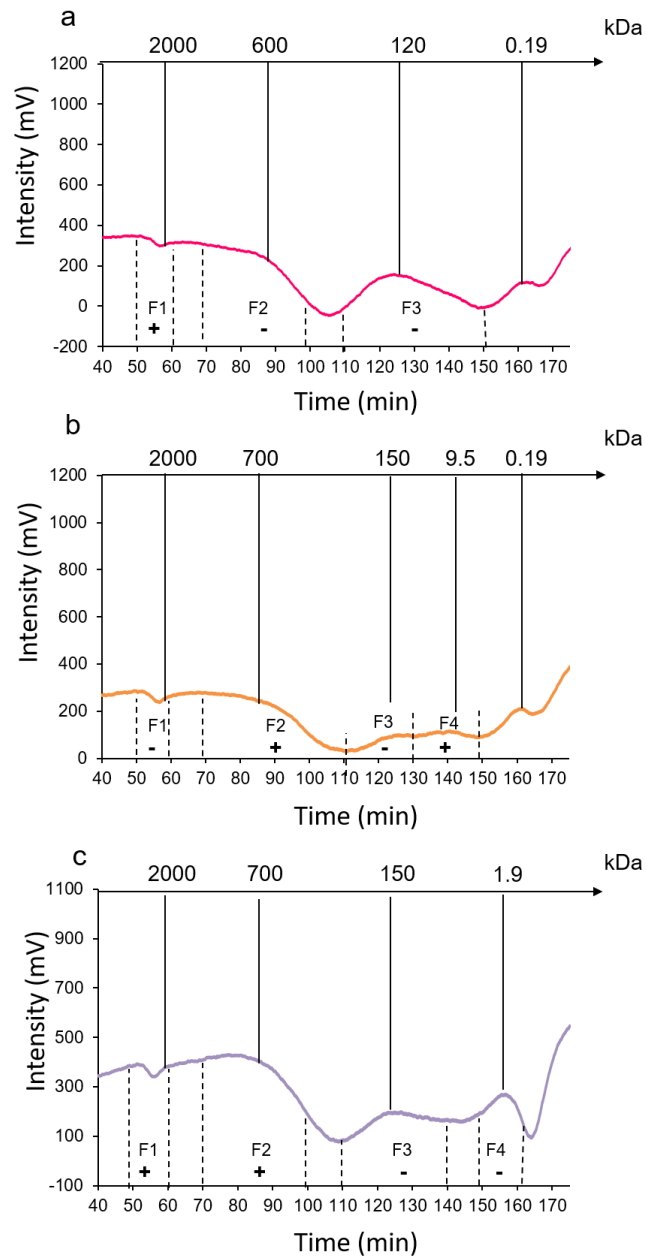


**Figure 43 :**  $\beta$ -galactosidase treatment of the imidazole extract partially disrupts pollen tube adhesion. Pollen tube remaining on 70  $\mu$ g of (a) imidazole extract and (b) imidazole extract treated with  $\beta$ -galactosidase. (c) Adhesion rates of pollen tubes on the imidazole extract treated with  $\beta$ -galactosidase compared to the imidazole extract. Asterisks indicate significant differences (\*\*\*)  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$ ) from the control according to pairwise comparison using Dunnett's test analysis with R software. BG =  $\beta$ -galactosidase. Red arrows show pollen tubes remaining on the matrix. Scale bare = 200  $\mu$ m.

Taken together, these data appear to point out the importance of galactan side chains in pollen tube adhesion. However, we cannot rule out that these enzymes, even though only one band appears on the gel electrophoresis presented by the manufacturer (Megazyme), might be slightly contaminated with other enzymes.

***A minimum molecular weight seemed to be important for pollen tube adhesion***

The imidazole extracts treated with arabinanase were separated in three fractions after SEC (Fig. 44a), with arabinosidase and galactosidase in four fractions (Fig. 44b and c). All SEC profiles with untreated and treated imidazole extracts showed a low amount of the fraction with a high MW of 2000 kDa eluted at 57 min (Fig. 44) compared to the seed mucilage (Fig. 37a). After *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -galactosidase treatments, a shift was also observed with the apparition of fractions with intermediate MW between 700 and 1.9 kDa. The apparition of fractions (with a MW of about 0.19 kDa and eluted after 165 min) was clearly observed after  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -galactosidase (Fig. 44b and c) corresponding presumably to Ara and Gal residues. The fractions with high MW (2000 kDa) allowed partial adhesion of pollen tubes with the imidazole extract treated with *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase and  $\beta$ -galactosidase (Fig. 44a and c). For the latest, an additional fraction (F2 at 700 kDa) was also partially adhesive. In contrast, with treatment with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, F1 was no longer adhesive and instead two fractions at 700 and 9.5 kDa were partially adhesives, with an adhesion rate estimated between 30 and 60%, compared to the control (100%).



**Figure 44 :** Size exclusion chromatography (SEC) of imidazole extract treated with (a) *endo*-(1,5)- $\alpha$ -L-arabinanase, (b)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and (c)  $\beta$ -galactosidase. Collected fractions (F) are separated by two dashed lines. - = adhesion rate estimation (<5 %), + = adhesion rate estimation (30<x<60%) and ++ = adhesion rate estimation (80<x<120%).

These results taken together with PGase-treated imidazole extract pointed out that a minimum MW is necessary for pollen tube adhesion with a possible role of the side chains and possibly the galactan side chains. Finally, as the adhesive property of each individual fractions was not as efficient as the starting imidazole extract before SEC, it may suggest that other components that were separated after SEC may improve pollen tube adhesion. Combination of two or more fractions may help to verify if the pollen tube adhesion rates could be restored.

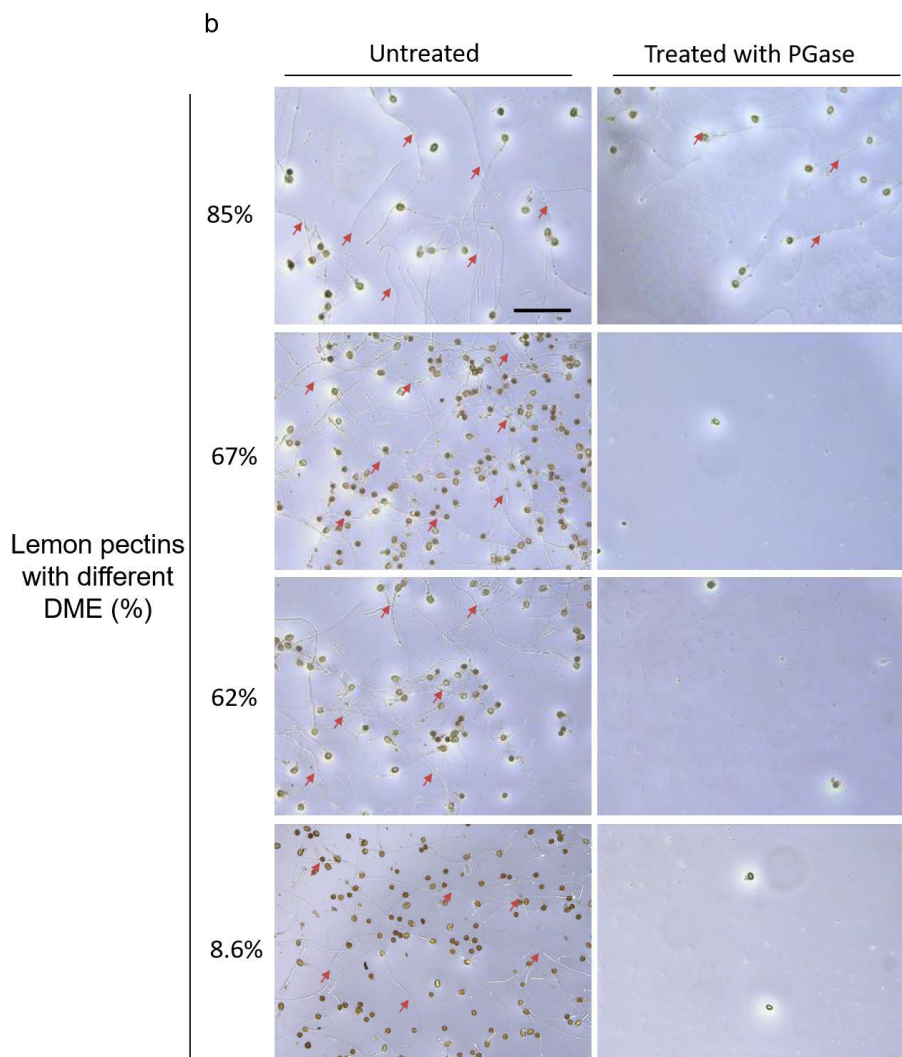
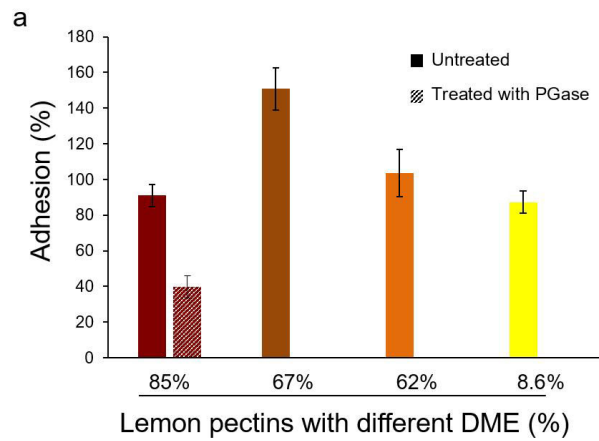
***Commercial lemon pectins can promote pollen tube adhesion and their treatments with PGase also disrupt pollen tube adhesion***

Commercial lemon pectins with different DME: 85, 67, 62 and 8.6% were tested on pollen tube adhesion. All these pectins allowed pollen tube adhesion with different rates ranging from 150.9 to 87.2% (Fig. 45a) compared to the imidazole extract with the highest being obtained with a DME of 67%. With the three other ones, the adhesion rates were in the range of the ones obtained with the imidazole extracts from leaves.

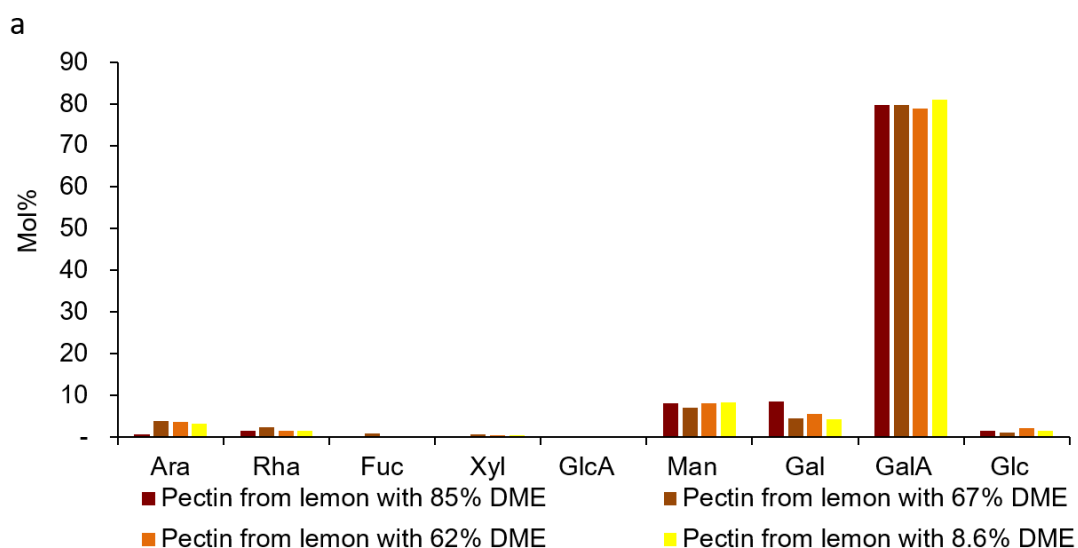
As the imidazole extract, the lemon pectins were treated with PGase that cleaves stretches of de-methylesterified HG. Pollen tube adhesion on the PGase-treated imidazole extract completely vanished compared to the control (Fig. 36). Similar results were obtained with the PGase-treated lemon pectins with 67, 62 and 8.6% DME (Fig. 45a and b). The PGase treatment on lemon pectin with 85% DME only partially disrupted pollen tube adhesion (Fig. 45a and b).

The monosaccharide composition of lemon pectins showed high levels of GalA, ranging from 78.8 to 81 mol% (Fig. 46a). The other monosaccharides were at low levels (< 10 mol%). All these pectins are composed of 77.3 to 79.6% HG, 2.8 to 4.8% RG-I backbone and 7.3 to 9.2% RG-I side chains (Fig. 46b). This data indicated that lemon pectins have a completely different composition compared to the imidazole extracts with long stretches of HG and low levels of RG-I.





**Figure 45 :** Commercial lemon pectins are also promoting pollen tube adhesion. (a) Adhesion rates of untreated or treated with PGase lemon pectins with different DME: 85, 67, 62 and 8.6%  $\pm$  SEM. Pollen tube remaining on 70  $\mu$ g of (b) untreated and treated lemon pectins with DME 85, 67, 62 and 8.6% with PGase. Red arrows show pollen tubes remaining on the matrix. DME= Degree of Methyl Esterification, PGase = *endo*-(1,4)- $\alpha$ -polygalacturonase. Scale bare = 200  $\mu$ m.



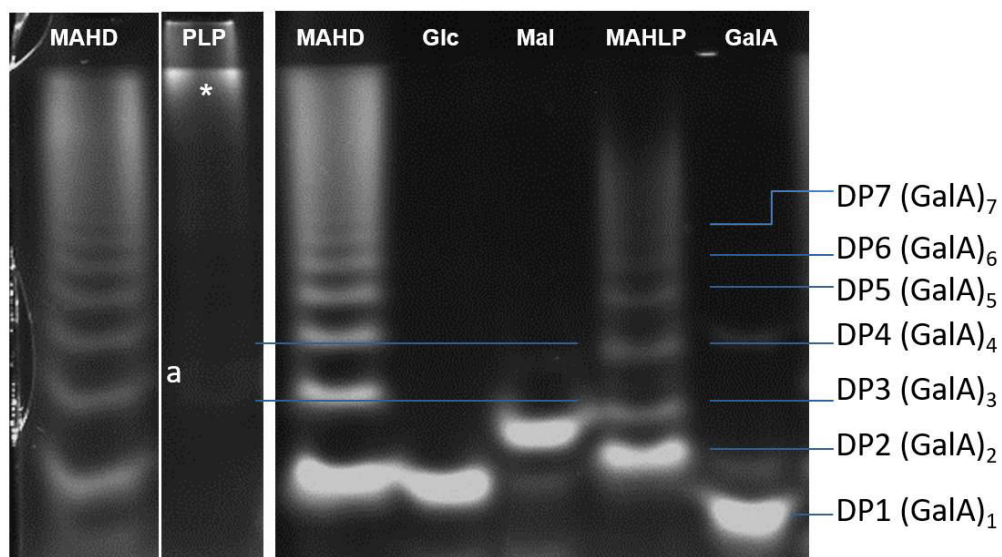
b **Level (%) of the main pectin domains and the side chains**

	85% (%)	67% (%)	62% (%)	8.6% (%)
HG	78.4	77.3	77.4	79.6
RG-I backbone	2.8	4.8	2.9	2.9
Side chains	9.2	8.3	9.1	7.3

**Figure 46 :** Monosaccharide composition of the lemon pectins with different DME: 85, 67, 62 and 8.6% and (b) the level (%) of the main pectin domains and the side chains found in RG-I. DME= Degree of Methyl Esterification.

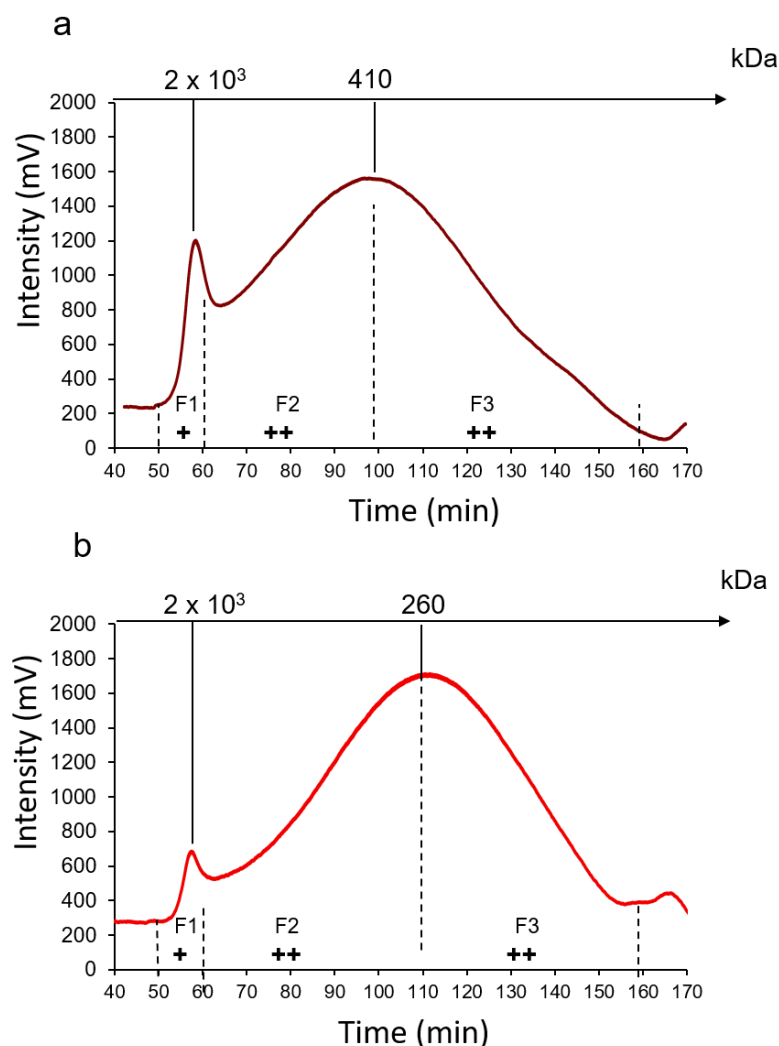
***Lemon Pectin with 85% DME is only partially cleaved by PGase***

PACE analysis of PGase-treated lemon pectin with 85% DME did not show clear bands with low MW except a possible one between DP3 and DP4, compared to the MAHLP, and could represent (GalA)<sub>3</sub> with methyl group (s) (Fig. 47a). The PACE of enzymatically treated lemon pectin also showed an amount of unseparated material that did not migrate during PACE electrophoresis, compared to the PGase-treated imidazole extract (Fig. 38). This material probably represents long stretches of HG with methylester groups that cannot be separated by PACE. Indeed, with high level of methylesterification (85% DME), HG cannot be cleaved efficiently by PGase. This limitation can explain the partial and not the total disruption of pollen tube adhesion.



**Figure 47 :** PACE analysis of lemon pectin with 85% DME treated with PGase. Separation of standard: monosaccharides (Glc and GalA), a disaccharide Mal (maltose) and ladders (mild acid hydrolysis of dextran= MAHD or mild acid hydrolysis of lemon pectin with 85% DME = MAHLP). Separation of the degradation products of the PGase treated lemon pectin 85% DME (PLP). (\*) unseparated material. a = a band observed on the gel.

Untreated and PGase-treated lemon pectin with 85% DME were also separated by SEC. Both untreated and PGase-treated lemon pectins were separated in 3 fractions (Fig. 48). Compared to the imidazole extract (Fig. 37b), the elution profiles showed a different MW distribution with the presence of one peak at 2000 kDa (F1) and a large peak eluting between 65 and 160 min with a maximum at 100 min which corresponds to 410 kDa. The PGase-treated pectin showed a reduction in the signal intensity for F1 and a shift of 10 min for the second peak. All the collected fractions allowed pollen tube adhesion with different rates (Fig. 48). F1 isolated from treated and untreated pectins promoted lower adhesion rates about 30-60% as observed with the F1 isolated from the imidazole extract. In contrast, F2 and F3 in both samples induced higher adhesion rates about 80-120% and restored the initial adhesion rates of lemon pectin before SEC.



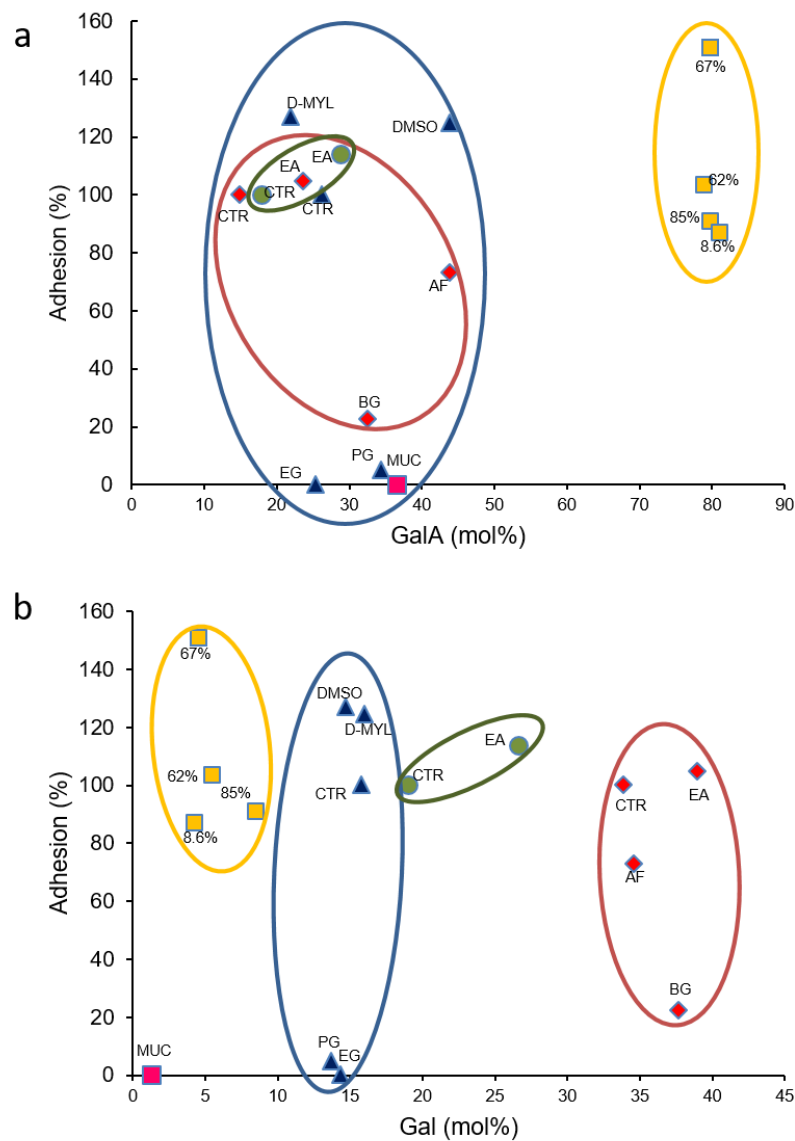
**Figure 48** : Size exclusion chromatography of (a) untreated lemon pectin with 85% DME and (b) treated with PGase. Collected fractions (F) are separated by two dashed lines. - = adhesion rate estimation (<5 %), + = adhesion rate estimation (30<x<60%) and ++ = adhesion rate estimation (80<x<120%).

***Lemon pectin possessed a low level of Gal but still promoted pollen tube adhesion***

Despite the different compositions and MW of the imidazole extracts and lemon pectins, they induced pollen tube adhesion. To understand the effect of the monosaccharide abundance and the adhesion rates, different groups were formed originating from the different imidazole extracts and the lemon pectins and the different enzyme treatments were added in each groups (Fig. 49). Adhesion rates for each extracts and treatments were associated with the GalA or Gal contents of the polymers (Fig. 49). For both monosaccharides, the lemon pectins with different DME formed an isolated cluster from the imidazole extracts due to their different compositions.

With GalA, the other groups are gathered between 15 and 45 mol% and presented different adhesion rates from 0% (which represents the PGase, galactanase-treated imidazole extracts and seed mucilage) to 126% with the imidazole extracts treated for starch removal

(DMSO and D-Myl). These results pointed out again, the importance of pectin structure and perhaps the galactan side chains in pollen tube adhesion.



**Figure 49** : Effect of the abundance of GalA (a) and Gal (b), in the different native and treated polymers, on pollen tube adhesion. Different groups originating from different imidazole extracts or lemon pectins with different DME, are encircled: Yellow for lemon pectin with different DME: 85, 67, 62 and 8.6% (yellow squares). Blue for the imidazole extract from DMSO-treated AIR (DMSO), treated with alpha-amylase from DMSO-treated AIR (D-MYL), imidazole extract treated with PGase (PG) or galactanase (EG) (blue triangles). Green for the imidazole extract treated with arabinanase (EA) (green circles). Red for imidazole extract treated with arabinanase, arabinosidase (AF) and galactosidase (BG) (red diamonds). CTR = control imidazole extract. Seed mucilage was a separated group (MUC) (pink square).

With Gal, the groups are more separated, due to the different monosaccharide content in each group. The red group contained the highest Gal content even after the galactosidase-treatment. However, despite this high Gal content, adhesion was very reduced for this extract. In contrast, the lemon pectins (yellow group) which contained very low levels of Gal promoted very strong adhesion, questioning the importance of the galactan side chains in the pollen tube adhesion. To confirm the importance of this motif in pollen tube adhesion, lemon pectins need to be treated with galactanase and galactosidase.

These results, taken together are suggesting that pectins particularly HG and maybe galactan side chains promote pollen tube adhesion. Interestingly, this adhesion with the imidazole extract is reduced after SEC suggesting that a low MW component eluted in the non-adhesive fractions may improve the pollen tube adhesion rate. This low MW component may be eluting in the F3 of the PGase-treated imidazole extract along with the partially digested adhesive pectin allowing a partial pollen tube adhesion. This phenomenon was not observed with the lemon pectins but the most adhesive fractions after SEC had a lower MW. Based on this, further analyses need to be carried out on the adhesive and non-adhesive fractions to determine their compositions, to characterize precisely the minimum pectin structure and to identify the compound that improve *Arabidopsis* pollen tube adhesion.

## **DISCUSSION**

## **I- Deux nouvelles petites molécules isolées par criblage affectent la croissance et le développement des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana***

Un criblage a été effectué sur 250 molécules de la chimiothèque du CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie), composée de chefs de famille de molécules bioactives. Deux nouvelles molécules ont été isolées : elles perturbent la croissance et le développement des tubes polliniques (Dardelle, 2011). La galvestine-1, un inhibiteur de monogalactosyldiacylglycerol synthases (MGDG synthase) a été ajoutée à l'étude (Botté et al., 2011; Boudière et al., 2012). Toutes ces molécules ont un effet dose-réponse sur la croissance et le phénotype des tubes polliniques et seules M1 et M2 inhibent la germination du tube pollinique. Ces molécules ont induit les mêmes phénotypes sur les tubes polliniques de tomate et de tabac.

Les études structurales de la galvestine-1 ont permis de mettre en évidence que la présence des deux atomes d'oxygène au centre de la galvestine-1 jouerait un rôle important lors de son interaction avec la MGDG synthase. Le contrôle négatif de la galvestine-1 (G0), représente d'ailleurs une structure troquée de la galvestine-1 et ne comporte pas ces deux atomes d'oxygène. Ainsi, des modifications de la structure modèleraient également l'activité de la molécule (Botté et al., 2011; Boudière et al., 2012). Aucune donnée n'est en revanche disponible pour les molécules M1 et M2. Cependant, les criblages effectués sur 1040 molécules provenant de la Chemical Diversity Research Institute (CDRI, Moscow, Russie) sur la croissance des tubes polliniques de tabac et de la racine d'*Arabidopsis thaliana* ont permis d'isoler 19 molécules inhibitrices de la croissance. Ces molécules sont composées, comme les molécules M1 et M2, d'hétérocycles mais elles sont plus complexes et comportent des dérivés phénoliques terminaux (Chuprov–Netochin et al., 2016).

Nos deux molécules sont composées d'une structure terminale commune : l'anisole. L'anisole est un ether-oxyde méthylé du phénol. Ce groupement pourrait potentiellement être un groupement fonctionnel. Effectivement, les composés phénoliques sont naturellement présents chez les plantes, principalement au niveau de la paroi, mais peuvent inhiber la croissance *via* plusieurs voies notamment en interagissant avec des protéines (Kefeli and Kutacek, 1977). La base de données KLIFS (*Kinase-Ligand Interaction Fingerprints and*



*Structures*) comporte des structures kinase-like parmi lesquelles plusieurs possèdent des groupements phénoliques (van Linden et al., 2014).

En outre, les données de la chimiothèque nationale (<http://chimiotheque-nationale.cn.cnrs.fr/>) permettent de préciser les fonctions putatives des molécules. D'après ces données *in silico*, seule M1 est prédite pour avoir une structure kinase-like et NR-like (nucleus receptor-like) ce qui implique que cette molécule pourrait se lier à une kinase ou à des facteurs de transcription. Dans le génome d'*A. thaliana*, on trouve plus de 600 gènes codant pour des RLK (*Receptor-Like Kinase*) (Shiu and Bleecker, 2003). La famille des RLK1L (*Receptor-Like Kinase A like*), contenant 17 RLK, est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation chez *Arabidopsis*, dont la croissance polarisée du tube pollinique (Nissen et al., 2016). L'un des membres de cette famille de RLK, ANXUR1/2, est présent dans le tube pollinique et est essentiel pour le maintien de l'intégrité des tubes polliniques au cours de l'élongation. Le double mutant *anxur1anxur2* produit des tubes polliniques qui explosent à l'apex (Boisson-Dernier et al., 2013). Une autre RLK, FERONIA (FER), localisée au niveau de l'appareil filiforme des synergides, contrôle le comportement du tube pollinique pour aboutir à la fécondation (Escobar-Restrepo et al., 2007). Les tubes polliniques des mutants *fer* pénètrent dans les synergides, mais n'explosent pas. Il semble que FERONIA contrôlerait la surproduction de FAO à l'entrée du gamétophyte femelle et induirait la rupture du tube pollinique pour libérer les cellules spermatiques (Duan et al., 2014). Les RLK sont donc importantes lors de la communication entre le tube pollinique et le tissu femelle durant la reproduction sexuée (Chai et al., 2016). On peut donc supposer que les molécules, plus particulièrement M1, perturberaient la signalisation des RLKs durant la croissance et le développement du tube pollinique.

Les WAKs (*cell Wall Associated Kinase*), une autre famille de RLK, sont fortement liées à la paroi et elles pourraient être des senseurs des pectines. Les WAKs joueraient un rôle dans l'expansion cellulaire et seraient localisées uniquement à l'apex des tubes polliniques émergents, mais leur relation avec la sécrétion des pectines dans la paroi et la croissance polarisée n'a pas encore été démontrée (Kohorn and Kohorn, 2012). Les WAKs distingueraient potentiellement entre la taille et le degré de méthylestérification des pectines dans la paroi. Ainsi, les WAKs liés aux polymères natifs se fixeraient préférentiellement sur les oligogalacturonides avec lesquels ils auraient une plus grande affinité et activeraient donc une voie de signalisation différentes (Kohorn et al., 2014). Il est possible que les pectines présentes dans la matrice extracellulaire du tissu de transmission femelle, soient perçues par les WAKs

des tubes polliniques. Les WAKs seraient peut-être à l'interface des gamétophytes mâle et femelle pour réguler la croissance mais également l'adhésion et le développement du tube pollinique afin de moduler les signaux de guidage pour aboutir à la double fécondation.

## **II- Etude de l'adhésion *in vitro* des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana* par une approche enzymatique de déconstruction d'une matrice enrichie en polysaccharides**

Le but de ces travaux est de comprendre les mécanismes impliqués dans l'adhésion des tubes polliniques en procédant à une déconstruction de la structure polysaccharidique pectique par des traitements enzymatiques afin de déterminer la structure minimale requise. Cette étude a été possible grâce à la mise au point d'un test d'adhésion *in vitro* pour les tubes polliniques d'*A. thaliana* dans des plaques 96-puits sur une matrice composée d'extraits pariétaux (Dardelle, 2011), en se basant sur les travaux effectués sur les tubes polliniques de lys (Jauh et al., 1997; Mollet et al., 2000)

Sur plusieurs fractions de paroi extraites séquentiellement de différents organes d'*A. thaliana*, les extraits d'imidazole de feuilles et de fleurs ont permis d'obtenir des taux d'adhésion élevés et similaires. Par conséquent, les extraits d'imidazole de feuilles ont été utilisés afin d'obtenir facilement de grandes quantités et en raison de la similarité de composition avec les extraits d'imidazole de fleurs. D'autres extraits ont été ajoutés à l'étude : des pectines commerciales de citron riche en HGs et possédant différents DME : 85%, 67%, 62% et 8,6%. Malgré la différence de composition entre ces pectines et l'extrait d'imidazole, elles permettent l'adhésion des tubes polliniques avec des taux similaires, excepté pour les pectines de citron avec 67% DME qui présentent un taux d'adhésion plus élevé.

Le traitement à la PGase, qui hydrolyse les HGs faiblement méthylestérifiés, d'extrait d'imidazole et des pectines de citron induit une perte totale d'adhésion. A l'exception des pectines de citron avec 85% DME qui ne sont pas totalement digérées par l'enzyme et où la perte d'adhésion est partielle. Ainsi, en comparant les profils PACE des pectines de citron 85% DME et d'extrait d'imidazole traités à la PGase, les pectines de citron présentent très peu d'oligogalacturonides et une fraction qui n'a pas migrée durant l'électrophorèse et qui représenterait des pectines de poids moléculaire élevé, contrairement aux extraits d'imidazole traités qui présentent des oligogalacturonides (potentiellement méthylestérifiés) de petites tailles (DP = 3 – 5) et de GalA. L'identification de ces bandes pourrait être confirmée par l'utilisation d'oligogalacturonides possédant des tailles et des DME connus.

Ces résultats suggèrent que les pectines ou plus précisément les HGs sont importants pour l'adhésion des tubes polliniques.

Les HG participent à la structure de la lamelle moyenne, principale médiatrice de l'adhésion cellulaire. La formation de structure en « boîte à œuf » entre les HG déméthylés et le calcium serait responsable de l'adhésion cellulaire (Daher and Braybrook, 2015). L'étude de mutants comme *qual* et *gnom* qui présentent une diminution du taux de GalA dans la paroi ou une localisation anormale des HGs faiblement méthylstérifiés, supportent également cette théorie (Shevell et al., 2000; Ridley et al., 2001; Bouton, 2002). Mollet et al. (2000) ont également montré l'importance des pectines dans l'adhésion sur les tubes polliniques de lys *in vitro* en traitant la matrice d'adhésion à la PGase et en localisant sur les cellules épidermiques du tissu de transmission femelle des épitopes d'HGs faiblement méthylestérifiés ainsi qu'en montrant leurs présences dans ces extraits pariétaux. Ceci laisse également penser que ce domaine jouerait un rôle important dans l'adhésion des tubes polliniques.

D'autre part, deux autres domaines pectiques ont été testés sur l'adhésion des tubes polliniques: le RG-II purifié à partir de la vigne et la chaîne principale du RG-I extrait du mucilage des graines. Le RG-II est purifié après un traitement à *endo*-polygalacturonase de la paroi. La structure hautement conservée du RG-II dans les plantes terrestres montre l'importance de ce domaine. Le RG-II joue un rôle important dans la rigidité de la paroi cellulaire, avec un poids moléculaire est estimé à 5 ou 10 kDa selon qu'il soit dimérisé ou non avec un atome de bore (O'Neill, 2001; O'Neill et al., 2004). Chez la tomate cerise, un *silencing* des gènes GME (GDP-mannose épimérase), précurseur de synthèse de D-mannose, L-fucose et L-galactose et donc en partie du RG-II, a induit la production de fruits de petite taille et avec un nombre de graines inférieur au sauvage, ce qui serait lié au développement du pollen et à la pollinisation (Mounet-Gilbert et al., 2016). Le RG-II purifié de vigne n'a pas induit l'adhésion des tubes polliniques. Le RG-II, seul, ne semble donc pas jouer un rôle dans l'adhésion du tube pollinique sur la matrice d'adhésion. La chaîne principale du RG-I, isolée du mucilage non-adhérent de graines d'*A. thaliana* (Macquet et al., 2007), n'a pas promu l'adhésion des tube polliniques. Le profil d'élution par chromatographie d'exclusion stérique du mucilage était principalement composé d'une fraction de haut poids moléculaire. Malgré son poids moléculaire élevé, la chaîne principale du RG-I seule n'est pas importante pour l'adhésion du tube pollinique. Nous ne pouvons pas pour autant nous prononcer sur le rôle de ces deux domaines pectiques au sein du polymère complet.

Les extraits pectiques obtenus avec l'imidazole présentent des taux élevés de Gal et d'Ara, ce qui suggère que les chaînes latérales du RG-I et/ou des AGP pourraient être impliqués dans l'adhésion des tubes polliniques. Les dot-blots ont également apportés des informations complémentaires sur l'extrait d'imidazole : il serait composé de courtes chaînes d'arabinanes plus ou moins associées à des résidus galactosyl. Afin d'hydrolyser les chaînes latérales provenant du RG-I et/ou des AGP, différentes enzymes ont été utilisés : l'arabinanase, l'arabinofuranosidase, la galactanase et la galactosidase.

L'*endo*-arabinanase hydrolyse de façon aléatoire les chaînes d'Ara liées en  $\alpha$ -(1,5) et permet principalement de libérer des arabinotrioses (Park et al., 2012). Alors que l'arabinofuranosidase permet de libérer des résidues terminaux  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) et  $\alpha$ -(1,5)-L-arabinofuranosyl de polysaccharides contenant de l'Ara (Saha, 2000; Numan and Bhosle, 2006; Ahmed et al., 2013).

Le traitement à l'*endo*-arabinanase n'a pas perturbé l'adhésion des tubes polliniques alors que le traitement à l'arabinofuranosidase a entraîné une diminution partielle de l'adhésion des tubes polliniques associée à une diminution plus drastique du rapport Ara/Gal. Ceci peut être dû à une hydrolyse plus efficace qu'avec l'*endo*-arabinanase, provenant du fait que l'arabinofuranosidase a une activité qui s'étend à d'autres types de liaisons que les  $\alpha$ -(1,5). Ces résultats suggèrent que les chaînes d'arabinanes ne joueraient pas un rôle capital dans l'adhésion des tubes polliniques *in vitro*. Plusieurs travaux ont pourtant montré que les chaînes d'arabinane pouvaient être impliquées dans l'adhésion et la cohésion cellulaire. Par exemple, les travaux menés sur les mutants *nolac-H14* ou *cnr* et dans lesquels la perte des chaînes d'arabinanes induisait une augmentation de la séparation cellulaire. En outre, au cours de la maturation, un ramolissement de la pomme serait due à une perte de chaînes d'arabinanes. Ceci semblerait indiquer que les chaînes latérales auraient aussi un rôle dans l'adhésion et la cohésion cellulaires (Iwai et al., 2001; Orfila et al., 2002; Peña and Carpita, 2004).

L'*endo*-galactanase libère du galactobiose et du galactose de chaîne de galactanes liées en  $\beta$ -(1,4) (Lahaye et al., 1991; de Vries et al., 2002) et la  $\beta$ -galactosidase libère le Gal (Bahl and Agrawal, 1969; Manzanares et al., 1998). Le traitement d'extrait d'imidazole par l'*endo*-galactanase induit une perte totale de l'adhésion des tubes polliniques. Après un traitement par la  $\beta$ -galactosidase, une diminution partielle de l'adhésion du tube de pollen a été observée. Ces deux résultats indiquent que les chaînes galactanes pourraient jouer un rôle dans l'adhésion du tube pollinique. Toutefois, il est possible que les enzymes utilisées soient contaminées par d'autres activités enzymatiques comme une PGase et qui expliquerait la perte de l'adhésion. Le

rôle des chaînes de galactanes a également été étudié lors de la maturation des fruits où une diminution du taux de Gal dans la paroi induirait une perte de l'adhésion cellulaire par la solubilisation des pectines (Redgwell et al., 1997). Par exemple, le mutant *ecp1* qui possède un taux de Gal dans la paroi inférieur au sauvage, présente une diminution de l'adhésion cellulaire (Singh et al., 2005). Le rôle des chaînes latérales mérite donc d'être étudié plus en détail puisque contrairement aux extraits d'imidazole, les pectines de citron possèdent des taux très bas de Gal et d'Ara, Il serait donc important de préciser le rôle de ces chaînes latérales au sein des pectines commerciales par traitements enzymatiques.

Afin de compléter les résultats obtenus après les digestions enzymatiques des extraits d'imidazole, des analyses SEC ont été effectuées. L'extrait d'imidazole non traité permet de distinguer 4 fractions parmi lesquelles seule une fraction mineure de haut poids moléculaire (2000 kDa) a permis l'adhésion des tubes polliniques à un taux inférieur à ceux obtenus avec l'extrait d'imidazole initial. Lors des différents traitements enzymatiques, on observe une diminution de la fraction de 2000 kDa et une apparition de fractions de poids moléculaire intermédiaires. Aves des fractions éluées de 0,19 kDa correspondant au GalA, Ara ou Gal lors des traitements à la PGase, arabinofuranosidase ou  $\beta$ -galactosidase, respectivement. Ces résultats confirment que les extraits ont bien été hydrolysés par les enzymes.

Comme pour les extraits d'imidazole non traités, seule la première fraction de haut poids moléculaire est partiellement adhésive lors du traitement avec l'*endo*-arabinanase et la  $\beta$ -galactosidase. Après le traitement à la PGase, la fraction de 2000 kDa n'est plus adhésive. En revanche, il y a apparition de deux fractions de poids moléculaire intermédiaires, une fraction de 700 kDa non adhésive et une fraction de 190 kDa qui permet l'adhésion partielle des tubes polliniques. Ainsi, à partir d'un extrait traité à la PGase non adhésif, une fraction de faible poids moléculaire, a été concentrée et a permis l'adhésion partielle des tubes polliniques. Lors du traitement avec l'arabinofuranosidase, la fraction de 2000 kDa n'est plus adhésive mais deux autres fractions de 700 et 9,5 kDa sont partiellement adhésives.

Les profils de SEC montrent que les pectines de citron de 85% DME présente une fraction de haut poids moléculaire plus importante que celle des pectines de feuilles. Ces différences pourraient être dues aux différentes techniques d'extractions et/ou de conservations du matériel végétale, comme pour le mucilage de graines. Après le traitement des pectines de citron avec la PGase, un très léger décalage est observé, ce qui confirme l'hydrolyse partielle de ces pectines. Pour les pectines de citron traitées et non traitées, les fractions de haut poids moléculaire sont partiellement adhésives et seules les fractions de poids intermédiaire

permettent de restaurer le taux d'adhésion initial des pectines de citron avec 85% de DME. On peut supposer que ces pectines contiennent également un autre composé élué avec les fractions de poids intermédiaire permettant de promouvoir l'adhésion des tubes polliniques.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'intégrité des pectines ne serait pas capitale pour l'adhésion mais qu'un poids moléculaire minimal supérieur à 10 kDa, serait nécessaire avec une possible implication des HGs et des chaînes de galactanes mais également d'un autre acteur, de nature inconnue, promouvant l'adhésion des tubes polliniques.

On peut donc supposer que ces composés, pourraient être de nature protéique. En effet, un partenaire de nature protéique est nécessaire pour de l'adhésion des tubes polliniques chez le lys: La SCA (Stylar Cystein-Rich Adhesin), présente uniquement dans le tissu de transmission femelle. Cette protéine de 9 kDa, riche en cystéine et thermostable, possède des similarités de séquences avec les Lipid Transfer Proteins (LTPs) qui sont des protéines impliquées dans différents processus biologiques notamment lors la croissance des tubes polliniques mais également dans les mécanismes de défenses des plantes (Mollet et al., 2000; Park et al., 2000; Park and Lord, 2003). Une *ltp5* est exprimée dans le tissu de transmission mais également dans les tubes polliniques d'*A. thaliana*. Ce serait une SCA-like LTP et elle jouerait également un rôle lors de la reproduction sexuée (Chae et al., 2009). Afin de confirmer ou d'exclure l'implication d'un composé de nature protéique dans ces fractions, des traitements à la protéinase devront être effectués sur les différents extraits.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les molécules, M1 et M2, modifient la dynamique des filaments d'actine et plus précisément de l'actine fringe qui est fortement liée à RIC4, un effecteur de ROP1, protéine au centre des mécanismes de croissance polarisée du tube pollinique. Les molécules augmentent la production globale des FAO et potentiellement de NO, qui pourrait être suivi à l'aide de sondes spécifiques comme le 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA). Par exemple, la réaction de Fenton génère la production de OH• dont la durée de demi-vie est très courte mais qui pourrait très localement cliver certaines liaisons polysaccharidiques provoquant un relâchement pariétal. L'ensemble de ces acteurs signalétiques que sont les radicaux libres (FAO et RNS : *reactive nitrogen species*) pourraient aussi être quantifiés par spectroscopie EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*), disponible à la plate-forme BOSS (*Biology and Oxidative Stress Systems*) à la faculté de médecine de l'Université de Rouen et déjà utilisée au laboratoire sur des plantes (Zahid et al., 2017).

La galvestine-1, elle, réduit l'élongation du tube pollinique, mais sans inhiber la germination et ses effets sur les différents mécanismes de croissance étudiés, plus précisément la dynamique de l'actine et de RIC4, sont moindre par rapport à M1 et M2.

La distribution des polymères de la paroi, callose, HGs et AGPs, est également affectée par ces traitements pouvant modifier les propriétés mécaniques de la paroi et ainsi provoquer une réduction de la croissance. Ceci pourrait s'expliquer par une altération du trafic des vésicules de sécrétion (contenant les polymères de la paroi et les enzymes de remodelage) et de leurs incorporations dans la région apicale du tube pollinique en raison d'un mauvais ciblage dû à l'action défectueuse des filaments d'actine et de RIC4. Une étude ultrastructurale dans la zone apicale des tubes polliniques pourrait permettre de déterminer l'intégrité des différents organites et des vésicules de sécrétion Golgienne et à l'aide d'anticorps dirigés contre les polymères, afin de déterminer leurs répartitions dans la paroi et les vésicules Golgiennes.

Il est aussi primordial de définir la relation entre la structure du composé et son activité biologique notamment *via* l'utilisation des molécules disponibles au sein de la chimiothèque du CERMN. En effet, les molécules testées représentent les chefs de famille et la chimiothèque dispose de molécules dont les structures de M1 et M2 sont modifiées. Cette approche de pharmaco-modulation pourrait être testée sur les tubes polliniques afin de définir les structures minimales et les groupements importants responsables de leurs effets biologiques.



L'étape suivante serait de localiser et d'identifier la ou les cible(s) de ces molécules. Des collaborations étroites avec des chimistes et des chimoinformaticiens devront être établies. En effet, la localisation pourrait se faire en greffant un traceur sur la molécule d'intérêt comme un fluorophore, par exemple, et ensuite par une approche d'imagerie de déterminer le compartiment cellulaire où se retrouverait la molécule, en association à des marqueurs connus de certains compartiments cellulaires comme le Golgi, le réticulum endoplasmique, la membrane, le tonoplaste, le noyau, la mitochondrie, le plaste, entre autre (<http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/Fluorescent-Probes-for-Plant-Imaging.pdf>).

Afin d'identifier la cible, un travail préliminaire de chimoinformatique appelé « docking screen » permettrait à partir de la structure de la molécule candidate et de modélisations 3D de protéines de simuler les possibles interactions et trouver des ligands potentiels. Ces simulations de « docking » sont énormément utilisées dans le recherche de cibles pour des molécules à potentiel thérapeutique (Kolb et al., 2009) et réalisées régulièrement au CERMN. Par la suite, plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour le vérifier expérimentalement (Dejonghe and Russinova, 2014). L'une pourrait être de greffer la molécule sur des nano/microbilles et après incubation avec un extrait de tubes polliniques tenter d'isoler la cible ou le complexe par affinité et pull-down et de caractériser les composés associés (Lomenick et al., 2011). Une autre approche serait une nouvelle fois de modifier la molécule d'intérêt en y ajoutant en plus du traceur un « crosslinker » comme les phényl azides photoactivables sous UV. Cette activation permet de créer une liaison covalente entre la molécule et la cible potentielle qui pourrait dans le cas de protéines être extraites, séparées sur gel, localisée grâce au traceur et analysée par spectrométrie de masse après une digestion à la trypsine (Rix and Superti-Furga, 2009). Bien sûr, des essais préalables seront nécessaires pour vérifier que ces modifications chimiques laissent la molécule active.

L'étude de l'adhésion des tubes polliniques a permis de mettre en avant l'importance des HGs et des chaînes latérales du RG-I et/ou d'AGP dans l'adhésion, plus particulièrement les chaînes de galactanes. D'autres analyses sont nécessaires pour compléter cette partie en particulier la composition en monosaccharides, la caractérisation des liaisons, dot-blot, électrophorèse et western-blot..., des fractions collectées après SEC des extraits non traités et traités avec les différentes enzymes. Ces informations manquantes permettront de déterminer la présence ou non d'AGPs dans nos extraits à l'imidazole. De même, afin d'éliminer la

possibilité que des protéines soient impliquées des traitements avec des protéases sur les différentes fractions adhésives seront nécessaires.

Afin de confirmer le rôle des chaînes latérales du RG-I de ces pectines, des traitements aux arabinanases et aux galactanases devront être effectués. Des fractions de tailles différentes ont été isolées par SEC, les fractions de haut poids moléculaire sont généralement adhésives, mais on a pu également isoler des fractions de taille intermédiaire qui promouvaient l'adhésion des tubes polliniques. Nous avons également pu isoler une fraction de poids moléculaire plus faible partiellement adhésive après SEC alors que l'extrait de départ traité à la PGase était non adhésif. Il est donc important d'analyser les compositions de ces fractions par GC-FID afin de déterminer la structure minimale commune qui permet l'adhésion.

Comme les propriétés adhésives de l'extrait imidazole étaient supérieures à la fraction adhésive de haut poids moléculaire après SEC, nous n'excluons pas la possibilité qu'un autre composé, contenu dans les extraits à l'imidazole et élué dans les fractions non-adhésives, puisse participer à l'adhésion. Il pourrait s'agir de polysaccharides autres que les pectines ou de nature non polysaccharidique. Il serait donc dans un premier temps, intéressant de regrouper deux à deux les fractions afin de vérifier si les taux d'adhésion initiaux sont restaurés.

Les enzymes utilisées commerciales sont produites par des microorganismes, ayant des modes d'action souvent différents de celles des plantes, et malgré les indications des fabricants, on ne peut pas exclure que certains lots soient contaminés par d'autres activités même mineures rendant les interprétations difficiles. On pourrait imaginer l'utilisation des nombreuses enzymes synthétisées par *Arabidopsis thaliana* (PGases, PME, pectines acétyl estérase, galactosidase, rhamnogalacturonase...) dont les modes d'action au sein de chaque famille pourraient être légèrement différents. Celles-ci, produites dans des systèmes hétérologues dont certaines sont déjà disponibles au laboratoire BioPI de l'Université d'Amiens, seraient donc beaucoup plus spécifiques sur des pectines de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* et pourraient permettre de les déconstruire différemment et plus finement afin de déterminer le ou les motifs indispensables à l'adhésion des tubes polliniques.

Finalement, une approche plus classique de génomique fonctionnelle, à l'aide de mutants pour lesquels l'adhésion du pollen est perturbée pourrait aussi apporter des informations sur le rôle des partenaires dans le tube pollinique qui interagissent avec la matrice d'adhésion.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## A

- Abercrombie, J.M., O'Meara, B.C., Moffatt, A.R., and Williams, J.H. (2011). Developmental evolution of flowering plant pollen tube cell walls: callose synthase (CalS) gene expression patterns. *EvoDevo* 2, 14.
- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J., and Ram, S.J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* 11, 36–42.
- Agre, P., Sasaki, S., and Chrispeels, M.J. (1993). Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am. J. Physiol.* 265, F461.
- Ahmed, S., Luis, A.S., Bras, J.L.A., Ghosh, A., Gautam, S., Gupta, M.N., Fontes, C.M.G.A., and Goyal, A. (2013). A Novel  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase of Family 43 Glycoside Hydrolase (Ct43Araf) from *Clostridium thermocellum*. *PLOS ONE* 8, e73575.
- Albenne, C., Canut, H., and Jamet, E. (2013). Plant cell wall proteomics: the leadership of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 4.
- Albersheim, P., Darvill, A.G., O'Neill, M.A., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (1996). An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. *Prog. Biotechnol.* 14, 47–55.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., and Staehelin, A. (2010). *Plant Cell Walls* (Garland Science).
- Allen, A.M., Lexer, C., and Hiscock, S.J. (2010). Comparative Analysis of Pistil Transcriptomes Reveals Conserved and Novel Genes Expressed in Dry, Wet, and Semidry Stigmas. *Plant Physiol.* 154, 1347–1360.
- Andersland, J.M., and Parthasarathy, M.V. (1993). Conditions affecting depolymerization of actin in plant homogenates. *J. Cell Sci.* 104, 1273–1279.
- Anderson, J.R., Barnes, W.S., and Bedinger, P. (2002). 2,6-Dichlorobenzonitrile, a cellulose biosynthesis inhibitor, affects morphology and structural integrity of petunia and lily pollen tubes. *J. Plant Physiol.* 159, 61–67.
- Aouar, L., Chebli, Y., and Geitmann, A. (2010). Morphogenesis of complex plant cell shapes: the mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 23, 15–27.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- Arasimowicz-Jelonek, M., and Floryszak-Wieczorek, J. (2011). Understanding the fate of peroxy nitrite in plant cells? From physiology to pathophysiology. *Phytochemistry.* 72, 681–688.
- Armstrong, J.I., Yuan, S., Dale, J.M., Tanner, V.N., and Theologis, A. (2004). Identification of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14978–14983.
- Asami, T., and Yoshida, S. (1999). Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci.* 4, 348–353.
- Asami, T., Min, Y.K., Nagata, N., Yamagishi, K., Takatsuto, S., Fujioka, S., Murofushi, N., Yamaguchi, I., and Yoshida, S. (2001). Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol.* 123, 93–100.

Asami, T., Mizutani, M., Fujioka, S., Goda, H., Min, Y.K., Shimada, Y., Nakano, T., Takatsuto, S., Matsuyama, T., Nagata, N., et al. (2001). Selective Interaction of Triazole Derivatives with DWF4, a Cytochrome P450 Monooxygenase of the Brassinosteroid Biosynthetic Pathway, Correlates with Brassinosteroid Deficiency in *Planta*. *J. Biol. Chem.* 276, 25687–25691.

Atmodjo, M.A., Hao, Z., and Mohnen, D. (2013). Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 747–779.

## B

Bahl, O.P., and Agrawal, K.M.L. (1969). Glycosidases of *Aspergillus niger* I. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  $\alpha$ - AND  $\beta$ -GALACTOSIDASES AND  $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE. *J. Biol. Chem.* 244, 2970–2978.

Barrett, S.C.H. (2002). Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88, 154–159.

Barton, C.J., Tailford, L.E., Welchman, H., Zhang, Z., Gilbert, H.J., Dupree, P., and Goubet, F. (2006). Enzymatic fingerprinting of *Arabidopsis* pectic polysaccharides using polysaccharide analysis by carbohydrate gel electrophoresis (PACE). *Planta* 224, 163–174.

Barton, C.J., Tailford, L.E., Welchman, H., Zhang, Z., Gilbert, H.J., Dupree, P., and Goubet, F. (2006). Enzymatic fingerprinting of *Arabidopsis* pectic polysaccharides using polysaccharide analysis by carbohydrate gel electrophoresis (PACE). *Planta* 224, 163–174.

Baumberger, N., Doesseger, B., Guyot, R., Diet, A., Parsons, R.L., Clark, M.A., Simmons, M.P., Bedinger, P., Goff, S.A., Ringli, C. (2003). Whole-genome comparison of leucine-rich repeat extensins in *Arabidopsis* and rice. A conserved family of cell wall proteins form a vegetative and a reproductive clade. *Plant Physiol.* 131, 1313–1326.

Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Plant Biol.* 65, 1229–1240.

Beale, K.M., Leydon, A.R., and Johnson, M.A. (2012). Gamete fusion is required to block multiple pollen tubes from entering an *Arabidopsis* ovule. *Curr. Biol.* 22, 1090–1094.

Becker, J.D., and Feijó, J.A. (2007). How Many Genes are Needed to Make a Pollen Tube? Lessons from Transcriptomics. *Ann. Bot.* 100, 1117–1123.

Becnel, J., Natarajan, M., Kipp, A., and Braam, J. (2006). Developmental expression patterns of *Arabidopsis* XTH genes reported by transgenes and Genevestigator. *Plant Mol. Biol.* 61, 451–467.

Becraft, P.W. (2002). Receptor Kinase Signaling in Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 163–192.

Bertin R. I., and Newman C. M. (1993). Dichogamy in angiosperms. *Botanical Review*, 59, 112–152

Bessueille, L., and Bulone, V. (2008). A survey of cellulose biosynthesis in higher plants. *Plant Biotechnol.* 25, 31500–32210.

Beyer, W.F., and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161, 559–566.

Biancucci, M., Mattioli, R., Forlani, G., Funck, D., Costantino, P., and Trovato, M. (2015). Role of proline and GABA in sexual reproduction of angiosperms. *Front. Plant Sci.* 6.

Bibeau, J.P., Kingsley, J.L., Furt, F., Tuzel, E., Vidali, L. (2017). F-Actin mediated focusing of vesicles at the cell tip is essential for polarized growth. *Plant Physiol.* pp.17.00753.

- Blowers, D.P., and Trewavas, A.J. (1989). Rapid cycling of autophosphorylation of a ca-calmodulin regulated plasma membrane located protein kinase from pea. *Plant Physiol.* 90, 1279–1285.
- Boavida, L.C., Vieira, A.M., Becker, J.D., and Feijo, J.A. (2005). Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 615–632.
- Boavida, L.C., and McCormick, S. (2007). Technical advance : temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*: Temperature effect on *Arabidopsis* pollen germination. *Plant J.* 52, 570–582.
- Bock, K.W., Honys, D., Ward, J.M., Padmanaban, S., Nawrocki, E.P., Hirschi, K.D., Twell, D., and Sze, H. (2006). Integrating Membrane Transport with Male Gametophyte Development and Function through Transcriptomics. *Plant Physiol.* 140, 1151–1168.
- Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, M.A., Jaciubek, M., Schroeder, J.I., and Grossniklaus, U. (2009). Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3279–3288.
- Boisson-Dernier, A., Lituiev, D.S., Nestorova, A., Franck, C.M., Thirugnanarajah, S., and Grossniklaus, U. (2013). ANXUR Receptor-Like Kinases Coordinate Cell Wall Integrity with Growth at the Pollen Tube Tip Via NADPH Oxidases. *PLoS Biol.* 11, e1001719.
- Boisson-Dernier, A., Franck, C.M., Lituiev, D.S., and Grossniklaus, U. (2015). Receptor-like cytoplasmic kinase MARIS functions downstream of CrRLK1L-dependent signaling during tip growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 12211–12216.
- Bordenave M. (1996). Analysis of pectin methyl esterases. *Plant Cell Wall Analysis.* 17, 165–180.
- Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., Rossignol, M., Jauneau, A., Boudart, G., Monsarrat, B., Esquerré-Tugayé, M.-T., Boudet, A., and Pont-Lezica, R. (2003). Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis.* 24, 3421–3432.
- Borg, M., and Twell, D. (2010). Life after meiosis: patterning the angiosperm male gametophyte. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 577–582.
- Borner, G.H.H., Lilley, K.S., Stevens, T.J., and Dupree, P. (2003). Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in *Arabidopsis*. A Proteomic and Genomic Analysis. *Plant Physiol.* 132, 568–577.
- Bosch, M., and Hepler, P.K. (2005). Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell.* 17, 3219–3226.
- Bosch, M., Cheung, A.Y., and Hepler, P.K. (2005). Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol.* 138, 1334–1346.
- Bots, M., Vergeldt, F., Wolters-Arts, M., Weterings, K., van As, H., and Mariani, C. (2005). Aquaporins of the PIP2 Class Are Required for Efficient Anther Dehiscence in Tobacco. *Plant Physiol.* 137, 1049–1056.
- Botté, C.Y., Deligny, M., Rocchia, A., Bonneau, A.-L., Saïdani, N., Hardré, H., Aci, S., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Dubots, E., et al. (2011). Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Chem. Biol.* 7, 834–842.
- Boudière, L., Botté, C.Y., Saidani, N., Lajoie, M., Marion, J., Bréhélin, L., Yamaryo-Botté, Y., Satiat-Jeunemaître, B., Breton, C., Girard-Egrot, A., et al. (2012). Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Mol. Biosyst.* 8, 2023.

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

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

Brabham, C., and Debolt, S. (2012). Chemical genetics to examine cellulose biosynthesis. *Front. Plant Sci.* 3, 309.

Braybrook, S.A., Hofte, H., and Peaucelle, A. (2012). Probing the mechanical contributions of the pectin matrix: insights for cell growth. *Plant Signal. Behav.* 7, 1037–1041.

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

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

Brewbaker, J.L. (1967). The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms. *Am. J. Bot.* 54, 1069–1083.

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

Burkart, G.M., Baskin, T.I., and Bezanilla, M. (2015). A family of ROP proteins that suppresses actin dynamics, and is essential for polarized growth and cell adhesion. *J. Cell Sci.* 128, 2553–2564.

Bush, M.S., Marry, M., Huxham, I.M., Jarvis, M.C., and McCann, M.C. (2001). Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta* 213, 869–880.

## C

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

Caffall, K.H., Pattathil, S., Phillips, S.E., Hahn, M.G., and Mohnen, D. (2009). *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutants implicate GAUT genes in the biosynthesis of pectin and xylan in cell walls and seed testa. *Mol. Plant* 2, 1000–1014.

Cai, G., Faleri, C., Del Casino, C., Emons, A.M.C., and Cresti, M. (2011). Distribution of Callose Synthase, Cellulose Synthase, and Sucrose Synthase in Tobacco Pollen Tube Is Controlled in Dissimilar Ways by Actin Filaments and Microtubules. *PLANT Physiol.* 155, 1169–1190.

Camardella, L., Carratore, V., Ciardiello, M.A., Servillo, L., Balestrieri, C., and Giovane, A. (2000). Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. *Eur. J. Biochem.* 267, 4561–4565.

Campbell, P., and Braam, J. (1999). Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends Plant Sci.* 4, 361–366.

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

- Carpita, N.C., Ralph, J., McCann, M.C. (2015) Chapter 2: The Cell Wall. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd Edition (Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., Eds.), Wiley Blackwell: New York, 45-189.
- Cassab, G.I. (1998). Plant Cell Wall Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 281–309.
- Chae, K., Kieslich, C.A., Morikis, D., Kim, S.-C., and Lord, E.M. (2009). A Gain-of-Function Mutation of Arabidopsis Lipid Transfer Protein 5 Disturbs Pollen Tube Tip Growth and Fertilization. *Plant Cell.* 21, 3902–3914.
- Chae, K., and Lord, E.M. (2011). Pollen Tube Growth and Guidance: Roles of Small, Secreted Proteins. *Ann. Bot.* 108, 627–636.
- Chai, S., Ge, F., Li, S., and Zhang, Y. (2016). The journey to glory: receptor-like kinases in pollen tube growth. *Sci. Bull.* 61, 827–831.
- Chaidee, A., Foissner, I., and Pfeiffer, W. (2008). Cell-specific association of heat shock-induced proton flux with actin ring formation in *Chenopodium* cells: comparison of auto- and heterotroph cultures. *Protoplasma* 234, 33.
- Chebli, Y., and Geitmann, A. (2007). Mechanical principles governing pollen tube growth. *FPSB.* 1, 232-245.
- Chebli, Y., Kaneda, M., Zerkour, R., and Geitmann, A. (2012). The Cell Wall of the Arabidopsis Pollen Tube--Spatial Distribution, Recycling, and Network Formation of Polysaccharides. *Plant Physiol.* 160, 1940–1955.
- Chen, S.X., and Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 260, 726–735.
- Chen, T., Teng, N., Wu, X., Wang, Y., Tang, W., Šamaj, J., Baluška, F., and Lin, J. (2007). Disruption of Actin Filaments by Latrunculin B Affects Cell Wall Construction in *Picea meyeri* Pollen Tube by Disturbing Vesicle Trafficking. *Plant Cell Physiol.* 48, 19–30.
- Chen, L.-Y., Shi, D.-Q., Zhang, W.-J., Tang, Z.-S., Liu, J., and Yang, W.-C. (2015). The Arabidopsis alkaline ceramidase TOD1 is a key turgor pressure regulator in plant cells. *Nat. Commun.* 6, 6030.
- Cheung, A.Y., Wang, H., and Wu, H.M. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82, 383–393.
- Cheung, A.Y., and Wu, H. (2008). Structural and Signaling Networks for the Polar Cell Growth Machinery in Pollen Tubes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 547–572.
- Chevalier, L., Bernard, S., Ramdani, Y., Lamour, R., Bardor, M., Lerouge, P., Follet-Gueye, M.-L., and Driouich, A. (2010). Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 64, 977–989.
- Choe, S., Dilkes, B.P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., and Feldmann, K.A. (1998). The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 10, 231–243.
- Chormova, D., and Fry, S.C. (2016). Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted in vitro by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins. *New Phytol.* 209, 241–251.
- Choudhary, P., Saha, P., Ray, T., Tang, Y., Yang, D., and Cannon, M.C. (2015). EXTENSIN18 is required for full male fertility as well as normal vegetative growth in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 6.



Chuprov–Netochin, R., Neskorođov, Y., Marusich, E., Mishutkina, Y., Volynchuk, P., Leonov, S., Skryabin, K., Ivashenko, A., Palme, K., and Touraev, A. (2016). Novel small molecule modulators of plant growth and development identified by high-content screening with plant pollen. *BMC Plant Biol.* 16.

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

Cosgrove, D.J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407, 321–326.

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

Cosson, P., de Curtis, I., Pouysségur, J., Griffiths, G., and Davoust, J. (1989). Low cytoplasmic pH inhibits endocytosis and transport from the trans-Golgi network to the cell surface. *J. Cell Biol.* 108, 377–387.

Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. *In* HJ Gibert, G Davies, B Henrissat, B Svensson, eds, *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 3–12

Crawford, B.C.W., and Yanofsky, M.F. (2008). The Formation and Function of the Female Reproductive Tract in Flowering Plants. *Curr. Biol.* 18, R972–R978.

## D

Daher, F.B., and Braybrook, S.A. (2015). How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Front. Plant Sci.* 6.

Dai, S., Li, L., Chen, T., Chong, K., Xue, Y., and Wang, T. (2006). Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. *Proteomics* 6, 2504–2529.

Dardelle, F., Lehner, A., Ramdani, Y., Bardor, M., Lerouge, P., Driouich, A., and Mollet, J.-C. (2010). Biochemical and Immunocytological Characterizations of *Arabidopsis* Pollen Tube Cell Wall. *PLANT Physiol.* 153, 1563–1576.

Dardelle, F., (2011). Etude des mécanismes d'adhésion des tubes polliniques d'*Arabidopsis thaliana* par une approche de génétique chimique. Thèse de doctorat en biologie. Université de Rouen.

Dardelle, F., Le Mauff, F., Lehner, A., Loutelier-Bourhis, C., Bardor, M., Rihouey, C., Causse, M., Lerouge, P., Driouich, A., and Mollet, J.-C. (2015). Pollen tube cell walls of wild and domesticated tomatoes contain arabinosylated and fucosylated xyloglucan. *Ann. Bot.* 115, 55–66.

Darwin C. (1876). The effects of outcross and self-fertilization in the vegetable kingdom. London: Murray.

de Graaf, B.H.J. (2005). Rab11 GTPase-Regulated Membrane Trafficking Is Crucial for Tip-Focused Pollen Tube Growth in Tobacco. *Plant Cel.* 17, 2564–2579.

De Nettancourt, D. (2001). Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. (Berlin: Springer-Verlag).

Dearnaley, J.D.W., and Daggard, G.A. (2001). Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. *Sex. Plant Reprod.* 13, 265–271.

Decker, E.L., Frank, W., Sarnighausen, E., and Reski, R. (2006). Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biol. Stuttg. Ger.* 8, 397–405.

Dejonghe, W., and Russinova, E. (2014). Target identification strategies in plant chemical biology. *Front. Plant Sci.* 5.

- 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. (1987). Cellulose biosynthesis. *J. Exp. Plant Physiol.* 38, 259–290.
- Derksen J., Rutten T., Vanamstel T., Dewin A., Doris F., Steer M. (1995) Regulation of pollen tube growth. *Acta Bot. Neerl.* 44, 93–119
- Dhonukshe, P., Baluska, F., Schlicht, M., Hlavacka, A., Samaj, J., Friml, J., and Gadella, T.W.J. (2006). Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Dev. Cell* 10, 137–150.
- Dixit, R., Rizzo, C., Nasrallah, M., and Nasrallah, J. (2001). The brassica MIP-MOD gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis. *Plant Mol. Biol.* 45, 51–62.
- Doblin, M.S., De Melis, L., Newbigin, E., Bacic, A., and Read, S.M. (2001). Pollen tubes of *Nicotiana glauca* express two genes from different beta-glucan synthase families. *Plant Physiol.* 125, 2040–2052.
- Doblin, M.S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., and Delmer, D.P. (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* 43, 1407–1420.
- Domingos, P., Prado, A.M., Wong, A., Gehring, C., and Feijo, J.A. (2015). Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Mol Plant.* 8, 506–520.
- Dong, J., Kim, S.T., and Lord, E.M. (2005). Plantacyanin Plays a Role in Reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138, 778–789.
- Drakakaki, G. (2015). Polysaccharide deposition during cytokinesis: Challenges and future perspectives. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 236, 177–184.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.-L., Bernard, S., Kousar, S., Chevalier, L., Vicré-Gibouin, M., and Lerouxel, O. (2012). Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Front. Plant Sci.* 3, 79.
- Duan, Q., Kita, D., Johnson, E.A., Aggarwal, M., Gates, L., Wu, H.-M., and Cheung, A.Y. (2014). Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 5, ncomms4129.
- Dube, F., Dufresne, L., Coutu, L., and Clotteau, G. (1991). Protein phosphorylation during activation of surf clam oocytes. *Dev. Biol.* 146, 473–482.
- Dumas, C., Knox, R. B. and T. Gaude. 1985. The spatial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain of *Brassica*. *Protoplasma* 124: 168–174.
- Dumont, M., Lehner, A., Bouton, S., Kiefer-Meyer, M.C., Voxeur, A., Pelloux, J., Lerouge, P., and Mollet, J.-C. (2014). The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. *Ann. Bot.* 114, 1177–1188.
- Durand, C., Vicre-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.

## E

- Ebringerová, A. (2005). Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromol. Symp.* 232, 1–12.

Edlund, A.F. (2004). Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *Plant Cell*. 16, S84–S97.

Edmonds, B.T., Murray, J., and Condeelis, J. (1995). pH regulation of the F-actin binding properties of Dictyostelium elongation factor 1 alpha. *J. Biol. Chem.* 270, 15222–15230.

Esau, K. (1977). *Anatomy of seed plants*. Wiley, New York, NY.

Escobar-Restrepo, J.-M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.-C., and Grossniklaus, U. (2007). The FERONIA Receptor-like Kinase Mediates Male-Female Interactions During Pollen Tube Reception. *Science*. 317, 656–660.

## F

Feijó, J.A., Sainhas, J., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (1999). Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J. Cell Biol.* 144, 483–496.

Feijó, J.A., Sainhas, J., Holdaway-Clarke, T., Cordeiro, M.S., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (2000). Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube paradigm. *BioEssays*. 23, 86–94.

Ferguson C, Teeri TT, Siika AM, Read SM, Bacic A (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 206: 452–460

Figueiredo, D.D., and Köhler, C. (2016). Bridging the generation gap: communication between maternal sporophyte, female gametophyte and fertilization products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 29, 16–20.

Firon, N., Nepi, M., and Pacini, E. (2012). Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Ann. Bot.* 109, 1201–1214.

Forrest, K.L., and Bhavé, M. (2008). The PIP and TIP aquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features. *Funct. Integr. Genomics* 8, 115–133.

Foyer, C.H., and Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 28, 1056–1071.

Francis, K.E., Lam, S.Y., and Copenhaver, G.P. (2006). Separation of Arabidopsis Pollen Tetrads Is Regulated by QUARTET1, a Pectin Methyltransferase Gene. *PLANT Physiol.* 142, 1004–1013.

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

Franklin-Tong, V.E. (1999). Signaling in pollination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 490–495.

Fry SC. (1989) Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. *Physiologia Plantarum*, 75:532–536.

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

Fry, S.C. (1995). Polysaccharide-Modifying Enzymes in the Plant Cell Wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 497–520.

Fry, S.C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.* 332, 507.

Fu, Y., Wu, G., and Yang, Z. (2001). Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J. Cell Biol.* 152, 1019–1032.

Fu, Y., Li, H., and Yang, Z. (2002). The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine f-actin and the early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis. *Plant Cell*. 14,777–794.

Funakawa, H., and Miwa, K. (2015). Synthesis of borate cross-linked rhamnogalacturonan II. *Front. Plant Sci.* 6.

## G

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. *Plant Mol. Biol.* 47, 161–176.

Geitmann, A. (1999). The Rheological Properties of the Pollen Tube Cell Wall. In *Fertilization in Higher Plants*, M. Cresti, G. Cai, and A. Moscatelli, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 283–302.

Geitmann, A., Snowman, B.N., Emons, A.M.C., and Franklin-Tong, V.E. (2000). Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell*. 12, 1239–1251.

Geitmann, A., and Steer, M. (2006). The architecture and properties of the pollen tube cell wall. In *The Pollen Tube*, R. Malhó, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 177–200.

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

Gibbon, B.C., Kovar, D.R., and Staiger, C.J. (1999). Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 11, 2349–2363.

Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M.A., and Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* 1696, 245–252.

Gluck, S., Cannon, C., and Al-Awqati, Q. (1982). Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of H<sup>+</sup> pumps into the luminal membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 4327–4331.

Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*. 5, 1003–1011.

Gou, J.-Y., Miller, L.M., Hou, G., Yu, X.-H., Chen, X.-Y., and Liu, C.-J. (2012). Acetylsterase-Mediated Deacetylation of Pectin Impairs Cell Elongation, Pollen Germination, and Plant Reproduction. *Plant Cell* 24, 50–65.

Goubet, F., Jackson, P., Deery, M.J., and Dupree, P. (2002). Polysaccharide Analysis Using Carbohydrate Gel Electrophoresis: A Method to Study Plant Cell Wall Polysaccharides and Polysaccharide Hydrolases. *Anal. Biochem.* 300, 53–68.

Goubet, F., Morriswood, B., and Dupree, P. (2003). Analysis of methylated and unmethylated polygalacturonic acid structure by polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 321, 174–182.

Grandin, N., Rolland, J.-P., and Charbonneau, M. (1991). Changes in intracellular pH following egg activation and during the early cell cycle of the amphibian *Pleurodeles waltlii*, coincide with changes in MPF activity. *Biol. Cell* 72, 259–267.

Grierson, C., Nielsen, E., Ketelaarc, T., and Schiefelbein, J. (2014). Root Hairs. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 12.

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

Gu, Y., Vernoud, V., Fu, Y., and Yang, Z. (2003). ROP GTPase Regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-Actin. *J. Exp. Plant Biol.* 54: 93–101.

Gu, Y., Fu, Y., Dowd, P., Li, S., Vernoud, V., Gilroy, S., and Yang, Z. (2005). A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J. Cell Biol.* 169, 127–138.

Guan, Y., Guo, J., Li, H., and Yang, Z. (2013). Signaling in Pollen Tube Growth: Crosstalk, Feedback, and Missing Links. *Mol. Plant* 6, 1053–1064.

Guan, Y., Lu, J., Xu, J., McClure, B., and Zhang, S. (2014). Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in *Arabidopsis*. *PLANT Physiol.* 165, 528–533.

Guern, J., Felle, H., Mathieu, Y., and Kurkdjian, A. (1991). Regulation of Intracellular pH in Plant Cells. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 111–173.

Guignard L., 1899.- Sur les antherozoïdes et la double copulation sexuelle chez les végétaux angiospermes. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 128, 864-871.

Guillemin, F., Guillon, F., Bonnin, E., Devaux, M.-F., Chevalier, T., Knox, J.P., Liners, F., and Thibault, J.-F. (2005). Distribution of pectic epitopes in cell walls of the sugar beet root. *Planta* 222, 355–371.

Guo, F.-Q., Okamoto, M., and Crawford, N.M. (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302, 100–103.

## H

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1–85.

Hao, H., Chen, T., Fan, L., Li, R., and Wang, X. (2013). 2, 6-dichlorobenzonitrile Causes Multiple Effects on Pollen Tube Growth beyond Altering Cellulose Synthesis in *Pinus bungeana* Zucc. *PLoS ONE* 8, e76660.

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

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

Hartman, E., Levy, C., Kern, D.M., Johnson, M.A., and Basu, A. (2014). A rapid, inexpensive, and semi-quantitative method for determining pollen tube extension using fluorescence. *Plant Methods* 10, 3.

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

Hasegawa Y, Nakamura S, Kakizoe S, Sato M, Nakamura N (1998) Immunocytochemical and chemical analyses of Golgi vesicles isolated from the germinated pollen of *Camellia japonica*. *J Plant Res* 111: 421–429

Haworth WN. (1932) Molecular structure of cellulose and of amylose. *Nature* 129: 365

He, Z.H., Fujiki, M., and Kohorn, B.D. (1996) A Cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *JBC*. 271, 19789–19793.

Hepler, P.K., Vidali, L., and Cheung, A.Y. (2001). Polarized Cell Growth in Higher Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 159–187.

Hepler, P.K., and Winship, L.J. (2015). The pollen tube clear zone: Clues to the mechanism of polarized growth: Differential organelle movement creates a clear zone. *J. Integr. Plant Biol.* 57, 79–92.

Heslop-Harrison, Y., and Shivanna, K.R. (1977). The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma. *Ann. Bot.* 41, 1233–1258.

Heslop-Harrison, Y. (2000). Control Gates and Micro-ecology: The Pollen-Stigma Interaction in Perspective. *Ann. Bot.* 85, 5–13.

Hesse, M., Halbritter, H., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., Ulrich, S., and Zetter, R. (2009). *Pollen Terminology: An illustrated handbook* (Springer Science & Business Media).

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

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

Holdaway-Clarke, T.L., Feijó, J.A., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (1997). Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell Online* 9, 1999–2010.

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

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

Hou, Y., Guo, X., Cyprys, P., Zhang, Y., Bleckmann, A., Cai, L., Huang, Q., Luo, Y., Gu, H., Dresselhaus, T., et al. (2016). Maternal ENODLs Are Required for Pollen Tube Reception in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* CB 26, 2343–2350.

Huang, L., Ye, Y., Zhang, Y., Zhang, A., Liu, T., and Cao, J. (2009). BcMF9, a novel polygalacturonase gene, is required for both *Brassica campestris* intine and exine formation. *Ann. Bot.* 104, 1339–1351.

I

Ikeda, S., Nasrallah, J.B., Dixit, R., Preiss, S., and Nasrallah, M.E. (1997). An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* 276, 1564–1566.

Insee (2009) Institut nationale des statistiques et des études économiques ([www.insee.fr](http://www.insee.fr))

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.

Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F.-S., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A., and Isogai, A. (2004).  $Ca^{2+}$  Dynamics in a Pollen Grain and Papilla Cell during Pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136, 3562–3571.

J

Jaffe, L.A., Weisenseel, M.H., and Jaffe, L.F. (1975) Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes. *JCB.* 67, 488-492.

- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., and Pont-Lezica, R.F. (2006). Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* 11, 33–39.
- Jang, J.Y., Rhee, J.Y., Chung, G.C., and Kang, H. (2012). Aquaporin as a membrane transporter of hydrogen peroxide in plant response to stresses. *Plant Signal. Behav.* 7, 1180–1181.
- 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.
- Jauh, G.Y., Eckard, K.J., Nothnagel, E.A., and Lord, E.M. (1997). Adhesion of lily pollen tubes on an artificial matrix. *Sex. Plant Reprod.* 10, 173–180.
- Jiang, L., Yang, S.-L., Xie, L.-F., Pua, C.S., Zhang, X.-Q., Yang, W.-C., Sundaresan, V., and Ye, D. (2005). VANGUARD1 Encodes a Pectin Methyltransferase That Enhances Pollen Tube Growth in the Arabidopsis Style and Transmitting Tract. *Plant Cell Online* 17, 584–596.
- Johnson, K.L., Jones, B.J., Bacic, A., and Schultz, C.J. (2003). The fasciclin-like arabinogalactan proteins of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiol.* 133, 1911–1925.
- Johnson, M.A., and Lord, E. (2006). Extracellular guidance cues and intracellular signaling pathways that direct pollen tube growth. In *The Pollen Tube*, (Springer), pp. 223–242.
- Johnson, J.W., Fisher, J.F., and Mobashery, S. (2013). Bacterial cell-wall recycling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277, 54–75.
- Johnson-Brousseau, S.A., and McCormick, S. (2004). A compendium of methods useful for characterizing Arabidopsis pollen mutants and gametophytically-expressed genes. *Plant Journal.* 39, 761–775.
- Jones, M.A., Shen, J.J., Fu, Y., Li, H., Yang, Z., and Grierson, C.S. (2002). The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell.* 14, 763–776.
- Jones, L., Milne, J.L., Ashford, D., and McQueen-Mason, S.J. (2003). Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11783–11788.
- K**
- Kandasamy, M.K., Nasrallah, J.B., and Nasrallah, M.E. (1994). Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in Arabidopsis. *Development* 120, 3405–3418.
- Kang, B.-H., Nielsen, E., Preuss, M.L., Mastrorade, D., and Staehelin, L.A. (2011). Electron tomography of RabA4b- and PI-4K $\beta$ 1-labeled trans Golgi network compartments in Arabidopsis. *Traffic Cph. Den.* 12, 313–329.
- Kasahara, R.D., Maruyama, D., Hamamura, Y., Sakakibara, T., Twell, D., and Higashiyama, T. (2012). Fertilization recovery after defective sperm cell release in Arabidopsis. *Curr. Biol.* CB 22, 1084–1089.
- Kaschani, F., and van der Hoorn, R. (2007). Small molecule approaches in plants. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 88–98.
- Katiferi, E., Alben, S., Cerda, E., Nelson, D.R., and Dumais, J. (2010). Foldable structures and the natural design of pollen grains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 7635–7639.
- Kaya, H., Iwano, M., Takeda, S., Kanaoka, M.M., Kimura, S., Abe, M., and Kuchitsu, K. (2015). Apoplastic ROS production upon pollination by RbohH and RbohJ in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* 10, e989050.
- Kefeli, V.I., and Kutacek, M. (1977). Phenolic Substances and Their Possible Role in Plant Growth Regulation. In *Plant Growth Regulation*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 181–188.

- Keijzer, C.J. (1987). The Processes of Anther Dehiscence and Pollen Dispersal. *New Phytol.* 105, 499–507.
- Kessler, S.A., Shimosato-Asano, H., Keinath, N.F., Wuest, S.E., Ingram, G., Panstruga, R., and Grossniklaus, U. (2010). Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science* 330, 968–971.
- Kiefer L., York W., Darvill A., Albersheim P. (1989). Xyloglucan isolated from suspension-cultured sycamore cell walls is O-acetylated. *Phytochemistry* 28: 2105–2107
- Kim, S., Dong, J., and Lord, E.M. (2004). Pollen Tube Guidance: The Role of Adhesion and Chemotropic Molecules. *Curr. Top. Dev. Biol.* 61, 61–79.
- Kim, S.-J., and Brandizzi, F. (2014). The plant secretory pathway: an essential factory for building the plant cell wall. *Plant Cell Physiol.* 55, 687–693.
- Kitazawa, K., Tryfona, T., Yoshimi, Y., Hayashi, Y., Kawauchi, S., Antonov, L., Tanaka, H., Takahashi, T., Kaneko, S., Dupree, P., et al. (2013).  $\beta$ -galactosyl Yariv reagent binds to the  $\beta$ -1,3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiol.* 161, 1117–1126.
- Klahre, U., and Kost, B. (2006). Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of tobacco pollen tubes. *Plant Cell.* 18, 3033–3046.
- Klavons, J.A., and Bennett, R.D. (1986). Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *J. Agric. Food Chem.* 34, 597–599.
- Knoth, C., Salus, M.S., Girke, T., and Eulgem, T. (2009). The Synthetic Elicitor 3,5-Dichloroanthranilic Acid Induces NPR1-Dependent and NPR1-Independent Mechanisms of Disease Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 150, 333–347.
- Knox, J.P., Linstead, P.J., Peart, J., Cooper, C., and Roberts, K. (1991). Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 1, 317–326.
- Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K., and Ohta, H. (2004). Arabidopsis type b monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiology.* 134, 640-648.
- Kobayashi, M., Kouzu, N., Inami, A., Toyooka, K., Konishi, Y., Matsuoka, K., and Matoh, 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.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19, 415–421.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1995). Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 409–416.
- Koffi, K.L., Yapo, B., and Besson, V. (2013). Extraction and characterization of gelling pectin from the peel of *Poncirus trifoliata* fruit. *Agric. Sci.* 04, 614–619.
- Kohorn, B.D., and Kohorn, S.L. (2012). The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front. Plant Sci.* 3.
- Kohorn, B.D., Kohorn, S.L., Saba, N.J., and Meco-Martinez, V. (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.* jbc.M114.567545.



Kolb, P., Ferreira, R.S., Irwin, J.J., and Shoichet, B.K. (2009). Docking and chemoinformatic screens for new ligands and targets. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 429–436.

Kombrink, E., and Kaiser, M. (2016). Editorial: When Chemistry Meets Biology – Generating Innovative Concepts, Methods and Tools for Scientific Discovery in the Plant Sciences. *Front. Plant Sci.* 7.

Kong, Y., Zhou, G., Yin, Y., Xu, Y., Pattathil, S., and Hahn, M.G. (2011). Molecular analysis of a family of Arabidopsis genes related to galacturonosyltransferases. *Plant Physiol.* 155, 1791–1805.

Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Toliás, K., Carpenter, C., and Chua, N.H. (1999). Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *JCB.* 145, 317–330.

Kotake, T., Li, Y.-Q., Takahashi, M., and Sakurai, N. (2000). Characterization and function of wall-bound exo- $\beta$ -glucanases of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 13, 1–9.

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

Kutschera, U. (2008). The Growing Outer Epidermal Wall: Design and Physiological Role of a Composite Structure. *Ann. Bot.* 101, 615–621.

## L

Lahaye, M., Vigouroux, J., and Thibault, J.-F. (1991). Endo- $\beta$ -1,4-d-galactanase from *Aspergillus niger* var. *aculeatus*: Purification and some properties. *Carbohydr. Polym.* 15, 431–444.

Lampert, D.T.A. (1963). Oxygen Fixation into Hydroxyproline of Plant Cell Wall Protein. *J. Biol. Chem.* 238, 1438–1440.

Lampert, D.T. (2001). Life behind cell walls: paradigm lost, paradigm regained. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 1363–1385.

Lampert, D.T.A., Kieliszewski, M.J., Chen, Y., and Cannon, M.C. (2011). Role of the Extensin Superfamily in Primary Cell Wall Architecture1. *Plant Physiol.* 156, 11–19.

Lampugnani, E.R., Moller, I.E., Cassin, A., Jones, D.F., Koh, P.L., Ratnayake, S., Beahan, C.T., Wilson, S.M., Bacic, A., and Newbigin, E. (2013). In Vitro Grown Pollen Tubes of *Nicotiana glauca* Actively Synthesize a Fucosylated Xyloglucan. *PLoS ONE* 8, e77140.

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

Lässig, R., Gutermuth, T., Bey, T.D., Konrad, K.R., and Romeis, T. (2014). Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant J.* 78, 94–106.

Leboeuf, E. (2005). Biochemical and immunohistochemical analysis of pectic polysaccharides in the cell walls of Arabidopsis mutant QUASIMODO 1 suspension-cultured cells: implications for cell adhesion. *J. Exp. Bot.* 56, 3171–3182.

Lee, S.-J., Saravanan, R.S., Damasceno, C.M.B., Yamane, H., Kim, B.-D., and Rose, J.K.C. (2004). Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 42, 979–988.

Lee, Y.J., Szumlanski, A., Nielsen, E., and Yang, Z. (2008). Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth. *J. Cell Biol.* 181, 1155–1168.

- Lee, K.J.D., Marcus, S.E., and Knox, J.P. (2011). Cell Wall Biology: Perspectives from Cell Wall Imaging. *Mol. Plant* 4, 212–219.
- Lehner, A., Dardelle, F., Soret-Morvan, O., Lerouge, P., Driouich, A., and Mollet, J.-C. (2010). Pectins in the cell wall of *Arabidopsis thaliana* pollen tube and pistil. *Plant Signal. Behav.* 5, 1282–1285.
- Lehner, A., Menu-Bouaouiche, L., Dardelle, F., Le Mauff, F., Driouich, A., Lerouge, P., and Mollet, J.-C. (2015). In silico prediction of proteins related to xyloglucan fucosyltransferases in Solanaceae genomes. *Plant Signal. Behav.* 10, e1026023.
- Leroux, C., Bouton, S., Kiefer-Meyer, M.-C., Fabrice, T.N., Mareck, A., Guénin, S., Fournet, F., Ringli, C., Pelloux, J., Driouich, A., et al. (2015). PECTIN METHYLESTERASE48 Is Involved in *Arabidopsis* Pollen Grain Germination. *Plant Physiol.* 167, 367–380.
- Lerouxel, O., Choo, T.S., Séveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P., and Pauly, M. (2002). Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol.* 130, 1754–1763.
- Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H., and Keegstra, K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 621–630.
- Leydon, A.R., Chaibang, A., and Johnson, M.A. (2014). Interactions between pollen tube and pistil control pollen tube identity and sperm release in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 340–345.
- Li, Y.-Q., Faleri, C., Geitmann, A., Zhang, H.-Q., and Cresti, M. (1995). Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma* 189, 26–36.
- Li, H., Lin, Y., Heath, R.M., Zhu, M.X., and Yang, Z. (1999). Control of pollen tube tip growth by a rop gtpase dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell.* 11, 1731–1742.
- Li, Y., Zee, S.Y., Liu, Y.M., Huang, B.Q., and Yen, L.F. (2001). Circular F-actin bundles and a G-actin gradient in pollen and pollen tubes of *Lilium davidii*. *Planta.* 213, 722–730.
- Liepman, A.H., Wightman, R., Geshi, N., Turner, S.R., and Scheller, H.V. (2010). *Arabidopsis* - a powerful model system for plant cell wall research. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 61, 1107–1121.
- Lindner, H., Kessler, S.A., Müller, L.M., Shimosato-Asano, H., Boisson-Dernier, A., and Grossniklaus, U. (2015). TURAN and EVAN Mediate Pollen Tube Reception in *Arabidopsis* Synergids through Protein Glycosylation. *PLOS Biol.* 13, e1002139.
- Lionetti, V., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2015). A lower content of de-methylesterified homogalacturonan improves enzymatic cell separation and isolation of mesophyll protoplasts in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* 112, 188–194.
- 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.
- Liu, Y. (2016). The plant ovule omics: an integrative approach for pollen- pistil interactions and pollen tube guidance studies in solanaceous species.
- Lomenick, B., Olsen, R.W., and Huang, J. (2011). Identification of Direct Protein Targets of Small Molecules. *ACS Chem. Biol.* 6, 34–46.

- Longland, J.M., Fry, S.C., and Trewavas, A.J. (1989). Developmental control of apiogalacturonan biosynthesis and UDP-apiose production in a duckweed. *Plant Physiol.* 90, 972–976.
- Lord, E.M., Walling, L.L., and Jauh, G.Y. (1996). Cell adhesion in plants and its role in pollination. In *Membranes: Specialized Functions in Plants*, M. Smallwood, J.P. Knox, and D.J. Bowles, eds (Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers). 21–37.
- Lord, E. (2000). Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends Plant Sci.* 5, 368–373.
- Lord, E.M. (2003). Adhesion and guidance in compatible pollination. *J. Exp. Bot.* 54, 47–54.
- Lord, E.M., and Russell, S.D. (2002). The Mechanisms of Pollination and Fertilization in Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 81–105.
- Losch R. (1999) Plant water relations. In: Luttge U., editor. *Progress in botany, cell biology and physiology*. Berlin: Springer-Verlag. 60, 193–233.
- Lou, Y., Xu, X.-F., Zhu, J., Gu, J.-N., Blackmore, S., and Yang, Z.-N. (2014). The tapetal AHL family protein TEK determines nexine formation in the pollen wall. *Nat. Commun.* 5.
- Lovy-Wheeler, A., Wilsen, K.L., Baskin, T.I., and Hepler, P.K. (2005). Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta.* 221, 95–104.
- Luu, D.T., Marty-Mazars, D., Trick, M., Dumas, C., and Heizmann, P. (1999). Pollen-stigma adhesion in *Brassica* spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. *Plant Cell* 11, 251–262.

## M

- M'sakni, N.H., Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Rihouey, C., and Morvan, C. (2006). Composition, structure and solution properties of polysaccharides extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Eur. Polym. J.* 42, 786–795.
- MacAlister, C.A., Ortiz-Ramírez, C., Becker, J.D., Feijó, J.A., and Lippman, Z.B. (2016). Hydroxyproline O-arabinosyltransferase mutants oppositely alter tip growth in *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 85, 193–208.
- Macquet, A., Ralet, M.-C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A., and North, H.M. (2007). In situ, Chemical and Macromolecular Study of the Composition of *Arabidopsis thaliana* Seed Coat Mucilage. *Plant Cell Physiol.* 48, 984–999.
- Majewska-Sawka, A., and Nothnagel, E.A. (2000). The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.* 122, 3–10.
- Malho, R., Read, N.D., Trewavas, A.J., and Pais, M.S. (1995). Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *Plant Cell.* 8, 1173–84.
- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., and Willats, W.G.T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Front. Plant Sci.* 5.
- Marin-Olivier, M., Chevalier, T., Fobis-Loisy, I., Dumas, C., and Gaude, T. (2000). Aquaporin PIP genes are not expressed in the stigma papillae in *Brassica oleracea*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 24, 231–240.
- Maruyama, D., Hamamura, Y., Takeuchi, H., Susaki, D., Nishimaki, M., Kurihara, D., Kasahara, R.D., and Higashiyama, T. (2013). Independent control by each female gamete prevents the attraction of multiple pollen tubes. *Dev. Cell* 25, 317–323.
- Mascarenhas, J.P. (1993). Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *PLANT CELL ONLINE* 5, 1303–1314.

- 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.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.-T., and Santoni, V. (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 595–624.
- McCann, M.C., and Carpita, N.C. (2008). Designing the deconstruction of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 314–320.
- McCartney, L., and Knox, J.P. (2002). Regulation of pectic polysaccharide domains in relation to cell development and cell properties in the pea testa. *J. Exp. Bot.* 53, 707–713.
- McCartney, L., Ormerod, A.P., Gidley, M.J., and Knox, J.P. (2000). Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-beta-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 22, 105–113.
- McCourt, P., and Desveaux, D. (2010). Plant chemical genetics. *New Phytol.* 185, 15–26.
- McNeil, M., Darvill, A.G. and Albersheim, P. (1980) Structure of plant cell walls: X Rhamnogalacturonan I. A structurally complex pectic polysaccharide in the the cell wall of suspension cultured sycamore cells. *Plant physiol.* 66. 1128-1134.
- Messerli, M.A., Créton, R., Jaffe, L.F., and Robinson, K.R. (2000). Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during pollen tube growth. *Dev. Biol.* 222, 84–98.
- Miart, F., Desprez, T., Biot, E., Morin, H., Belcram, K., Höfte, H., Gonneau, M., and Vernhettes, S. (2014). Spatio-temporal analysis of cellulose synthesis during cell plate formation in Arabidopsis. *Plant J.* 77, 71–84.
- Michard, E., Lima, P.T., Borges, F., Silva, A.C., Portes, M.T., Carvalho, J.E., Gilliam, M., Liu, L.-H., Obermeyer, G., and Feijó, J.A. (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* 332, 434–437.
- Micheli, F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6, 414–419.
- Mignot, A., Hoss, C., Dajoz, I., Leuret, C., Henry, J.-P., Dreuillaux, J.-M., Heberle-Bors, E., and Till-Bottraud, I. (1994). Pollen aperture polymorphism in the Angiosperms: importance, possible causes and consequences. *Acta Bot. Gallica* 141, 109–122.
- Miller, A.R. (1986). Oxidation of cell wall polysaccharides by hydrogen peroxide: a potential mechanism for cell wall breakdown in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 238–244.
- Miller, D.D., Lancelle, S.A., and Hepler, P.K. (1996). Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma* 195, 123–132.
- Mitchison, T.J. (1994). Towards a pharmacological genetics. *Chem. Biol.* 1, 3–6.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300–309.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882–887.
- Mizukami, A.G., Inatsugi, R., Jiao, J., Kotake, T., Kuwata, K., Ootani, K., Okuda, S., Sankaranarayanan, S., Sato, Y., Maruyama, D., et al. (2016). The AMOR Arabinogalactan Sugar Chain Induces Pollen-Tube Competency to Respond to Ovular Guidance. *Curr. Biol.* 26, 1091–1097.

- Mogami, N., Miyamoto, M., Onozuka, M., and Nakamura, N. (2006). Comparison of callose plug structure between dicotyledon and monocotyledon pollen germinated in vitro. *Grana*. 45, 249–256.
- Mogensen, H.L. (1992) The male germ unit: concept, composition and signification. *Int. Rev Cytol.* 140, 129-147.
- Mohnen, D. (1999). Biosynthesis of pectins and galactomannans. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 3, D. Barton, K. Nakanishi, and O. Meth-Cohn, eds (Amsterdam: Elsevier). 497–527.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266–277.
- Molendijk, A.J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C.S.V., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S., and Palme, K. (2001). *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO*. 20, 2779–2788.
- Moller, I., Sørensen, I., Bernal, A.J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., et al. (2007). High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays: Glycan microarrays for plant cell-wall analysis. *Plant J.* 50, 1118–1128.
- Moller, I., Marcus, S.E., Haeger, A., Verherbruggen, Y., Verhoef, R., Schols, H., Ulvskov, P., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., and Willats, W. (2008). High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. *Glycoconj. J.* 25, 37–48.
- Mollet, J.C., Park, S.Y., Nothnagel, E.A., and Lord, E.M. (2000). A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* 12, 1737–1750.
- Mollet, J.-C., Kim, S., Jauh, G.-Y., and Lord, E.M. (2002). Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma* 219, 89–98.
- Mollet JC, Faugeron C, Morvan H. (2007) Cell adhesion, separation and guidance in compatible plant reproduction. *Annual Plant Reviews.* 25, 69–90.
- 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.
- Moore, P.J., and Staehelin, L.A. (1988). Immunogold localization of the cell-wall-matrix polysaccharides rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L.; implication for secretory pathways. *Planta* 174, 433–445.
- 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.
- Mounet-Gilbert, L., Dumont, M., Ferrand, C., Bournonville, C., Monier, A., Jorly, J., Lemaire-Chamley, M., Mori, K., Atienza, I., Hernould, M., et al. (2016). Two tomato GDP-D-mannose epimerase isoforms involved in ascorbate biosynthesis play specific roles in cell wall biosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* 67, 4767–4777.
- Mueller, S.C., and Brown, R.M. (1980). Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J. Cell Biol.* 84, 315–326.
- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R.A.M., Fry, S.C., Krieger-Liszkay, A., and Leubner-Metzger, G. (2009). In Vivo Cell Wall Loosening by Hydroxyl Radicals during Cress Seed Germination and Elongation Growth. *Plant Physiol.* 150, 1855–1865.

## N

Nakamura, H., and Asami, T. (2014). Target sites for chemical regulation of strigolactone signaling. *Front. Plant Sci.* 5.

Nakayama, K., Maeda, Y., and Jigami, Y. (2003). Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3,5-epimerase-4-reductase with GDP-mannose-4,6-dehydratase stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose. *Glycobiology* 13, 673–680.

Nasrallah, J., and Nasrallah, M. (1993). Pollen[mdash]Stigma Signaling in the Sporophytic Self-Incompatibility Response. *Plant Cell* 5, 1325–1335.

Nawaschin S.G., 1898.- Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bull. Acad. Imp. Sci. St Petersburg*, 9, 377-382.

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

Nguema-Ona, E., Andème-Onzighi, C., Aboughe-Angone, S., Bardor, M., Ishii, T., Lerouge, P., and Driouich, A. (2006). The reb1-1 mutation of Arabidopsis. Effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 140, 1406–1417.

Nguema-Ona, E., Coimbra, S., Vire-Gibouin, M., Mollet, J.-C., and Driouich, A. (2012). Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Ann. Bot.* 110, 383–404.

Nishikawa, S., Zinkl, G.M., Swanson, R.J., Maruyama, D., and Preuss, D. (2005). Callose ( $\beta$ -1,3 glucan) is essential for Arabidopsis pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* 5, 22.

Nissen, K.S., Willats, W.G.T., and Malinovsky, F.G. (2016). Understanding CrRLK1L Function: Cell Walls and Growth Control. *Trends Plant Sci.* 21, 516–527.

Nothnagel, E.A. (1997). Proteoglycans and related components in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 174, 195–291.

Noutoshi, Y., Okazaki, M., Kida, T., Nishina, Y., Morishita, Y., Ogawa, T., Suzuki, H., Shibata, D., Jikumaru, Y., Hanada, A., et al. (2012). Novel Plant Immune-Priming Compounds Identified via High-Throughput Chemical Screening Target Salicylic Acid Glucosyltransferases in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 3795–3804.

Numan, M.T., and Bhosle, N.B. (2006). Alpha-L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 247–260.

## O

O'Neill, M., Albersheim, P., and Darvill, A. (1990). The Pectic Polysaccharides of Primary Cell Walls. *Carbohydrates.* 2, 415.

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.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.

Obel, N., Neumetzler, L., and Pauly, M. (2007). Hemicelluloses and cell expansion. In *The Expanding Cell*, J.-P. Verbelen and K. Vissenberg, eds (Berlin: Springer-Verlag), pp. 57–88.

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

Obermeyer G, Weisenseel MH. (1991). Calcium channel blocker and calmodulin antagonists affect the gradient of free calcium ions in lily pollen tubes. *Eur J Cell Biol.* 2, 319-27.

Obermeyer, G., Lutzelschwab, M., Heumann, H.G., and Weisenseel, M.H. (1992). Immunolocalization of H<sup>+</sup>-ATPases in the plasma membrane of pollen grains and pollen tubes of *Lilium Longiflorum*. *Protoplasma.* 171, 55–63.

Okuda, S., and Higashiyama, T. (2010). Pollen tube guidance by attractant molecules: LUREs. *Cell Struct. Funct.* 35, 45–52.

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

O'Neill MA, York WS. (2003) The composition and structure of primary cell walls. Rose JKC, editor. , , *The Plant Cell Wall.* Blackwell Publishers, Oxford, pp 1–54

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.

Orfila, C., Seymour, G.B., Willats, W.G., Huxham, I.M., Jarvis, M.C., Dover, C.J., Thompson, A.J., and Knox, J.P. (2001). Altered Middle Lamella Homogalacturonan and Disrupted Deposition of (1→5)- $\alpha$ -l-Arabinan in the Pericarp of Cnr, a Ripening Mutant of Tomato. *Plant Physiol.* 126, 210–221.

Orfila, C., Huisman, M.M., Willats, W.G., Alebeek, G.-J.W. van, Schols, H.A., Seymour, G.B., and Knox, P.J. (2002). Altered cell wall disassembly during ripening of Cnr tomato fruit: implications for cell adhesion and fruit softening. *Planta* 215, 440–447.

Orfila, C., Sørensen, S.O., Harholt, J., Geshi, N., Crombie, H., Truong, H.-N., Reid, J.S.G., Knox, J.P., and Scheller, H.V. (2005). QUASIMODO1 is expressed in vascular tissue of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems, and affects homogalacturonan and xylan biosynthesis. *Planta* 222, 613–622.

Owen, H.A., and Makaroff, C.A. (1995). Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* 185, 7–21.

Oxley, D., and Bacic, A. (1999). Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14246–14251.

## P

Palanivelu, R., and Preuss, D. (2000). Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends Cell Biol.* 10, 517–524.

Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., and Preuss, D. (2003). Pollen Tube Growth and Guidance Is Regulated by POP2, an *Arabidopsis* Gene that Controls GABA Levels. *Cell* 114, 47–59.

Palanivelu, R., and Preuss, D. (2006). Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in vitro. *BMC Plant Biol.* 6, 7.

Palanivelu, R., and Tsukamoto, T. (2012). Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 96–113.

Papuga, J., Hoffmann, C., Dieterle, M., Moes, D., Moreau, F., Tholl, S., Steinmetz, A., and Thomas, C. (2010). *Arabidopsis* LIM Proteins: A Family of Actin Bundlers with Distinct Expression Patterns and Modes of Regulation. *Plant Cell* 22, 3034–3052.

- Park, S.-Y., Jauh, G.-Y., Mollet, J.-C., Eckard, K.J., Nothnagel, E.A., Walling, L.L., and Lord, E.M. (2000). A Lipid Transfer–like Protein Is Necessary for Lily Pollen Tube Adhesion to an in Vitro Styler Matrix. *Plant Cell Online* 12, 151–163.
- Park, S.-Y., and Lord, E.M. (2003). Expression studies of SCA in lily and confirmation of its role in pollen tube adhesion. *Plant Mol. Biol.* 51, 183–189.
- Park, J.-M., Jang, M.-U., Kang, J.-H., Kim, M.-J., Lee, S.-W., Song, Y.B., Shin, C.-S., Han, N.S., and Kim, T.-J. (2012). Detailed modes of action and biochemical characterization of endo-arabinanase from *Bacillus licheniformis* DSM13. *J. Microbiol. Seoul Korea* 50, 1041–1046.
- Parker, C.C., Parker, M.L., Smith, A.C., and Waldron, K.W. (2001). Pectin distribution at the surface of potato parenchyma cells in relation to cell-cell adhesion. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4364–4371.
- Parre, E., and Geitmann (2005a). More Than a Leak Sealant. The Mechanical Properties of Callose in Pollen Tubes. *PLANT Physiol.* 137, 274–286.
- Parre, E., and Geitmann, A. (2005b). Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta* 220, 582–592.
- Paynel, F., Leroux, C., Surcouf, O., Schaumann, A., Pelloux, J., Driouich, A., Mollet, J.C., Lerouge, P., Lehner, A., and Mareck, A. (2014). Kiwi fruit PME1 inhibits PME activity, modulates root elongation and induces pollen tube burst in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 74, 285–297.
- 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. CB* 21, 1720–1726.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., and Mellerowicz, E. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12, 267–277.
- Peña, M.J., and Carpita, N.C. (2004). Loss of Highly Branched Arabinans and Debranching of Rhamnogalacturonan I Accompany Loss of Firm Texture and Cell Separation during Prolonged Storage of Apple. *Plant Physiol.* 135, 1305–1313.
- Peng, L., Zhang, L., Cheng, X., Fan, L.-S., and Hao, H.-Q. (2013). Disruption of cellulose synthesis by 2,6-dichlorobenzonitrile affects the structure of the cytoskeleton and cell wall construction in *Arabidopsis*. *Plant Biol.* 15, 405–414.
- Pennell, R., Janniche, L., Kjellbom, P., Scofield, G., Peart, J., and Roberts, K. (1991). Developmental Regulation of a Plasma Membrane Arabinogalactan Protein Epitope in Oilseed Rape Flowers. *Plant Cell* 3, 1317–1326.
- Pereira, L.G., Coimbra, S., Oliveira, H., Monteiro, L., and Sottomayor, M. (2006). Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 223, 374–380.
- Pereira, A.M., Lopes, A.L., and Coimbra, S. (2016a). Arabinogalactan Proteins as Interactors along the Crosstalk between the Pollen Tube and the Female Tissues. *Front. Plant Sci.* 7.
- Pereira, A.M., Lopes, A.L., and Coimbra, S. (2016b). JAGGER, an AGP essential for persistent synergid degeneration and polytubey block in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 11.
- Pérez Di Giorgio, J.A., Soto, G.C., Muschietti, J.P., and Amodeo, G. (2016b). Pollen Aquaporins: The Solute Factor. *Front. Plant Sci.* 7.
- Perez Di Giorgio, J.A.P., Bienert, G.P., Ayub, N.D., Yaneff, A., Barberini, M.L., Mecchia, M.A., Amodeo, G., Soto, G.C., and Muschietti, J.P. (2016a). Pollen-Specific Aquaporins NIP4;1 and NIP4;2 Are Required for Pollen Development and Pollination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28, 1053–1077.



Persson, S., Paredez, A., Carroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., Khitrov, N., Auer, M., and Somerville, C.R. (2007). Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15566–15571.

Picton, J.M., and Steer, M.W. (1983). Membrane recycling and the control of secretory activity in pollen tubes. *J. Cell Sci.* 63, 303–310.

Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., Shipley, A.M., Rivers, B.A., Cresti, M., and Hepler, P.K. (1994). Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* 6, 1815–1828.

Pina, C., Pinto, F., Feijó, J.A., and Becker, J.D. (2005). Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol.* 138, 744–756.

Popper, Z.A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T., Tuohy, M.G., Kloareg, B., and Stengel, D.B. (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 567–590.

Potocký, M., Jones, M.A., Bezvoda, R., Smirnov, N., and Žárský, V. (2007). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol.* 174, 742–751.

Potocký, M., Pejchar, P., Gutkowska, M., Jiménez-Quesada, M.J., Potocká, A., Alché, J.D., Kost, B., and Žárský, V. (2012). NADPH Oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *Plant Physiol.* 169, 1654–1663.

Poulter, N.S., Staiger, C.J., Rappoport, J.Z., and Franklin-Tong, V.E. (2010). Actin-Binding Proteins Implicated in the Formation of the Punctate Actin Foci Stimulated by the Self-Incompatibility Response in *Papaver1[W]*. *Plant Physiol.* 152, 1274–1283.

Poulter, N.S., Bosch, M., and Franklin-Tong, V.E. (2011). Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of *Papaver* pollen. *Ann. Bot.* 108, 659–675.

Prado, A.M. (2004). Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development.* 131, 2707–2714.

Prado, A.M., Colaço, R., Moreno, N., Silva, A.C., and Feijó, J.A. (2008). Targeting of Pollen Tubes to Ovules Is Dependent on Nitric Oxide (NO) Signaling. *Mol. Plant.* 1, 703–714.

Prieu, C. (2015). Evolution et développement des grains de pollen chez les angiospermes. Thèse de doctorat en biologie. Université Paris-Saclay.

## Q

Qin, Y., and Yang, Z. (2011). Rapid tip growth: insights from pollen tubes. *Semin Cell Dev Biol.* 2: 816–824.

Qin, P., Ting, D., Shieh, A., and McCormick, S. (2012). Callose plug deposition patterns vary in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana* ecotypes and tomato species. *BMC Plant Biol.* 12, 178.

Qu, X., Zhang, H., Xie, Y., Wang, J., Chen, N., and Huang, S. (2013). *Arabidopsis* Villins promote actin turnover at pollen tube tips and facilitate the construction of actin collars. *Plant Cell.* 25, 1803–17.

Qu, X., Jiang, Y., Chang, M., Liu, X., Zhang, R., and Huang, S. (2015). Organization and regulation of the actin cytoskeleton in the pollen tube. *Front. Plant Sci.* 5.

Qu, X., Zhang, R., Zhang, M., Diao, M., Xue, Y., and Huang, S. (2017). Organizational innovation of apical actin filaments drives rapid pollen tube growth and turning. *Mol. Plant* 10, 930–947.

Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y., and Bohnert, H.J. (2002). From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol.* 3, research0001.1-research0001.17.

Quilichini, T.D., Douglas, C.J., and Samuels, A.L. (2014). New views of tapetum ultrastructure and pollen exine development in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 114, 1189–1201.

## R

R Development Core Team (2008) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>

Rae, A.L., Harris, P.J., Bacic, A., and Clarke, A.E. (1985). Composition of the cell walls of *Nicotiana glauca* Link et Otto pollen tubes. *Planta* 166, 128–133.

Raikhel, N., and Pirrung, M. (2005). Adding Precision Tools to the Plant Biologists' Toolbox with Chemical Genomics. *Plant Physiol.* 138, 563–564.

Ray, B., Loutelier-Bourhis, C., Lange, C., Condamine, E., Driouich, A., and Lerouge, P. (2004). Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterisation of a novel xyloglucan motif. *Carbohydr. Res.* 339, 201–208.

Redgwell, R.J., Fischer, M., Kendal, E., and MacRae, E.A. (1997). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203, 174–181.

Reichardt, I., Stierhof, Y.-D., Mayer, U., Richter, S., Schwarz, H., Schumacher, K., and Jürgens, G. (2007). Plant Cytokinesis Requires De Novo Secretory Trafficking but Not Endocytosis. *Curr. Biol.* 17, 2047–2053.

Ren, H., and Xiang, Y. (2007). The function of actin-binding proteins in pollen tube growth. *Protoplasma* 230, 171–182.

Renault, H., El Amrani, A., Palanivelu, R., Updegraff, E.P., Yu, A., Renou, J.-P., Preuss, D., Bouchereau, A., and Deleu, C. (2011). GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in expression of genes encoding secreted and cell wall-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52, 894–908.

Rhee, S.Y., Osborne, E., Poindexter, P.D., and Somerville C.R. (2003). Microspore Separation in the quartet 3 Mutants of *Arabidopsis* Is Impaired by a Defect in a Developmentally Regulated Polygalacturonase Required for Pollen Mother Cell Wall Degradation. *Plant Physiol.* 133, 1170–1180.

Richmond, T. (2000). Higher plant cellulose synthases. *Genome Biol.* 1, REVIEWS3001.

Richmond, T.A., and Somerville, C.R. (2000). The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol.* 124, 495–498.

Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929–967.

Rix, U., and Superti-Furga, G. (2009). Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat. Chem. Biol.* 5, 616–624.

Robert, S., Chary, S.N., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N.V., and Hicks, G.R. (2008). Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8464–8469.

Roberts, K. (2001). How the cell wall acquired a cellular context. *Plant Physiol.* 125, 127–130.

Roggen, H.P., and Stanley, R.G. (1969). Cell-wall-hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. *Planta.* 84, 295–303.

Rojas, E.R., Hotton S., and Dumais, J. (2011). Chemically mediated mechanical expansion of the pollen tube cell wall. *Biophysical Journal.* 101, 1844–1853.

Rong, D., Luo, N., Mollet, J.C., Liu, X., and Yang, Z. (2016). Salicylic Acid Regulates Pollen Tip Growth through an NPR3/NPR4-Independent Pathway. *Mol. Plant.* 9, 1478–1491.

Rounds, C.M., and Bezanilla, M. (2013). Growth Mechanisms in Tip-Growing Plant Cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 243–265.

Rounds, C.M., Hepler, P.K., and Winship, L.J. (2014). The Apical Actin Fringe Contributes to Localized Cell Wall Deposition and Polarized Growth in the Lily Pollen Tube. *Plant Physiol.* 166, 139–151.

Roy, S., Jauh, G.Y., Hepler, P.K., Lord, E.M. (1998) Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. *Planta.* 204, 450–458.

Roy, S.J., Gilliam, M., Berger, B., Essah, P.A., Cheffings, C., Miller, A.J., Davenport, R.J., Liu, L.-H., Skynner, M.J., Davies, J.M., et al. (2008). Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 31, 861–871.

Russell, S.D. (1992). Double fertilization. *Int Rev Cytol.* 140, 357–388

Rutten, T.L.M., and Derksen, J. (1990). Organization of actin filaments in regenerating and outgrowing subprotoplasts from pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 180, 471–479.

## S

Saha, B.C. (2000). Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 403–423.

Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., and Vandamme, E.J. (1993). [Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production,] Properties, and Applications. In *Advances in Applied Microbiology*, S. Neidleman, and A.I. Laskin, eds. (Academic Press), pp. 213–294.

Sanders, L.C., and Lord, E.M. (1989). Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species of flowering plants. *Science* 243, 1606–1608.

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

Schiefelbein, J.W., Shipley, A., and Rowse, P. (1992). Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 187, 455–459.

Schols HA, Bakx EJ, Schipper D, Voragen AGJ. 1995; A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydr Res.* 279:265–279.

Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in Brassica. *Science* 286, 1697–1700.

Schreiber, S.L. (1998). Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1127–1152.

- Schultink, A., Liu, L., Zhu, L., and Pauly, M. (2014). Structural Diversity and Function of Xyloglucan Sidechain Substituents. *Plants* 3, 526–542.
- Schultz, C.J., Johnson, K.L., Currie, G., and Bacic, A. (2000). The classical arabinogalactan protein gene family of arabidopsis. *Plant Cell* 12, 1751–1768.
- Schultz, C.J., Rumsewicz, M.P., Johnson, K.L., Jones, B.J., Gaspar, Y.M., and Bacic, A. (2002). Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiol.* 129, 1448–1463.
- Schweikert, C., Liskay, A., and Schopfer, P. (2000). Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry*. 53, 565–570.
- Seifert, G.J., and Roberts, K. (2007). The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 137–161.
- Serrano, M., Kombrink, E., and Meesters, C. (2015). Considerations for designing chemical screening strategies in plant biology. *Front. Plant Sci.* 6.
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J., and Nagano, T. (2003). Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. *J. Biol. Chem.* 278, 3170–3175.
- Sharova, E.I. (2007). Expansins: Proteins involved in cell wall softening during plant growth and morphogenesis. *Russ. J. Plant Physiol.* 54, 713–727.
- Shevell, D.E., Kunkel, T., and Chua, N.-H. (2000). Cell Wall Alterations in the Arabidopsis emb30 Mutant. *Plant Cell* 12, 2047–2060.
- Shiu, S.H., and Bleecker, A.B. (2003). Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 132, 530–543.
- Showalter, A.M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9.
- Showalter, A.M. (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 1399–1417.
- Showalter, A.M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D., and Welch, L.R. (2010). A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol.* 153, 485–513.
- Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T., Dow, J.M., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shibuya, N., Newman, M.-A., and Molinaro, A. (2010). Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* 20, 406–419.
- Silverstein, K.A.T., Moskal, W.A., Wu, H.C., Underwood, B.A., Graham, M.A., Town, C.D., and VandenBosch, K.A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 51, 262–280.
- Singh, M.B., and Knox, R.B. (1985). Gene controlling  $\beta$ -galactosidase deficiency in pollen of oilseed rape. *J. Hered.* 76, 199–201.
- Singh, S.K., Eland, C., Harholt, J., Scheller, H.V., and Marchant, A. (2005). Cell adhesion in Arabidopsis thaliana is mediated by ECTOPICALLY PARTING CELLS 1--a glycosyltransferase (GT64) related to the animal exostosins. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 43, 384–397.
- Smertenko, A.P., Deeks, M.J., and Hussey, P.J. (2010). Strategies of actin reorganisation in plant cells. *J. Cell Sci.* 123, 3019–3028.

- Snow, A.A., and Spira, T.P. (1991). Differential pollen-tube growth rates and nonrandom fertilization in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). *Am. J. Bot. USA*.
- Somerville, C. (2006). Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 53–78.
- Sommer, A., Geist, B., Da Ines, O., Gehwolf, R., Schäffner, A.R., and Obermeyer, G. (2008). Ectopic expression of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane intrinsic protein 2 aquaporins in lily pollen increases the plasma membrane water permeability of grain but not of tube protoplasts. *New Phytol.* 180, 787–797.
- Sommer-Knudsen, J., Clarke, A.E., and Bacic, A. (1997). Proline- and hydroxyproline-rich gene products in the sexual tissues of flowers. *Sex. Plant Reprod.* 10, 253–260.
- Soto, G., Alleva, K., Mazzella, M.A., Amodeo, G., and Muschietti, J.P. (2008). AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Lett.* 582, 4077–4082.
- Speranza, A., Crinelli, R., Scocianti, V., and Geitmann, A. (2011). Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit: ROS and pollen germination. *Plant Biol.* no-no.
- Staiger, C.J., Poulter, N.S., Henty, J.L., Franklin-Tong, V.E., and Blanchoin, L. (2010). Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen. *J. Exp. Plant Biol.* 61, 1969–86.
- Stanley RG., Linskens HF. (1974) Pollen, biology, biochemistry, management. Berlin: Springer.
- Steinhorst, L., and Kudla, J. (2013). Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 1573–1581.
- Stepka, M., Ciampolini, F., Charzynska, M., and Cresti, M. (2000). Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. Does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? *Planta.* 210, 630–635.
- Sterling, J.D., Quigley, H.F., Orellana, A., and Mohnen, D. (2001). The Catalytic Site of the Pectin Biosynthetic Enzyme  $\alpha$ -1,4-Galacturonosyltransferase Is Located in the Lumen of the Golgi. *Plant Physiol.* 127, 360–371.
- Sterling, J.D., Atmodjo, M.A., Inwood, S.E., Kolli, V.S.K., Quigley, H.F., Hahn, M.G., and Mohnen, D. (2006). Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5236–5241.
- Stewman, S.F., Jones-Rhoades, M., Bhimalapuram, P., Tchernookov, M., Preuss, D., and Dinner, A.R. (2010). Mechanistic insights from a quantitative analysis of pollen tube guidance. *BMC Plant Biol.* 10, 32.
- Stockwell, B.R. (2000). Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function. *Nat. Rev. Genet.* 1, 116–125.
- Stonebloom, S., Ebert, B., Xiong, G., Pattathil, S., Birdseye, D., Lao, J., Pauly, M., Hahn, M.G., Heazlewood, J.L., and Scheller, H.V. (2016). A DUF-246 family glycosyltransferase-like gene affects male fertility and the biosynthesis of pectic arabinogalactans. *BMC Plant Biol.* 16.
- Stratford, S., Barne, W., Hohorst, D.L., Sagert, J.G., Cotter, R., Golubiewski, A., Showalter, A.M., McCormick, S., and Bedinger, P. (2001). A leucine-rich repeat region is conserved in pollen extensin-like (Pex) proteins in monocots and dicots. *Plant Mol. Biol.* 46, 43–56.
- Sun, Y., Qian, H., Xu, X.D., Han, Y., Yen, L.F., and Sun, D.Y. (2000). Integrin-like proteins in the pollen tube: detection, localization and function. *Plant Cell Physiol.* 41, 1136–1142.

Suprenant, K.A. (1991). Unidirectional microtubule assembly in cell-free extracts of *Spisula solidissima* oocytes is regulated by subtle changes in pH. *Cell Motil. Cytoskeleton* 19, 207–220.

Suwińska, A., Lenartowski, R., Smoliński, D.J., and Lenartowska, M. (2015). Molecular evidence that rough endoplasmic reticulum is the site of calreticulin translation in *Petunia* pollen tubes growing in vitro. *Plant Cell Rep.* 34, 1189–1199.

Suwińska, A., Wasąg, P., Zakrzewski, P., Lenartowska, M., and Lenartowski, R. (2017). Calreticulin is required for calcium homeostasis and proper pollen tube tip growth in *Petunia*. *Planta* 245, 909–926.

Svetek, J., Yadav, M.P., and Nothnagel, E.A. (1999). Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 14724–14733.

Swanson, R., Edlund, A.F., and Preuss, D. (2004). Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annu. Rev. Genet.* 38, 793–818.

## T

Tagawa, K. and Kaji, A. (1969). Preparation of L-arabinose-containing polysaccharides and the action of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase on these polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 11, 293-301.

Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.-S., Kai, N., Watanabe, M., Suzuki, G., Hinata, K., and Isogai, A. (2000). The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 1920–1925.

Takeda, H., Yoshikawa, T., Liu, X.-Z., Nakagawa, N., Li, Y.-Q., and Sakurai, N. (2004). Molecular Cloning of Two Exo- $\beta$ -glucanases and Their in vivo Substrates in the Cell Walls of Lily Pollen Tubes. *Plant Cell Physiol.* 45, 436–444.

Takeuchi, H., and Higashiyama, T. (2016). Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in *Arabidopsis*. *Nature.* 531, 245–248.

Tan, L., Showalter, A.M., Egelund, J., Hernandez-Sanchez, A., Doblin, M.S., and Bacic, A. (2012). Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Front. Plant Sci.* 3.

Taylor L.P., and Hepler P.K. (1997). Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48, 461-491.

Thomas, S.G., and Franklin-Tong, V.E. (2004). Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* 429, 305–309.

Thomas, S.G., Huang, S., Li, S., Staiger, C.J., and Franklin-Tong, V.E. (2006). Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen. *Cell Biol.* 174, 221–229.

Tian, G.-W., Chen, M.-H., Zaltsman, A., and Citovsky, V. (2006). Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev. Biol.* 294, 83–91.

Tiwari, S.C., and Polito, V.S. (1988). Organization of the cytoskeleton in pollen tubes of *Pyrus communis*: a study employing conventional and freeze-substitution electron microscopy, immunofluorescence, and rhodamine-phalloidin. *Protoplasma* 147, 100–112.

Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T., and Matsuoka, K. (2009). A Mobile Secretory Vesicle Cluster Involved in Mass Transport from the Golgi to the Plant Cell Exterior. *Plant Cell Online* 21, 1212–1229.

Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Städler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K.K. (2010). Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature* 464, 1342–1346.

Tsukamoto, T., Qin, Y., Huang, Y., Dunatunga, D., and Palanivelu, R. (2010). A role for LORELEI, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in *Arabidopsis thaliana* double fertilization and early seed development. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 62, 571–588.

Twell, D., Yamaguchi, J., and McCormick, S. (1990). Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 109, 705–713.

Twell, D., Park, S.K., and Lalanne, E. (1998). Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends Plant Sci.* 3, 305–310.

## U

Ung, N., Brown, M.Q., Hicks, G.R., and Raikhel, N.V. (2013). An approach to quantify endomembrane dynamics in pollen utilizing bioactive chemicals. *Mol. Plant.* 6, 1202–1213.

## V

Valster, A.H., Pierson, E.S., Valenta, R., Hepler, P.K., and Emons, A.M.C. (1997). Probing the Plant Actin Cytoskeleton during Cytokinesis and Interphase by Profilin Microinjection. *Plant Cell* 9, 1815–1824.

van der Honing, H.S., van Bezouwen, L.S., Emons, A.M., and Ketelaar, T. (2011). High expression of lifeact in *Arabidopsis thaliana* reduces dynamic reorganization of actin filaments but does not affect plant development. *Cytoskeleton.* 68, 578–587.

van Linden, O.P.J., Kooistra, A.J., Leurs, R., de Esch, I.J.P., and de Graaf, C. (2014). KLIFS: a knowledge-based structural database to navigate kinase-ligand interaction space. *J. Med. Chem.* 57, 249–277.

Van Tieghem, Recherches physiologiques sur la végétation libre du pollen et de l'ovule (Ann. des sc. nat. Bot. 5<sup>e</sup> série, XII, 1872).

Verger, S., Chabout, S., Gineau, E., and Mouille, G. (2016). Cell adhesion in plants is under the control of putative O-fucosyltransferases. *Development* 143, 2536–2540.

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 ME, 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. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6, 293–303.

Verma, D.P., and Hong, Z. (2001). Plant callose synthase complexes. *Plant Mol. Biol.* 47, 693–701.

Vidali, L., McKenna, S.T., and Hepler, P.K. (2001). Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Mol. Biol. Cell.* 12, 2534–2545.

Vidali, L., and Hepler, P.K. (2001). Actin and pollen tube growth. *Protoplasma* 215, 64–76.

Vidali L., Rounds, C.M., Hepler, P.K., and Bezanilla, M. (2009). Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical f-actin network in tip growing plant cells. *PLoS ONE.* 4, e5744.

Vidali, L., Gisbergen, P.A.C. van, Guérin, C., Franco, P., Li, M., Burkart, G.M., Augustine, R.C., Blanchoin, L., and Bezanilla, M. (2009). Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13341–13346.

Vidali, L., Burkart, G.M., Augustine, R.C., Kerdavid, E., Tüzel, E., and Bezanilla, M. (2010). Myosin XI is essential for tip growth in *Physcomitrella patens*. *Cell*. 22, 1868–1882.

Vincken, J.-P., Schols, H.A., Oomen, R.J.F.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., and Visser, R.G.F. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol*. 132, 1781–1789.

Visser, J., and Voragen, A.G.J. (1996). *Pectins and Pectinases* (Elsevier).

Vogler, F., and Sprunck, S. (2015). F-Actin forms mobile and unwinding ring-shaped structures in germinating Arabidopsis pollen expressing Lifeact. *Plant Signaling & Behavior*. 10, 1075684.

Völz, R., Heydlauff, J., Ripper, D., von Lyncker, L., and Groß-Hardt, R. (2013). Ethylene Signaling Is Required for Synergid Degeneration and the Establishment of a Pollen Tube Block. *Dev. Cell* 25, 310–316.

## W

Walsh, D.P., and Chang, Y.-T. (2006). Chemical Genetics. *Chem. Rev.* 106, 2476–2530.

Wang, T., Xiang, Y., Hou, J., and Ren, H.-Y. (2008). ABP41 is Involved in the Pollen Tube Development via Fragmenting Actin Filaments. *Mol. Plant* 1, 1048–1055.

Wang, W., Wang, L., Chen, C., Xiong, G., Tan, X.-Y., Yang, K.-Z., Wang, Z.-C., Zhou, Y., Ye, D., and Chen, L.-Q. (2011). Arabidopsis CSLD1 and CSLD4 are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes. *J. Exp. Bot.* 62, 5161–5177.

Wang, L., Wang, W., Wang, Y.-Q., Liu, Y.-Y., Wang, J.-X., Zhang, X.-Q., Ye, D., and Chen, L.-Q. (2013). Arabidopsis Galacturonosyltransferase (GAUT) 13 and GAUT14 Have Redundant Functions in Pollen Tube Growth. *Mol. Plant* 6, 1131–1148.

Wang, H., and Jiang, L. (2014). Immunofluorescence Labeling of Pollen Tubes. *BIO-Protoc.* 4.

Webb CJ, Lloyd DG. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 163–178.

Wheeler, M.J., Franklin-Tong, V.E., and Franklin, F.C.H. (2001). The molecular and genetic basis of pollen–pistil interactions. *New Phytol.* 151, 565–584.

Wilkins, K.A., Bancroft, J., Bosch, M., Ings, J., Smirnov, N., and Franklin-Tong, V.E. (2011). Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of papaver. *Plant Physiol.* 156, 404–416.

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.* 308, 149–152.

Willats, W.G.T. (2001). Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276, 19404–19413.

Williams, J.H., Taylor, M.L., and O’Meara, B.C. (2014). Repeated evolution of tricellular (and bicellular) pollen. *Am. J. Bot.* 101, 559–571.

Wilsen, K.L., Lovy-Wheeler, A., Voigt, B., Menzel, D., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (2006). Imaging the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 19, 51–62.

Wilson, L.G., and Fry, J.C. (1986). Extensin—a major cell wall glycoprotein. *Plant Cell Environ.* 9, 239–260.



Wilson, Z.A., Song, J., Taylor, B., and Yang, C. (2011). The final split: the regulation of anther dehiscence. *J. Exp. Bot.* 62, 1633–1649.

Wodehouse, R.P. (1935) Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine. McGraw-Hill publications in the agricultural and botanical sciences.

Wolf, S., Mouille, G., and Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Mol. Plant* 2, 851–860.

Wolters-Arts, M., Lush, W.M., and Mariani, C. (1998). Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392, 818–821.

Worden, N., Park, E., and Drakakaki, G. (2012). Trans-Golgi Network—An Intersection of Trafficking Cell Wall Components. *J. Integr. Plant Biol.* 54, 875–886.

Wrzaczek, M., Brosché, M., and Kangasjärvi, J. (2013). ROS signaling loops: production, perception, regulation. *Curr Opin Plant Biol.* 16, 575–582.

Wu, H., Wang, H., and Cheung, A.Y. (1995). A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* 82, 395–403.

Wu, G., Gu, Y., Li, S., and Yang, Z. (2001). A Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Rop-Interactive CRIB Motif-Containing Proteins That Act as Rop GTPase Targets. *Plant Cell Online.* 13, 2841–2856.

Wu, J.-Z., Lin, Y., Zhang, X.-L., Pang, D.-W., and Zhao, J. (2008). IAA stimulates pollen tube growth and mediates the modification of its wall composition and structure in *Torenia fournieri*. *J. Exp. Bot.* 59, 2529–2543.

Wudick, M.M., and Feijó, J.A. (2014). At the intersection: merging Ca<sup>2+</sup> and ROS signaling pathways in pollen. *Mol. Plant* 7, 1595–1597.

Wudick, M.M., Luu, D.-T., Tournaire-Roux, C., Sakamoto, W., and Maurel, C. (2014). Vegetative and Sperm Cell-Specific Aquaporins of Arabidopsis Highlight the Vacuolar Equipment of Pollen and Contribute to Plant Reproduction. *Plant Physiol.* 164, 1697–1706.

Wyatt, S.E., and Carpita, N.C. (1993). The plant cytoskeleton-cell-wall continuum. *Trends Cell Biol.* 3, 413–417.

X

Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z., and Hong, Z. (2011). CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 65, 1–14.

Y

Yadegari, R. (2004). Female Gametophyte Development. *Plant Cell Online.* 16, S133–S141.

Yang, Z. (2008). Cell Polarity Signaling in Arabidopsis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 551–575.

Yapo, B.M. (2011). Rhamnogalacturonan-I: A Structurally Puzzling and Functionally Versatile Polysaccharide from Plant Cell Walls and Mucilages. *Polym. Rev.* 51, 391–413.

Yariv, J., Rapport, M.M., and Graf, L. (1962). The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochem. J.* 85, 383–388.

Yates, E.A., Valdor, J.F., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., Mackie, W., and Knox, J.P. (1996). Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6, 131–139.

Ye, J., Zheng, Y., Yan, A., Chen, N., Wang, Z., Huang, S., and Yang, Z. (2009). Arabidopsis Formin3 directs the formation of actin cables and polarized growth in pollen tubes. *Plant Cell*. 21, 3868–3884.

Yonezawa, N., Nishida, E., and Sakai, H. (1985). pH control of actin polymerization by cofilin. *J. Biol. Chem.* 260, 14410–14412.

York, W.S., Darvill, A.G., McNeil, M., Stevenson, T.T., and Albersheim, P. (1986). Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol.* 118, 3–40.

## Z

Zabackis, E., Huang, J., Müller, B., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1995). Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol.* 107, 1129–1138.

Zahid, A., Jaber, R., Laggoun, F., Lehner, A., Remy-Jouet, I., Pamard, O., Beaupierre, S., Leprince, J., Follet-Gueye, M.-L., Vitré-Gibouin, M., et al. (2017). Holaphyllamine, a steroid, is able to induce defense responses in *Arabidopsis thaliana* and increases resistance against bacterial infection. *Planta*.

Zaidi, M.A., O’Leary, S., Wu, S., Gleddie, S., Eudes, F., Laroche, A., and Robert, L.S. (2012). A molecular and proteomic investigation of proteins rapidly released from triticale pollen upon hydration. *Plant Mol. Biol.* 79, 101–121.

Zhang, G.F., and Staehelin, L.A. (1992). Functional Compartmentation of the Golgi Apparatus of Plant Cells. *Plant Physiol.* 99, 1070–1083.

Zhang, G.Y., Feng, J., Wu, J., and Wang, X.W. (2010). BoPMEI1, a pollen-specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. *Planta* 231, 1323–1334.

Zhang, Y., He, J., Lee, D., and McCormick, S. (2010). Interdependence of endomembrane trafficking and actin dynamics during polarized growth of *Arabidopsis* pollen tubes. *Plant Physiol.* 152, 2200–2210.

Zhu, J.-K., Shi, J., Singh, U., Wyatt, S.E., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Carpita, N.C. (1993). Enrichment of vitronectin- and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane–cell wall adhesion. *Plant J.* 3, 637–646.

Zhu, Z., Qi, F., Yan, C., and Zhan, Y. (2016). Sexually different morphological, physiological and molecular responses of *Fraxinus mandshurica* flowers to floral development and chilling stress. *Plant Physiol. Biochem.* 99, 97–107.

Ziegler, S., Pries, V., Hedberg, C., and Waldmann, H. (2013). Target Identification for Small Bioactive Molecules: Finding the Needle in the Haystack. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 2744–2792.

Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., and Preuss, D. (1999). Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Dev. Camb. Engl.* 126, 5431–5440.

Zonia, L., and Munnik, T. (2008). Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. *J. Exp. Bot.* 59, 861–873.

# ANNEXES

**Ferdousse LAGGOUN**

44, rue Stanislas GIRARDIN.

76000 Rouen.

**Téléphone** : 06 74 02 79 01

**E-mail** : ferdousse.laggoun@gmail.com

## *Curriculum Vitae*

### CURSUS UNIVERSITAIRE

- Octobre 2013-  
à aujourd'hui     **Doctorante en Biologie Cellulaire Végétale**  
Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire (Glyco-MEV, EA4358),  
Université de Rouen Normandie.
- 2013                 **Master Recherche Mention Biosciences Spécialité Sciences du Végétal**  
**Ecoproduction et Biovalorisation**  
Universités de Rouen et de Caen. Mention : Bien.
- 2009                 **Ingénieur d'état en Biologie option : Génie-biologie**  
Université de M'hamed Bougara, Boumerdès (Algérie). Mention : Très bien.

### EXPERIENCES PROFESSIONNELLES ET STAGES

- Octobre 2016-  
Août 2017         **ATER attachée temporaire d'enseignement et de recherche**  
Université de Rouen Normandie
- Octobre 2015-  
Octobre 2016     **Monitorat**  
Dans le cadre de mon doctorat, j'exerçais la fonction de moniteur et j'ai effectué 45  
heures de cours équivalent à l'université de Rouen Normandie.
- Février-Juillet  
2013                 **Stage M2**  
Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire (Glyco-MEV), Université de  
Rouen Normandie : Etude de l'effet de molécules sélectionnées sur la résistance  
d'*Arabidopsis thaliana* contre une bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae*.
- Février-Juin  
2012                 **Stage M1**  
Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire (Glyco-MEV), Université de  
Rouen Normandie : Un criblage a été fait sur un pool de molécule en se basant sur  
l'induction des défenses naturelles d'une plante modèle *Arabidopsis thaliana*.
- 2009-2011         **Technicienne**  
Laboratoire d'analyses médicales privé (Dr. Boudissa), Boumerdès (Algérie).
- Février-Juin  
2009                 **Projet de fin d'études (PFE)**  
CRD-SAIDAL (laboratoire pharmaceutique), Alger (Algérie) : Extractions et analyses  
physico-chimiques et évaluation de l'activité anti-microbiologique des huiles essentielles  
du Laurier (*Laurus nobilis.L*).

## FORMATIONS

### **Appareils et logiciels**

Conduite d'autoclave

Microscope confocale SP2 Leica (droit et inversé) (Plateforme PRIMACEN)

Cyverse : cyberinfrastructure pour le stockage et le traitement des données (Workshop Tucson, ARIZONA USA, March 18<sup>th</sup> 2016).

### **Séminaire (edNBISE)**

Animer une réunion

Maîtriser sa communication professionnelle auprès des acteurs du monde socio-économique

Manager une équipe projet

### **Pédagogique (formation des doctorants à mission d'enseignement)**

Appréhender les avantages et limites de l'empathie en éducation

Accueillir des étudiants handicapés à l'université : cadre institutionnel et adaptations pédagogiques

Comprendre la structure et le fonctionnement de l'université

Groupes d'analyses de situations professionnelles

## ENCADREMENTS

2 stagiaires de L3 durant ma 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> année de doctorat.

## PARTICIPATION A LA VIE DES INSTITUTIONS

Co-organisation des journées de l'école doctorale edNBISE à Rouen, 26 – 27 mars 2015.

Animation de la fête de la science chaque année durant le mois d'octobre de 2013 à 2016.

## COMPETENCES PARTICULIERES

- Culture de pollen en milieu liquide
- Phytopathologie (infection de plantes *in vivo* et *in vitro*)
- Cultures sur milieu gélosé et sur terre d'*Arabidopsis thaliana*
- Imagerie cellulaire (microscopie confocale et à épifluorescence)
- Biochimie (extraction de polysaccharides de la paroi, dosage des monosaccharides par CPG, chromatographie d'exclusion stérique)
- Génétique chimique (criblage moléculaire)
- Langues : Anglais (parlé et scientifique)
- Microsoft office, logiciel ImageJ

## COMMUNICATIONS

### ***Publications***

Zahid A, Jaber R, Laggoun F, Lehner A, Remy-Jouet I, Pamard O, Beaupierre S, Leprince J, Follet-Gueye ML, Vicré-Gibouin M, Latour X, Richard V, Guillou C, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC:

«Holaphyllamine, a steroid, is able to induce defense responses in *Arabidopsis thaliana* and increases resistance against bacterial infection». *Planta*, 2017.

### ***Communications orales***

Laggoun F : «Small molecules interfere with adhesion and the tip-polarized growth of pollen tubes». English minitalks session, Université de Rouen Normandie, 5 juin 2015.

Laggoun F, Dardelle F, Driouich A, Lerouge P, Lehner A et Mollet JC: «Characterization of *Arabidopsis* pollen tube adhesion matrix using an enzymatic approach». 11<sup>ème</sup> Journées du Réseau Français des Parois 2017, Orléans, France, 27-29 juin 2017.

### ***Communications affichées***

Laggoun F, Dardelle F, Falconet D, Lesnard A, Rault S, Driouich A, Lerouge P, Lehner A et Mollet JC :

«Small molecules interfere with the tip-polarized growth of *Arabidopsis* and tomato pollen tubes». 23<sup>rd</sup> International Congress of Sexual Plant Reproduction Research ICSPR, Porto, Portugal, 13-18 Juillet 2014.

Laggoun F, Dardelle F, Driouich A, Lerouge P, Lehner A et Mollet JC:

«*Arabidopsis* pollen tube growth and adhesion: Dissecting the pectin structure using an enzymatic approach». 24<sup>th</sup> International Congress of Sexual Plant Reproduction Research ICSPR, Tucson, Arizona USA, 18-23 Mars 2016.

# Small molecules interfere with the tip-polarized growth of arabidopsis and tomato pollen tubes

Laggoun Ferdousse<sup>1</sup>, Dardelle Flavien<sup>1,2</sup>, Falconet Denis<sup>3</sup>, Lesnard Aurélien<sup>4</sup>, Rault Sylvain<sup>4</sup>, Driouch Azeddine<sup>1,5</sup>, Lerouge Patrice<sup>1</sup>, Lehner Arnaud<sup>1</sup> and Mollet Jean-Claude<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, EA4358, IRIB, Normandy University, University of Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan, France.

<sup>2</sup>Present address : Fitoplanton Marino, S.L. 11500 El Puerto de Santa Maria, Cádiz, Spain.

<sup>3</sup>Physiologie Cellulaire & Végétale (PCV), UMR 5168 - CEA - CNRS - INRA - Université Joseph Fourier, 38054 Grenoble, cedex 9, France.

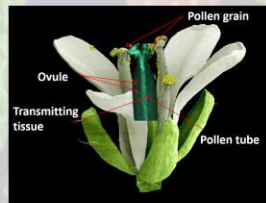
<sup>4</sup>Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie UPRES EA 4258 - FR CNRS 3038 INC3M, Normandy University, University of Caen, 14032 Caen, France.

<sup>5</sup>Plate-forme de Recherche en imagerie de Haute Normandie (PRIMACEN), IRIB, Normandy University, University of Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan, France.



## I. Introduction

Sexual reproduction in land plants is of main economic importance because it allows the production of seeds. The process starts when the pollen grain lands on the stigma, rehydrates and produces a pollen tube, a tip-polarized cell that grows through the transmitting tract tissue and delivers the two sperm cells to the ovule.



## II. Problematic

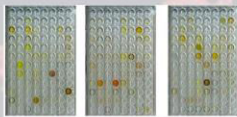
To date, the mechanisms that occur during the **tip-polarized growth, guidance and adhesion** of pollen tubes through the female transmitting tract tissue are not well known.

## III. Aim of this work

To investigate these different mechanisms *in vitro*.

**using a chemical screen approach**

## IV. Chemical Screen:



Using a chemical screen of 300 small bioactive compounds originating from the CERMN (Centre d'étude et de Recherche du Médicament de Normandie) in 96-well plates

8 compounds were selected

- ✓ 3 for their abilities to perturb *Arabidopsis thaliana* pollen tube growth and shape.
- ✓ 5 for their inhibiting effects on the adhesion of pollen tubes *in vitro* on a matrix composed of an enriched-pectin fraction isolated from *Arabidopsis thaliana* pistils.

## V. Materials and Methods

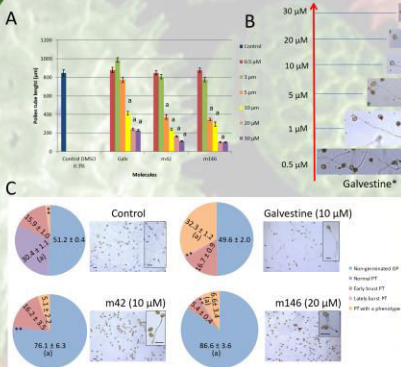
Flowers of *A. thaliana* and tomato (*Solanum lycopersicum*)

Extraction of pollen grains and culture for 6 h in a germination medium containing the selected compounds

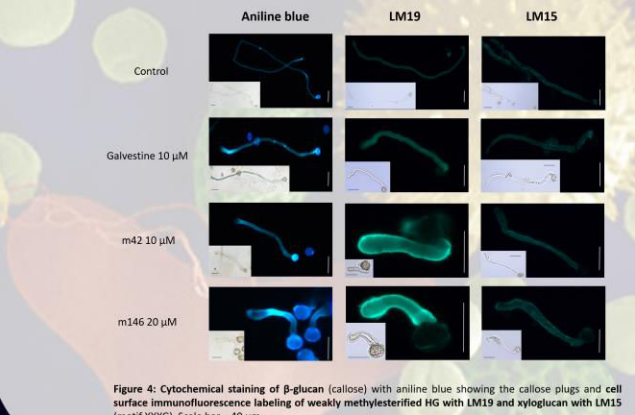
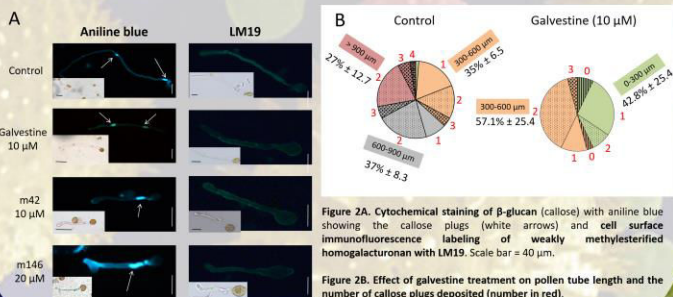
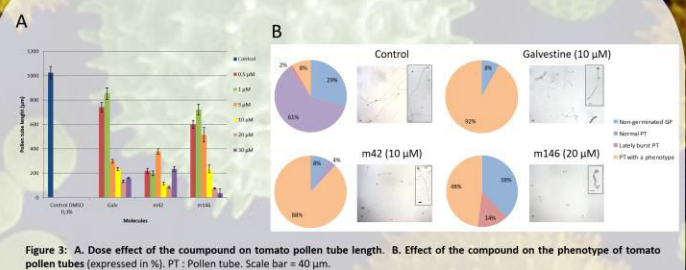
1/ Evaluation of the dose-dependent effect

2/ Select the concentration that induces a phenotype

## VI. Effect on arabidopsis pollen tubes



## VII. Effect on tomato pollen tubes



## VII. Conclusions and perspectives :

- The selected compounds have a dose-dependent effect on arabidopsis and tomato pollen tube growth.
- In arabidopsis, the callose plug distribution is affected by galvestine treatment (a compound able to perturb galactolipid synthesis) and the pollen tube length is reduced. Similarly, the localisation of weakly methylsterified HG and xyloglucan was not affected in arabidopsis and tomato.
- In contrast, m42 and m146 have an effect on the tip-growth of arabidopsis and tomato pollen tubes with a noticeable accumulation of callose at the tip. M42 and m146 appeared to have an effect on the distribution of weakly methylsterified HG in tomato.

Effect of the compounds on the cytoskeleton organization of the pollen tube as well as the localization and characterization of the target of the compounds are in progress.

# Arabidopsis pollen tube growth and adhesion: Dissecting the pectin structure using an enzymatic approach

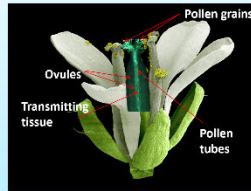
Laggoun Ferdousse<sup>1</sup>, Dardelle Flavien<sup>1,5</sup>, Driouch Azeddine<sup>1</sup>, Lerouge Patrice<sup>1</sup>, Lehner Arnaud<sup>1</sup> and Mollet Jean-Claude<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, Glyco-MEV<sup>2</sup>, 76000 Rouen, France.  
<sup>2</sup> Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA4358, IRIB, VAS, Normandie Université, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan, France.  
<sup>3</sup> Present address: LPS-BioSciences, Bâtiment 409, Université Paris-Sud, 91400 Orsay, France.

## I. Introduction

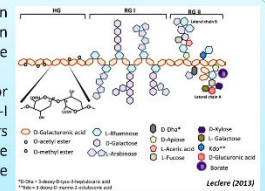
Guidance and adhesion are essential mechanisms for sexual reproduction in flowering plants. The process starts when the pollen grain lands on the stigma, rehydrates and forms a pollen tube that grows through the transmission tract tissue and delivers the two gamete cells to the ovule. The female transmitting tract tissue plays a key role for the pollen tube as it serves as an adhesion matrix ensuring the physical support needed for its progress to the ovules.

To date, the involvement of the different components of the cell wall and their relative importance during adhesion is not known. In order to study the role of cell wall components in adhesion, we prepared different matrices, enriched in different classes of cell wall polymers and set up a robust and efficient *in vitro* adhesion test.



As the pectin-enriched matrix was the most efficient in promoting adhesion, we further investigated, using an enzymatic approach, what could be the minimal structure required for *in vitro* pollen tube adhesion.

Pectins are complex polymers composed of three major domains: homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG-I) and rhamnogalacturonan-II (RG-II). The main sugars are galacturonic acid (GalA)(HG and RG-I) that can be methyl and acetyl esterified and rhamnose (Rha), galactose (Gal) and arabinose (Ara) found also in RG-I.

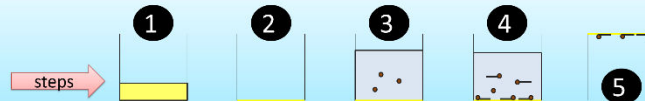


## II. Aim of this work

To determine the minimal pectin structure required for *Arabidopsis thaliana* pollen tube adhesion *in vitro*.

## III. Adhesion assay

Use of an *in vitro* adhesion assay in 96-well plates



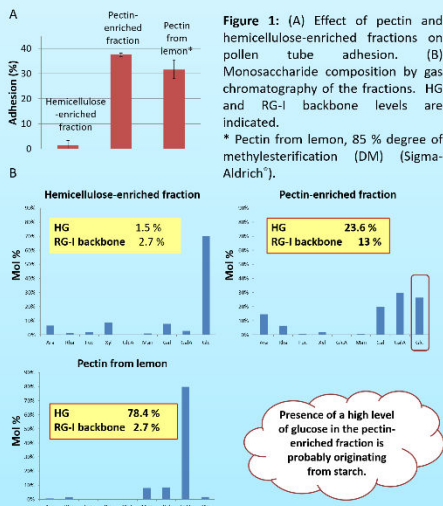
1. Deposition of the matrix (70 µg).
2. Water evaporation.
3. Deposition of pollen grains in liquid germination medium.
4. Incubation at 22°C in the dark for 6h. Count the number of pollen tubes in contact with the matrix.
5. Washing step : Flip the plate, rinse 2 times with water, and count the number of remaining adhered pollen tubes.

## IV. Results

### 1. The cell wall polymers that allow pollen tube adhesion are pectins

Table 1: Adhesion rate according to the origin of pectins and the extraction method.

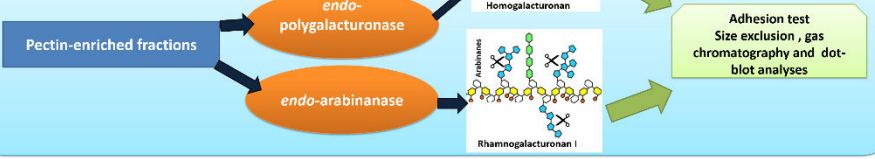
Organs	Cell wall fraction	Extraction	Adhesion (%)
Flowers	Pectin-enriched	Imidazole	39.4
Leaves	Pectin-enriched	Imidazole	31.1
Leaves	Pectin-enriched	Ammonium oxalate	13.0
Leaves	Hemicellulose-enriched	Potassium hydroxide	2.3



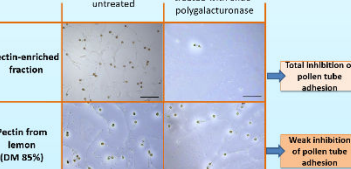
### 2. Starch does not play a role in adhesion



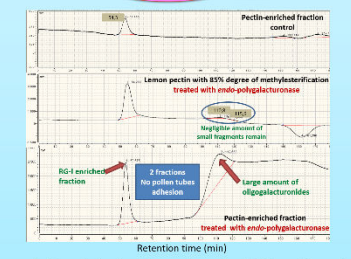
### 3. Enzyme treatments



### 4. Cleavage of the HG backbone disrupts pollen tube adhesion except if the DM is high

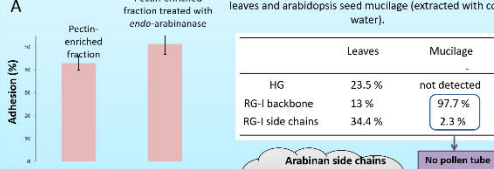


**Figure 3:** An *endo*-polygalacturonase treatment on the pectin-enriched fraction and on pectin from lemon (DM = 85%). Pictures show pollen tubes remaining on the matrix after the washing step. scale bar = 200 µm.



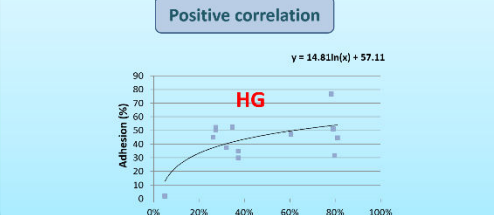
**Figure 4:** Size Exclusion Chromatography (SEC) performed on Sephadex-75G (fractionation range  $3 \times 10^3 - 8 \times 10^6$  Da) of untreated and treated pectin-enriched-fraction and pectin from lemon with *endo*-polygalacturonase.

### 5. Role of rhamnogalacturonan-I backbone and arabinan side chains



**Figure 5:** (A), Effect of an *endo*-arabinanase treatment of the pectin-enriched fraction on the adhesion. (B), Dot-blot with the LM6 monoclonal antibody which recognizes epitopes associated with arabinan side chains of RG-I.

### 6. Correlation between adhesion and HG levels in different pectin-enriched fractions



## VI. Conclusions and perspectives:

- ✓ Pectin-enriched fractions allow *Arabidopsis thaliana* pollen tube adhesion on an *in vitro* system.
- ✓ RG-I backbone and arabinan side chains do not promote pollen tube adhesion. Are galactan side chains of RG-I involved ?
- ✓ Long chains of HG are needed for adhesion. What is the minimum degree of polymerization of the HG to ensure adhesion?
- ✓ Pectin from citrus with high DM (85%) is able to promote adhesion. Is the degree of methylesterification of HG important?

### Acknowledgements:

Ferdousse Laggoun and the co-authors are grateful to "Plant Reproduction 2016" for providing partial financial support to attend the conference.



## RESUME :

Au cours de la reproduction sexuée chez les plantes supérieures, les grains de pollen adhèrent aux stigmates, se réhydratent et produisent des tubes polliniques qui se développent à travers le tissu de transmission femelle afin d'assurer la fécondation. Les tubes polliniques sont des cellules dont la croissance est rapide et polarisée à l'apex du tube. Ils représentent de bons modèles pour étudier la dynamique de la croissance cellulaire. Les tubes polliniques sont aussi capables de percevoir des signaux de guidage et d'adhérer à la matrice extracellulaire du tissu femelle. Afin de comprendre le mécanisme cellulaire de la croissance et de l'adhésion du tube pollinique, deux approches différentes ont été utilisées. Premièrement, un criblage de 258 molécules a permis d'isoler deux composés qui perturbent *in vitro* la croissance des tubes polliniques de tabac, de tomate et d'*Arabidopsis thaliana*. Les effets d'un inhibiteur des monogalactosyldiacylglycérol synthases, la galvestine-1, ont également été étudiés sur la croissance des tubes. Nous avons montré que ces trois composés réduisent la longueur du tube pollinique et induisent des phénotypes anormaux de façon dose-dépendante. La germination du pollen était réduite avec les deux composés isolés du criblage. Ils ont également affecté la distribution des polymères de la paroi des tubes polliniques. Les composés ont perturbé la production de ROS, ont désorganisé la dynamique des filaments d'actine et de la protéine RIC4 suggérant qu'ils pourraient perturber le trafic de vésicules à l'extrémité du tube pollinique. Dans un second temps, nous avons mis au point une approche de déconstruction enzymatique d'une matrice enrichie en polysaccharides afin d'étudier les phénomènes d'adhésion *in vitro* des tubes polliniques. Ce test a été développé sur des plaques 96 puits pour les tubes polliniques d'*A. thaliana*, en utilisant différents extraits de parois cellulaires de fleurs et de feuilles d'*A. thaliana* comme matrice ou des pectines commerciales de citron avec différents degrés de méthylestérification. Les traitements avec une polygalacturonase et une *endo*-galactanase des pectines commerciales et de l'extrait de paroi cellulaire de feuilles ont totalement ou partiellement perturbé l'adhésion des tubes polliniques. Ces résultats montrent que les tubes polliniques d'*A. thaliana* sont capables d'adhérer à des pectines d'origines diverses (espèces et organes) et suggèrent que les chaînes d'homogalacturonanes, les chaînes latérales du rhamnogalacturonane-I, en particulier les galactanes, avec un poids moléculaire minimum seraient nécessaires à l'adhésion des tubes polliniques.

**Mots-clés :** *Arabidopsis thaliana*, tube pollinique, génétique chimique, galvestine-1, RIC4, actine, adhésion, pectines, traitements enzymatiques.

## ABSTRACT :

During plant sexual reproduction pollen grains land on the stigma, rehydrate and produce pollen tubes that grow through the female transmitting-tract tissue to assure a proper fertilization. Pollen tubes are fast tip-growing cells and represent a good model to study growth dynamics. Pollen tubes are able to perceive female guidance signals and to adhere to the extracellular matrix of the female transmitting tract. In order to improve our knowledge on the cell mechanisms implicated during pollen tube growth and adhesion, two different approaches have been used. First, 258 compounds were screened and two small compounds were isolated. They disrupted *in vitro* pollen tube growth of tobacco, tomato and *Arabidopsis thaliana*. The effects of an inhibitor of monogalactosyldiacylglycerol synthases, galvestine-1, on pollen tube growth were also studied. We showed that these 3 compounds reduced pollen tube length and induced abnormal phenotypes in a dose dependent manner. Pollen germination was significantly reduced with the two compounds isolated from the screen. They also affected cell wall material arrangement in pollen tube cell wall. The compounds modified ROS production and were able to disorganized actin filaments as well as the dynamic changes of the protein RIC4 suggesting that they might perturb vesicle trafficking at the pollen tube tip. Secondly, using a plant-made adhesion matrix in 96 –well plates, we studied the *in vitro* adhesion of *A. thaliana* pollen tubes. Different cell wall extracts from *A. thaliana* flowers and leaves or commercial lemon pectins with different degree of methylesterification were tested and the adhesive fractions were deconstructed by enzymatic treatments. Polygalacturonase or *endo*-galactanase treatments of commercial pectins and pectin-enriched cell wall extracts totally or partially disrupted pollen tube adhesion. Our results pointed out that *A. thaliana* pollen tubes are capable of adhering on pectins from diverse origins (species and organs) and suggested that homogalacturonan, the side chains of rhamnogalacturonana-I, especially galactans, as well as a minimum molecular weight may be necessary for pollen tube adhesion.

**Keywords :** *Arabidopsis thaliana*, pollen tube, chemical genetics, galvestine-1, RIC4, actin, adhesion, pectins, enzymatic treatments.